

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de l'enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université ABDARAHMANE MIRA –Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Master

Filière: Biologie

Option: Biochimie Appliquée

Thème

Extraction et purification partielle de la
Chaperonine Cytoplasmique CCT

Présenté par:

M^{elle} TIBOUCHE Acia

M^{elle} BELKASMI Damia

Membre de jury

Présidente : M^{elle} KHETAL B.

Promotrice : Mme BENMAMMAR C.

Examinatrice : M^{elle} BOUCHEFA S.

Examineur : M^R BOUGUEZZA Y.

Grade et lieu

M.C.A UAMB

M.A.A UAMB

M.A.B UAMB

M.A.A UAMB

Promotion 2013

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents :

Ma mère ce mot sacré dont je tiens tant cette femme formidable ; remarquable qui ne s'est jamais laissée abattre cette femme qui ma soutenu et sans la quelle je ne serai pas là aujourd'hui. Cette femme que j'admire énormément. Je t'aime Maman

Mon père celui qui a toujours cru en mes capacités. , ma soutenu a tous moment de ma vie

Mes très chers sœurs : Ratiba, katia et Ferial

Mes très chers frères : Yacine, Lamine et Sami

Mon oncle Abdenour, son épouse kahina et leurs filles Inès et Melissa

Mon oncle Zoubir, son épouse Samira et leurs enfants Sonia, Hayette, Silia, Walid et Mened

Mon très cher oncle Farid

Mes deux grand-mères

Ma tante Fahima et ses deux filles Missilva et Meriem

Mes tantes et leurs enfants

Mon inoubliable Amira Chahrazad qui m'a toujours soutenue et a été là pour moi pour qui les mots ne sont suffisant pour la remercier. et toutes sa famille

Mes cousins et cousines surtout Damia et Nadia.

Mon meilleur amis khaled

Mes amis: Rafik , Ramdane et Nawel

Tous mes amis

Toute la promotion Biochimie Appliquée 2013

Damia B.

Dédicaces

Je remercie le bon Dieu le plus puissant de m'offrir la patience et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail à :

Les deux personnes les plus chères pour moi dans ce monde: mon père et ma mère qui n'ont pas cessé d'être à mes cotés dans toutes les étapes que j'ai affranchi et qui m'ont aidé pour arriver là où je souhaitais. Pour cela j'en profite l'occasion pour les remercier pour l'éducation que m'ont donnée et pour leur soutien tout au long de mon parcours.

Mes chers frères Zahir et Nassim, sans eux je serai perdue.

Mes chères sœurs, les étoiles qui m'entourent: Samia, Linda, Kahina, Aicha, Ouahiba, Hamida, la petite Lydia gâtée et ma belle sœur Malika. Sans eux mon chemin devient noir.

Mes nièces : Iméne, Sihem, Djanna, A., Inesse, Djanna, M. et mon neveu Imad Elddine

Mes beaux frères Abdel Ghani, Zohir et Abdel hafid.

Mes oncles et leurs petites familles et aussi à mes tentes et leurs petites familles.

A mon oncle Said et sa petite famille qui est ma deuxième famille.

Mes meilleurs amies: je commence par mes amies d'enfance Dalila, K., et Naoual, O., Hassiba, B., Samira, S., Nadia, B., Leila, T., Sabrina, B., Zoulikha, C., Katia, S., Kahina, B., Thanina, T., Souad, B., Sabrina, A., Monia, A., Soraya, B., Samiha, R., Nihed, T., Hayet, F., Fouzia, B., Naoual, B., Tounés, L., Amel, L., et je tien à celles que j'ai oublié de me pardonner.

Mes meilleurs amis: spécialement à ceux qui m'ont soutenu et m'ont encouragé de loin Lyazid, A., Sofiane, B., Nassim, B., à mes amis de laboratoire Hamid, B., Bouzid, O., et à tout ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, sans avoir oublier toute la promotion de Biochimie Appliquée.

Acia.T

Sommaire

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	1
I. Chaperons moléculaires et repliement des protéines <i>in vivo</i>	2
I.1. Les chaperons moléculaires	2
I.1.1. Classification des chaperons moléculaires	3
I.1.1.1. La famille des Hsp110	3
I.1.1.2. La famille des Hsp90	3
I.1.1.3. La famille des Hsp70	5
I.1.1.4. Les petites Hsp	6
I.1.1.5. La famille des Hsp60	6
II. Les chaperonine	7
II.1. La chaperonine cytoplasmique CCT	8
II.1.1. La structure de la CCT	9
II.1.2. Le mécanisme réactionnel de la CCT	11
II.1.3. Mécanisme allostérique de la CCT	12
II.1.4. Les substrats de la CCT	13
II.1.5. But du travail	14
Matériels et méthodes	
I. Matériels biologiques	
I.1. Le foie	15
I.2. Le lysat de réticulocytes de lapins	15
II. Extraction de la chaperonine CCT	16

II.1. A partir d'un fragment de foie	16
II.2. Préparation des lysats de réticulocytes	16
II.3.purification de la chaperonine CCT par chromatographie échangeuse d'anions	16
II.3.1. Préparation des colonnes	17
II.3.2.Chargement des échantillons	17
II.3.3. Elution	17
II.3.4.Dosage des protéines totales	18
II.4. Évaluation de la pureté par électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE à 12 %	19
II.4.1.Dénaturation des	19
II.4.2.Préparation des gels	19
II.4.2.1. Le gel de séparation à 12 %	19
II.4.2.2.Gel de concentration	20
II.4.3.Dépôt des échantillons et migration	20
II.4.4.Coloration et décoloration des gels	21
Résultats et discussion	
I.La Purification de la CCT	22
I.1.Analyse du chromatogramme de purification de la CCT à partir de l'extrait de foie.	22
I.2.Analyse du chromatogramme de purification de la CCT à partir du lysat de réticulocytes de lapins.	22
II.Évaluation des quantités de protéines purifiées.	23
Conclusion	28
Annexes	
Référence bibliographique	

Liste des abréviations

ABD: ATP Binding Domain.

AP: Apical.

APS: Ammonium Per Sulfate.

BSA: Bovin Serum Albumin.

CCT: Chaperonin- containing *t*-complex polypeptid1.

Cpn: Chaperonine.

DO: Densité Optique.

E.Coli: Escherichia Coli.

EDTA: Acide D'éthylène Diamine-Tetraceutique.

EGTA: Acide D'éthylène GlycérolTetraceutique.

EQ: Equatorial.

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatograh

GroEL: Growth E-coli Large protein.

GroES: Growth E-coli small protein.

MP: Marquer de Poids moléculaire.

PBD: Peptide Binding Domain.

Rubisco: Ribulose bi phosphate carboxylase mono oxygenase.

SDS PAGE: Soduim Dodecyl Sulfate Polycrilamide Gel Electrophoresis.

SHsp: Small Heat shock proteins.

t/g: tour par gradient.

TCP-1: Polypeptide Complexe Taille 1.

TF55: Termophilic Factor 55.

TPR: Tetratricopeptide Repeat.

TRiC: Tcp-1 containing Ring Complex.

Tris:Tris-(Hydroxylméthyl)-aminométhane.

UA: Unité Arbitraire.

UV: Ultra Violet.

V: Volt.**VHL:** Von Hippel-Lindau.

Liste des figures

N°	Titre	page
1	Modèle de l'activité chaperon d'Hsp90	4
2	Structures de HSP70	5
3	La structure du complexe GroEL/GroES révélée par la cristallographie	8
4	La représentation schématique de la structure de la CCT et l'orientation de ses sous-unités	9
5	Structure atomique d'une sous unité de la CCT illustrant ses trois domaines	11
6	Modèle hypothétique pour le mécanisme de repliement de protéines possédant un domaine C-terminale dépendant de CCT(TRiC).	12
7	Chromatogramme de purification de la chaperonine cytoplasmique à partir du lysat de réticulocytes de lapin	24
8	Chromatogramme de purification de la chaperonine cytoplasmique CCT à partir d'un extrait de foie de mouton	24
9	Comparaison des profils de migration de protéines sur gel SDS-PAGE	26
10	Courbe de référence, les distances parcourues sur le gel de migration par les différentes bandes en fonction de leurs poids moléculaire	27

Liste des tableaux

N°	Titre	page
I	Gamme de BSA	18
II	La composition de gel de séparation	20
III	La composition de gel de concentration	20
IV	Résultats du dosage des protéines totales sur quelques fractions du lysat de réticulocytes de lapins	23
V	Résultats du dosage des protéines totales sur quelques fractions de l'extrait de foie de mouton	23

Introduction

Dans la cellule, les chaînes polypeptidiques naissantes sont synthétisées de façon séquentielle par le ribosome (Moore, 1997) de l'extrémité N vers l'extrémité C. C'est l'étape de traduction de l'information génétique contenue dans l'ADN. Ensuite, la protéine se replie en une structure tridimensionnelle, spontanément ou grâce à l'intervention d'autres protéines notamment des complexes appelés chaperons moléculaires (Benahbilès *et al.*, 2000).

Les chaperons moléculaires sont des protéines ubiquitaires impliquées dans la régulation de la protéostase cellulaire, la conformation et la dégradation protéique (Gibert, 2010).

Les chaperons moléculaires sont classés en fonction de leur poids moléculaires et leurs fonctions en plusieurs familles hautement conservées (Zhang *et al.*, 2002). Parmi lesquelles on retrouve la famille des Hsp60. Des membres de cette famille sont également appelés « chaperonine », pour préciser que leur expression n'est pas induite par le choc thermique.

Les chaperonines de plusieurs organismes aussi bien eucaryotes que procaryotes partagent une structure commune en double anneaux. Elles sont subdivisées en deux groupes ; Le groupe I est retrouvé chez les eubactéries et dans les organelles eucaryotes d'origine endosymbiotiques (mitochondries et chloroplastes). Ce groupe est représenté par la chaperonine GroEL. Tandis que le second groupe est retrouvé chez les archaebactéries et dans le cytosol des cellules eucaryotes et est représenté par la chaperonine cytoplasmique CCT (Chaperonin- containing *t*-complex polypeptid1) (Yébenes *et al.*, 2011).

La CCT est indispensable à la survie et la croissance cellulaire car elle assiste le repliement d'environ 10% des protéines néosynthétisées parmi lesquelles les protéines du cytosquelette et des régulateurs de cycle cellulaires (Yam *et al.*, 2008; Hartl *et al.*, 2011; Leitner *et al.*, 2012). Un certain nombre de substrats de la CCT ne peut être replié par d'autre chaperonines. Cette spécificité suggère que la CCT possède une structure et un mécanisme uniques qui la distinguent des autres chaperonines (Cong *et al.*, 2010).

L'extraction et la purification de la CCT ont été l'objet de plusieurs études pour comprendre et mettre en évidence son assistance dans le repliement des protéines *in vitro*.

Dans notre travail nous avons extrait et purifié la CCT à partir du lysat de réticulocytes de lapins et du foie de mouton selon le protocole de Gao *et al.*, 1992 modifié.

L'information contenue dans l'ADN est retranscrite en ARNm puis en polypeptide. Cette opération fait appel à la complémentarité moléculaire et au code génétique et aboutit à la formation d'une protéine fonctionnelle. Le processus par lequel les protéines passent d'une séquence linéaire à une structure tridimensionnelle native est complexe et fait intervenir un certain nombre d'acteurs et dépendant du milieu environnant.

I. Chaperons moléculaires et repliement des protéines *in vivo*

Certaines protéines, même celles dont les ponts disulfures ont été rompus par des agents dénaturants, sont capables de se replier spontanément comme l'ont démontré Christian Anfinsen et son équipe (Anfinsen, 1973; Benhabiles, 2000). Il a longtemps été postulé que le repliement d'une chaîne se faisait *in vivo* par les mêmes mécanismes que ceux démontrés *in vitro*. Cette vue a été modifiée par la découverte des chaperons moléculaires (Ellis, 1992; Jaenicke, 1993; Buchner, 1996; Clarke, 1996; Ellis, 1996). Les chaperons, par leur association transitoire avec des protéines naissantes ou déstabilisées par un stress, sont capables d'empêcher un mauvais repliement ou une agrégation. Par contre, elles ne semblent pas pouvoir interagir avec les protéines natives ou se lier à une chaîne totalement dépliée. Elles régulent la vitesse de repliement en agissant comme des catalyseurs mais ne paraissent pas remettre en question le postulat d'Anfinsen selon lequel l'information nécessaire au repliement est contenue dans la séquence primaire (Yon, 1997 ; Benhabiles *et al.*, 2000).

I.1. Les chaperons moléculaires

Les activités et les fonctions biologiques d'un organisme vivant requièrent l'intervention de protéines sous forme monomérique ou organisées en complexes oligomériques. Sachant que pour une protéine donnée, il n'existe qu'une seule conformation tridimensionnelle compatible avec une activité biologique, elle doit être capable de se replier en une conformation appropriée ou de s'assembler avec d'autres protéines en un temps très court (Zhang *et al.*, 2002). Cette opération est rendue possible grâce à l'intervention de cofacteurs protéiques connus sous le nom de chaperons moléculaires. Ce terme désigne toute protéine intervenant pour aider d'autres protéines non natives à fin d'acquérir leurs conformations natives (Vabulas, 2010). Cette classe de protéines comprend des familles, hautement conservées à travers les espèces, qui ont un rôle crucial dans l'acquisition et le maintien de la conformation native des protéines (Grantcharova *et al.*, 2001). Leur mécanisme de base est qu'elles reconnaissent les protéines non natives en se liant aux chaînes

polypeptidiques naissantes ou dépliées à travers des acides aminés hydrophobes exposés. Elles préviennent, de ce fait, leur agrégation irréversible toxique pour la cellule (Zhang *et al.*, 2002). Par contre, elles ne semblent pas pouvoir interagir avec les protéines natives ou se lier à une chaîne totalement dépliée (Benhabilès *et al.*, 2000).

I.1.1. Classification des chaperons moléculaires

Les chaperons moléculaires sont subdivisés, selon leurs poids moléculaires, en six principales familles ayant chacune une fonction et une distribution cellulaire distinctes (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001). Il s'agit de Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 et la famille des petites Hsp. En dépit de leurs propriétés communes, chaque famille présente des particularités se rapportant à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire, leur dépendance à l'ATP comme substrat énergétique ou la nature inductible de leur expression.

I.1.1.1. La famille des Hsp110

Chez les mammifères, deux Hsp composent cette famille: Hsp105 et Hsp110. Ces deux chaperons possèdent des caractéristiques structurales très proches de celle des membres de la famille Hsp70, avec un domaine capable de lier et d'hydrolyser l'ATP. Chez la souris, l'expression des Hsp110 est constitutive dans tous les tissus de l'organisme avec une forte proportion dans le cerveau (Lee-Yoon, 1995). Son expression est fortement inductible lors d'un stress thermique et elle est par exemple transloquée dans le nucléole où elle va participer à la protection de l'assemblage des ribosomes lors d'un stress thermique. Elle est ainsi fortement impliquée dans la résistance à l'hyperthermie et agit comme chaperon moléculaire en agissant de concert avec d'autres Hsp (Oh *et al.*, 1997; Gibert, 2010).

I.1.1.2. La famille des Hsp 90

Cette famille est essentielle à la survie des cellules eucaryotes, Hsp90 est l'une des protéines les plus abondantes dans la cellule, puisqu'elle représente environ 1 % des protéines totales (Csermely *et al.*, 1998). Il s'agit d'une protéine globulaire constituée de trois principaux domaines fonctionnels: un domaine N-terminal conservé au sein des membres de la famille Hsp90 (Prodromou & Pearl., 2003). Ce domaine comprend la poche de liaison à l'ATP (Prodromou *et al.*, 1997). Un domaine central impliqué dans le recrutement des protéines clientes. Enfin, un domaine C-terminal responsable de la dimérisation de Hsp90

(Minami *et al.*, 1994). Il comprend également un deuxième site de fixation de l'ATP (Soti *et al.*, 2002).

Dans les conditions physiologiques, Hsp90 peut se lier à de nombreuses protéines dites clientes et former avec elles des complexes stables. Cette activité chaperon est régulée par des Co-chaperons (Lanneau, 2010), en formant des complexes, de façon ATP- dépendante, avec ses clientes, Hsp90 prévient leur agrégation. Il a été montré que des inhibiteurs directs ou allostériques de la liaison à l'ATP ou de son hydrolyse compromettent grandement cette fonction d'Hsp90 (Goetz *et al.*, 2003). Le cycle fonctionnel de Hsp 90 peut être décrit comme suit (Fig. 1): Le dimère d'Hsp90 a une conformation dite « ouverte » qui expose des résidus hydrophobes du domaine central au solvant, permettant ainsi de lier ses substrats. La fixation de l'ATP sur le domaine N-terminal induit, par la suite, des changements conformationnels aboutissant à son rabattement en conformation « fermée » ce qui piège la protéine substrat. L'hydrolyse d'ATP qui s'en suit induit d'autres changements conformationnels qui stabilisent la protéine cliente. Ce mode de fonctionnement rappelle l'action d'une pince constituée par les deux monomères d'Hsp90 (Pearl & Prodromou, 2006).

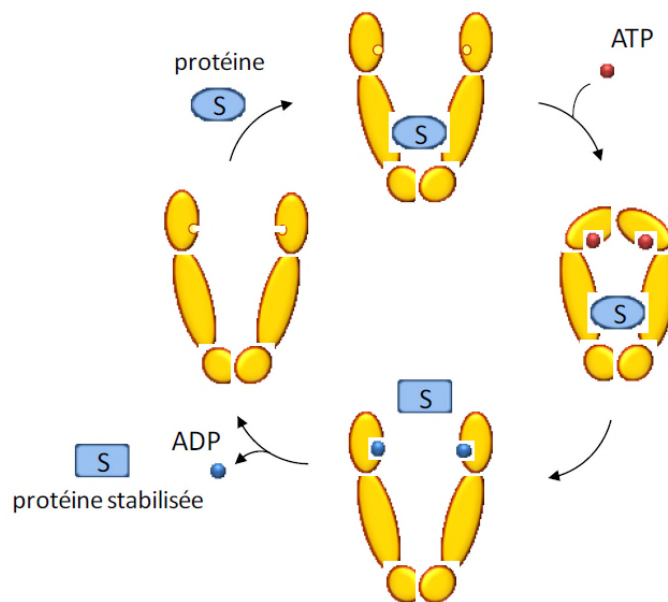


Figure1 : Modèle de l'activité chaperon d'Hsp90. Le dimère vacant est en conformation ouverte et peut lier une protéine substrat. La fixation d'ATP par le domaine N-terminal induit des changements conformationnels qui permettent de maintenir et protéger le substrat. L'hydrolyse de l'ATP induit le passage de la conformation fermée à la conformation initiale ce qui provoque la libération du substrat (s) (Maurel, 2011).

I.1.1.3. La famille des Hsp 70

Les Hsps de 70 kDa représentent une famille qui comprend différents membres présentant un haut degré d'identité de séquence inter et intra-espèce (50% d'homologie entre le gène humain HSP70 et son homologue *DnaK* chez *E.coli* (Escherichia Coli), et plus de 70% avec celui de la drosophile) (Hunt & Morimoto, 1985). La famille Hsp70 est représentée au minimum par cinq protéines chez les mammifères. Certaines étant exprimées constitutivement alors que d'autres sont strictement inductibles. Toutes possèdent une structure commune qui contient deux domaines: une extrémité N-terminale hautement conservée dotée d'une activité ATPase et une extrémité C-terminale moins conservée permettant de fixer des peptides (Fig. 2). Les protéines de la famille Hsp70 ont en commun une fonction de chaperon moléculaire; ils lient transitoirement des protéines immatures ou dénaturées afin d'éviter qu'elles n'interagissent, entre elles ou avec d'autres composants cellulaires, de manière inappropriée et évitant de la sorte une mauvaise conformation, une agrégation ou une perte de fonction. Elles peuvent lier, par leur extrémité C-terminale, des segments courts et linéaires de peptides ou de protéines non repliés (Feige & Polla, 1994). Le cycle ATPasique des Hsp70 se fait selon le schéma réactionnel suivant: les polypeptides interagissent transitoirement avec le domaine de liaison aux peptides de Hsp70, ce qui stimule l'hydrolyse de l'ATP et mène à un changement de conformation de Hsp70, augmentant son affinité pour le peptide. Ensuite, le peptide lié est relâché à la suite de l'échange de l'ADP avec une nouvelle molécule d'ATP (McCarty *et al.*, 1995). Ces interactions sont observées transitoirement de 15 à 30 minutes après la synthèse d'une nouvelle protéine (Maurel, 2011).

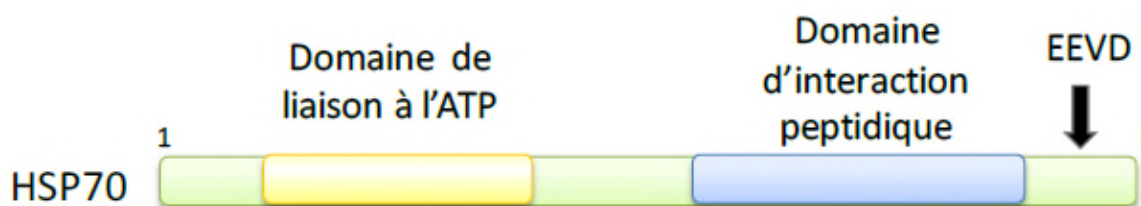


Figure 2: Structures de HSP70, comporte deux domaines principaux un domaine de liaison à l'ATP ABD (ATP Binding Domain) et Un domaine d'interaction peptidique PBD(Peptide Binding Domain) en c-terminal riches en glycines et prolines comprenant un motif EEVD permettant la liaison avec d'autres protéines Co-chaperons (domaine TPR(Tetratricopeptide Repeat)) (Lanneau, 2010).

I.1.1.4. Les petites Hsp

Les protéines de choc thermique de faible masse moléculaire (sHsps) forment une famille présente dans tous les organismes vivants, dont les représentants et les niveaux d'expression varient d'une espèce à une autre. La famille des sHsps est celle qui présente la plus grande hétérogénéité de structures parmi les différentes classes de Hsps. Les membres appartenant à cette famille présentent une faible homologie de séquence (Kappe *et al.*, 2002). Elles sont cependant caractérisées par la présence d'une séquence commune d'une centaine d'acides aminés appelée domaine α -cristallin. Il s'agit d'une séquence initialement observée chez les protéines du cristallin de l'œil des mammifères. En dépit de la haute variabilité tant en taille qu'en séquence des sHsps, le domaine α -cristallin est très conservé au sein de cette famille (Ingolia & Craig, 1982). Cette caractéristique a permis d'identifier les derniers membres de la famille des sHsps humaines, qui sont actuellement au nombre de dix (Maurel, 2011).

Les sHsps partagent deux principales caractéristiques biochimiques; Elles sont capables de s'oligomériser pour former de larges complexes, dont le poids moléculaire atteint jusqu'à 800 kDa. L'interaction entre les domaines α -cristallins de deux unités forme un dimère, qui constitue la structure basique des complexes oligomériques. De plus, elles sont fortement sujettes à une modification post-traductionnelle, la phosphorylation, qui régule leur capacité à s'oligomériser, et par là, leur fonction biologique (Arrigo & Pauli, 1988; Bruey *et al.*, 2000). Les sHsps contribuent à la résistance au choc thermique (Landry *et al.*, 1989) ainsi qu'à de nombreux autres stress, notamment des agents anticancéreux, jouant ainsi un rôle fondamental dans la survie cellulaire (Garrido *et al.*, 1996; Garrido *et al.*, 1997). Elles remplissent également la fonction de chaperon moléculaire, tout comme les autres classes d'Hsp précédemment décrites (Horwitz *et al.*, 1992 ; Jakob *et al.*, 1993). Les sHsps assemblées en gros complexes de structure glomérulaire peuvent lier les protéines non natives avec une haute affinité et les maintenir dans un état compétent pour le repliement ; il semble que d'autres Hsps interviennent alors afin d'assister le repliement (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). Contrairement aux autres Hsps, les sHsps opèrent sans recours direct à l'hydrolyse d'ATP (Lanneau, 2010).

I.1.1.5. La famille des Hsp 60

Les protéines de choc thermique de 60 kDa ont d'abord été identifiées chez la bactérie, sous le nom de GroEL, comme étant des protéines nécessaires à la croissance et à la morphogénèse de la bactérie elle-même et à celles des bactériophages lambda et T4. Chez les plantes, une protéine homologue a ensuite été identifiée dans le chloroplaste. Cette dernière est requise pour l'assemblage correct des sous-unités de l'enzyme Rubisco (Ribulose bi phosphate carboxylase mono oxygenase). De par leur rôle dans le repliement et l'assemblage de protéines complexes, les membres de la famille Hsp60 ont été les premiers associés au terme de « chaperons moléculaires » et sont connues sous le nom des chaperonines (Réty, 2011).

II. Les chaperonines

Les chaperonines ont été identifiées en 1988 comme étant un groupe spécifique des chaperons et représentent une similitude en leurs séquences et en leurs propriétés cependant ont identifié GroEL (Growth E-coli Large protein) chez les procaryotes chez *E. Coli*, Rubisco dans les chloroplastes chez les plantes et Hsp60 dans les mitochondries (Ellis, 1990; Hartl, 1996). Les chaperonines thermosomes des archaebactéries, et la CCT des eucaryotes ont été identifiées après GroEL (Valpuesta *et al.*, 2005).

Les chaperonines sont des complexes protéiques oligomériques cylindriques constituées de deux anneaux superposés délimitant une cavité centrale. Chaque anneau est composé de sept à neuf sous-unités. Les chaperonines se subdivisent en deux groupes distincts (I et II) selon leur homologie structurale. Le groupe I est retrouvé dans tous les organelles des eubactéries et endosymbiotiques comme les mitochondrie, les chloroplastes et dans les organelles en apparentés comme les hydrogénosomes et les mitosomes. Les chaperonines de groupe II sont quant à elles présentes chez les archaebactéries et dans le cytosol des cellules eucaryotes (Kabir *et al.*, 2011)

Les chaperonines du groupe I sont caractérisées par des anneaux composés chacun de sept sous-unités identiques. Chaque sous unité a une topologie à trois domaines: un domaine équatorial qui comprend les résidus de contact inter anneaux et un site de fixation des nucléotides. Un domaine apical qui comprend de sites de liaison et de reconnaissance des substrats et d'effecteurs. Enfin d'un domaine intermédiaire dit charnière qui transmet la communication allostérique entre les domaines équatoriaux et apicaux. Chez *E. coli*, les chaperonines sont représentées par GroEL qu'est un complexe de 14 sous-unités. Elle

encapsule le polypeptide dans sa cavité centrale dite «cage d'Anfinsen» et qui est recouverte, par la suite, par le cofacteur heptamérique GroES (Growth E-coli small protein) (Fig. 3). Le complexe GroEL-GroES n'associe pas aux ribosomes et n'intervient qu'à des stades tardifs du repliement (Apetri & Horwich, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2009; Horwich *et al.*, 2009, 2012).

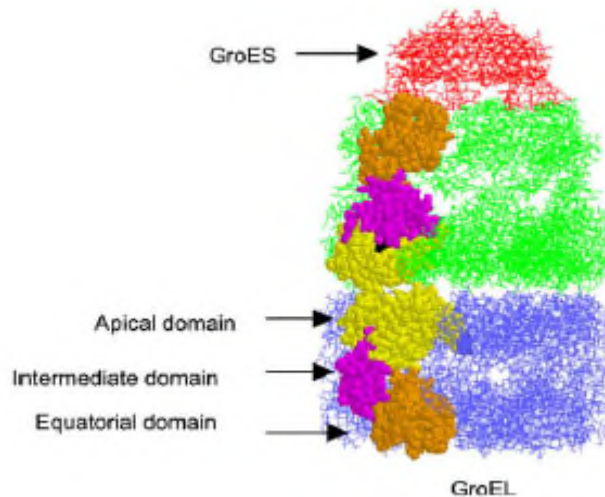


Figure 3: la structure de complexe GroEL/GroES. Les deux anneaux de GroEL sont colorés individuellement, l'anneau supérieur en vert et l'anneau inférieur en bleu, et le Co-chaperon GroES est indiqué en rouge. Les domaines composant chaque sous-unité de GroEL sont indiqués dans chaque anneau le domaine apical est indiqué en jaune le domaine intermédiaire est indiqué en violet et le domaine équatorial en marron (Chaudhuri *et al.*, 2009)

Le deuxième groupe de chaperonines est caractérisé par une symétrie d'ordres 8 ou 9. Ils sont retrouvés chez les Archea (thermosome et TF55) et dans le cytosol des cellules eucaryotes (CCT/TriC). Comme toutes les chaperonines, les membres du groupe II sont constitués par deux anneaux identiques empilés délimitant une cavité centrale appelée chambre de repliement. Dans le cas du thermosome, chaque anneau est constitué, selon l'espèce, soit par l'alternance de deux type de sous-unités α et β ou par la répétition de la même sous-unité (Knapp *et al.*, 1994; Waldmann *et al.*, 1995; Archibald *et al.*, 2001). L'anneau de TF55 est quant à lui composé par l'alignement alternatif de neuf sous-unités α et β (Valpuesta *et al.*, 2002).

II.1. La chaperonine cytoplasmique CCT

La Chaperonine Cytoplasmique contenant le complexe testiculaire 1 CCT nommée aussi TriC (Frydman *et al.*, 1992) ou c-cpn (Gao *et al.*, 1992), est un chaperon moléculaire essentiel pour la croissance cellulaire. La CCT assiste le repliement des protéines dans le

cytosol des cellules eucaryote (Archibald *et al.*, 2001). Comme son nom l'indique, la CCT contient la sous-unité α qui n'est autre que le complexe t polypeptide-1 abondamment exprimée dans les cellules germinales testiculaires et au stade précoce de la pré-implantation embryonnaire (Silver *et al.*, 1979).

II.1.1. Structure de CCT

Chaque annaux du complexe CCT compte huit sous-unités différentes notées CCT α (ou TCP-1), β , γ , δ , ϵ , ζ , η et θ , de poids moléculaires allant de 52 à 65 kDa avec un nombre d'acides aminés compris entre 531 et 556. les sous- unités de la CCT sont arrangées dans un anneau dans le sens horaire suivant : α , ϵ , ζ , β , γ , θ , δ et η (Liou & Willison, 1997; Dekker *et al.*, 2011; Kabir *et al.*, 2011; Leitner *et al.*, 2012;) (Fig.4).

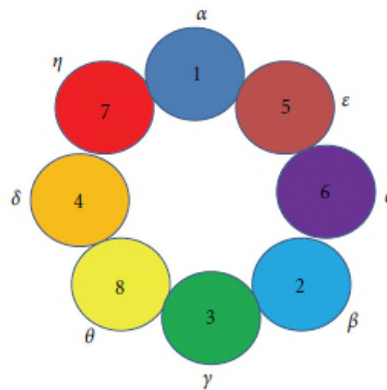


Figure 4: La représentation schématique de la structure de la CCT et l'orientation de ses sous-unités qui est dans le sens horaire selon le model proposé par Liou et Willison en 1997 (Kabir *et al.*, 2011).

La structure atomique de la CCT révèle que ses sous unités ont une architecture commune; elles sont constituées de trois domaines structuraux: apical, intermédiaire et équatorial (Fig. 5) (Pappenberger *et al.*, 2002; Spiess *et al.*, 2004).

1. Le domaine équatorial

Ce domaine est le plus conservé et le plus étendu des trois domaines. Il assure la plupart des interactions intra et inter anneau et comprend le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP (Archibald *et al.*, 2001).

2. Le domaine intermédiaire

Celui-ci relie le domaine équatorial au domaine apical à la façon d'une charnière amovible. Il permet le mouvement du domaine apical en préservant le domaine équatorial (Roseman *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Llorca *et al.*, 1997).

3. Le domaine apical

Le domaine apical est constitué d'un noyau globulaire et d'une saillie hélicoïdale. Il est considéré comme le premier couvercle de la chaperonine. Il englobe l'ouverture des anneaux et comprend tout les résidus hydrophobes nécessaires à la reconnaissance, la liaison et la libération des protéines substrats. Ces séquences sont les moins conservées dans les organismes eucaryotes (Kim *et al.*, 1994; Archibald *et al.*, 2000; Neirynek *et al.*, 2004). Des résidus invariables dits de « signature » occupent des positions particulières à la face interne du domaine apical et juste au dessous de la saillie hélicoïdale. Significativement c'est la région du domaine apical qui semble avoir un contact avec l'actine et la tubuline (Llorca *et al.*, 1999,2000). La saillie hélicoïdale joue un rôle dans la fermeture de la cavité de la CCT qui s'ouvre lorsque l'ATP se lie. Certains résidus situés à sa partie N-terminale peuvent servir comme charnière flexible permettant divers interactions inter-sous-unités au cours des différents étapes du cycle fonctionnel de la CCT mais aussi assurent la liaison de substrats spécifiques (Bosh *et al.*, 2000; Gutsch *et al.*, 1999; Neirynek *et al.*, 2004)

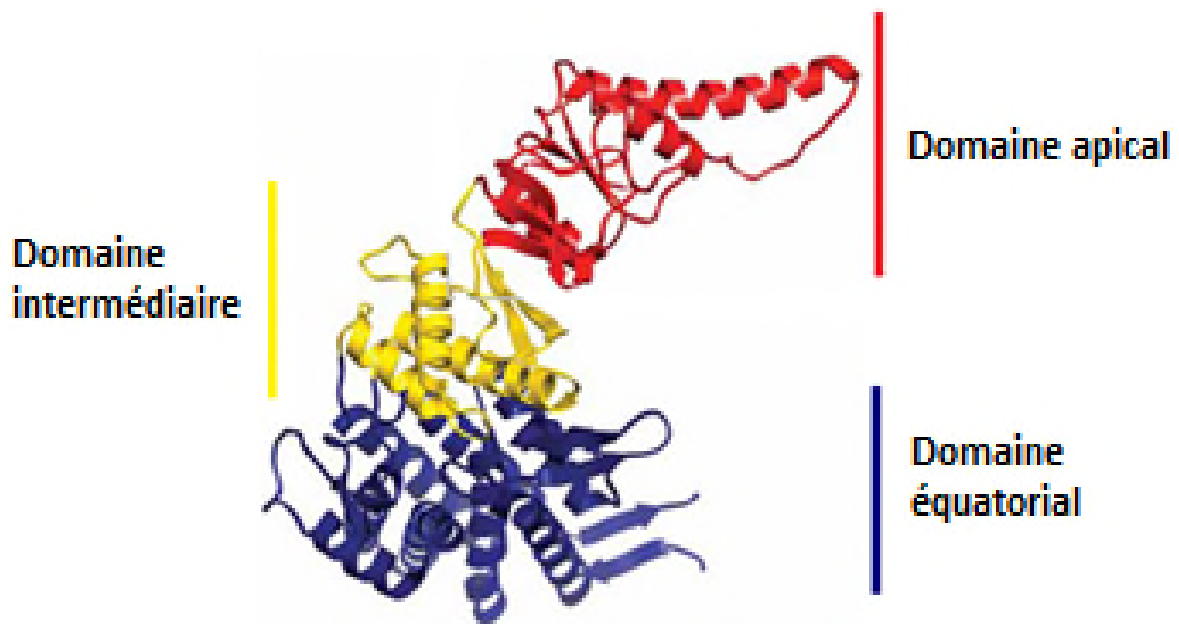


Figure 5: Structure atomique d'une sous-unité de la CCT illustrant ses trois domaines. Le domaine apical est en rouge, le domaine intermédiaire en jaune et le domaine équatorial en bleu. (Speiss *et al.*, 2004)

II.1.2. Le mécanisme réactionnel de la CCT

Le processus de repliement des protéines dénaturées ou mal repliées assuré par la CCT est dépendant de la présence de l'ATP. L'affinité de la CCT pour les protéines cibles dépend de la présence de l'ATP ou de l'ADP; le complexe ATP-CCT a moins d'affinité pour ces protéines là que le complexe ADP-CCT. Le passage d'une forme à l'autre est régulé par l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Le repliement d'une protéine se fait alors selon le schéma réactionnel minimal suivant: La CCT lie les protéines au niveau des domaines apicaux ce qui engendre un changement de conformation permettant l'ouverture des anneaux et l'encapsulation de ces dernières ce qui permet le repliement du polypeptide par un mécanisme mal connu et requière sa forme normal (Fig. 6). L'hydrolyse de l'ATP en ADP régénère le complexe ADP-CCT qui peut intégrer à nouveau un autre cycle de repliement (Melki *et al.*, 1997).

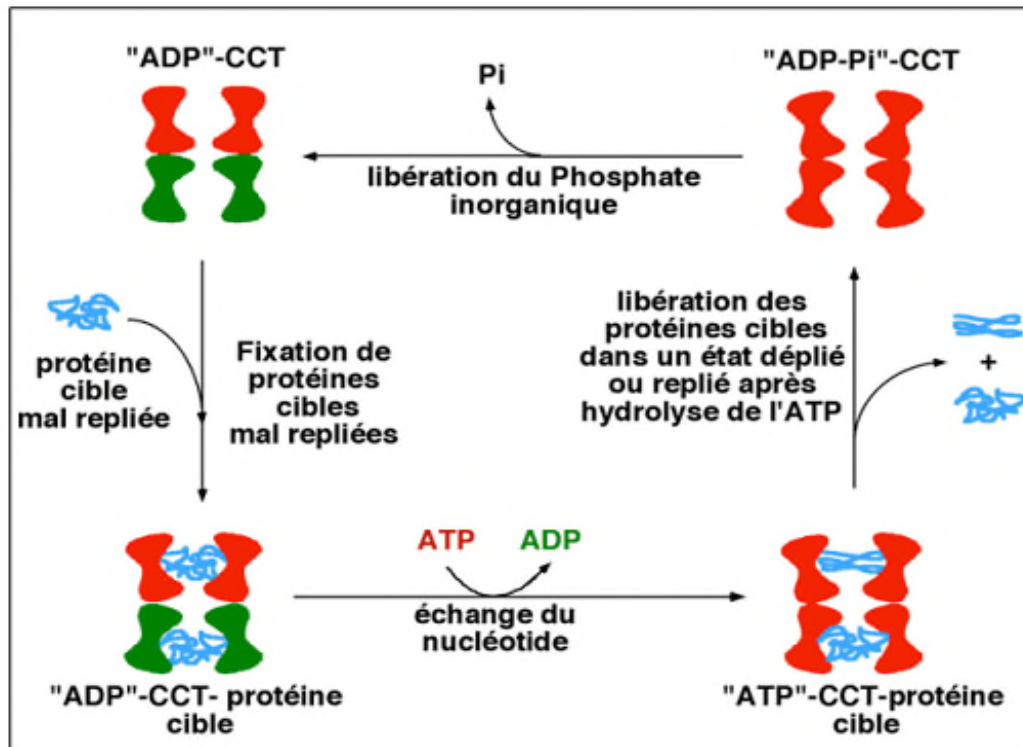


Figure 6: Cette figure montre un modèle hypothétique pour le mécanisme de repliement de protéines possédant un domaine C-terminale dépendant de CCT(TRiC).Le repliement de 3domaine N-terminale indépendant de TRiC(CCT) est Co-translationnelle qui est probablement aidé par le ribosome associé au chaperon ou au Hsp70. Le polypeptide non natif qui contient le C-terminal dépendant de CCT (TRiC) est transféré vers cette dernière avec l'hydrolyse de l'ATP en ADP .Ensuite l'encapsulation du polypeptide et son repliement dans un environnement physique spécial dans la cavité de la CCT(TRiC), toutefois l'ouverture de la cavité et libération du polypeptide natif et du Pi à partir de sous-unités du CCT et la reformation du complexe ADP-CCT qui peut intégrer à nouveau un autre cycle e repliement (Melki *et al.*, 1997).

II.1.3. Mécanisme allostérique de la CCT

L'hydrolyse de l'ATP par la CCT à différentes concentrations montre une transition allostérique qui se traduit par deux coopérativités; une coopérativité positive intra-anneau et une coopérativité négative inter-anneau (Yifrach & Horowitz, 1995; Kafri *et al.*, 2001; Kafri & Horowitz, 2003). Cette coopérativité induit la production d'une particule asymétrique dont les anneaux ont une conformation légèrement différente (Leroux & Hartl, 2000) qui empêche la liaison de l'ATP dans l'anneau opposé en engendrant un mouvement important dans les domaines apicaux et équatoriaux (Llorca *et al.*, 1999). En absence d'ATP, les deux anneaux de la CCT présentent une forme et une taille équivalentes

mais en présence d'ATP un anneau devient plus fermé tandis que l'autre plus ouvert à l'ouverture du cylindre (Kubota, 2002).

II.1.4. Les substrats de la CCT

La CCT à l'opposé de son homologue bactérien GroEL est composée de différentes sous unités. Cette hétérogénéité réside dans leurs domaines apicaux qui comportent un site de liaison aux substrats (Kim *et al* 1994). Des études biochimiques suggèrent que chaque sous unité contribue à la reconnaissance de motifs spécifiques au niveau de chaque substrats de la CCT et possède des sites de liaisons uniquement pour les motifs polaires de certaines protéines cellulaires (Feldman *et al.*, 1999; Llorca *et al.*, 2000; Hynes & Willison, 2000; McCormack, 2001). Cependant des expériences ont montré que la CCT interagit avec ces substrats via des régions bien définies (Kabir *et al.*, 2011). De ce fait, il a été dressé une liste de substrats physiologiques que la CCT reconnaît par divers mécanismes impliquant des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Parmi ces substrats, on retrouve principalement les protéines du cytosquelette actines et tubulines, le suppresseur de tumeur de VHL et de nombreuses autres protéines telle que la luciférase (Frydman *et al.*, 1994), l' α -transducine (Farr *et al.*, 1997), la cycline E (Won *et al.*, 1998), et la myosine (Hynes & Willison, 2000; Rommelaere *et al.*, 1999).

II.5. But du travail

Le but de ce travail est de s'initier aux techniques de base dans l'étude des protéines à savoir la chromatographie échangeuse d'ions, l'électrophorèse en condition dénaturantes, le dosage des protéines par méthodes spectrophotométriques et colorimétriques ainsi qu'à la manipulation et à la préparation de différents types de tampons et solution en passant par l'utilisation du petit matériel de laboratoire (pH-mètre, centrifugeuse, spectrophotomètre, balance,..etc.). De même que l'un des objectifs de ce travail est d'apprendre à optimiser et à adapter un protocole expérimental selon les moyens disponibles au laboratoire ainsi qu'aux conditions.

Nous avons pour cela choisi de purifier un chaperon moléculaire, la chaperonine cytoplasmique CCT, très abondante dans les cellules eucaryotes qu'elles soient soumises à un stress ou pas (non inductible par le stress) à partir de deux sources ; le lysat de réticulocytes de lapins et le foie de mouton. Pour cela nous avons quelques peu adapté le protocole de purification en fonction des moyens mis à notre disposition. Nous avons par exemple adapté le volume des colonnes pour de faibles volumes d'échantillons et sans apport de pression car nous ne disposons pas de colonnes pour la chromatographie et pas de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), ce qui nous a obligé à contrôler tous les paramètres de purification de façon manuelle (débit de la colonne, mesure des densités optiques, mesure des volumes des fractions et des tampons,...etc.).

I. Le matériel biologique

I.1. Le foie

Le foie est un organe qui a un rôle crucial pour le fonctionnement de l'organisme. Il est en état de stress permanent car il aide le sang à éliminer les déchets et les toxines. Dans le foie les acides aminés, venant de la décomposition des protéines sont désaminés: l'azote sera ainsi utilisé par l'organisme. Le foie peut également utiliser cet azote pour fabriquer de nouvelles protéines à partir des glucides ou des lipides (Encarta, 2009). Cependant les protéines néo-synthétisées nécessitent l'intervention de chaperons moléculaires tel que la CCT; de ce fait on a estimé qu'il est riche en CCT et on l'a choisi comme source d'extraction de cette dernière.

I.2. Le lysat de réticulocytes de lapins

Les réticulocytes sont les cellules sanguines qui précèdent le stade d'érythrocytes dans l'érythropoïèse. Elles sont produites par la moelle osseuse par un mécanisme de différenciation de cellules souches appelées érythroblastes. Dans les réticulocytes, la synthèse des protéines est accrue en particulier celle des actines et tubulines (substrats obligatoires de la CCT). Rajoutez à cela le fait qu'au moins 10% des protéines néosynthétisées doivent interagir avec la chaperonine CCT pour acquérir leurs conformations natives. Ces deux raisons font que les réticulocytes sont une source abondante de chaperonine CCT.

Les lapins sont des animaux qui, d'une part, répondent bien au traitement inducteur de réticulocytes et d'autre part, sont source d'une quantité importante de sang par rapport à d'autres animaux de laboratoire (souris, rats, cobayes).

La chaperonine CCT étant une foldase exclusivement cytoplasmique, nous avons utilisé les lysats de réticulocytes plutôt que les réticulocytes entiers comme source de CCT.

Le lysat de réticulocytes de lapins que nous avons utilisé au cours de notre étude a été préparé en 2007 par deux groupes d'étudiantes de fin de cycle (Boucheffa & Boufedech, ; Mameche & Hami) selon le protocole de Hunt *et al.*, 1972 modifié. Ils ont par la suite été conservés dans du glycérol à -20°C.

II. Extraction de la chaperonine CCT

II.1. À partir d'un fragment de foie

Nous avons prélevé un fragment de foie d'environ 5g d'un mouton adulte qui venait juste d'être égorgé au niveau de l'abattoir communal de Bejaia. Qui a été immédiatement placé dans une boîte contenant de la glace. Arrivé au laboratoire, ensuite avons procédé à son broyage manuel à l'aide d'un mortier dans 4 ml de tampon de lyse ($T_{10}E_1$, EGTA). À la fin de l'opération, on a ajusté en magnésium et en pH le broyat dans du tampon d'ajustement (Tris HCl pH7,5; $MgCl_2$) puis les débris tissulaires sont éliminés par filtration sur papier. Toute fois les filtrats sont clarifiés des débris cellulaires par centrifugation à basse vitesse (environ 1200x g) pendant 10 minutes. Enfin le surnageant qui constitue notre extrait brut, les avons aliquoté dans des tubes de 1,5 ml puis les conservé à $-20^{\circ}C$.

II.2. Préparation des lysats de réticulocytes

La vérification au microscope photonique, a révélé que la lyse des réticulocytes de lapins n'était pas complète. Ce qui nous amené à une seconde lyse cellulaire par choc hypotonique dans du tampon de lyse. Une centrifugation à basse vitesse a permis l'élimination des débris cellulaires, et des autres cellules sanguines, en particulier des globules blancs riches en protéases. Comme pour le foie, le surnageant a été récupéré et conservé dans des tubes de 1,5 ml à $-20^{\circ}C$.

II.3. Purification de la chaperonine CCT par chromatographie échangeuse d'anion

Pour cette partie du travail, nous avons appliqué le protocole de Gao *et al.*, 1992 modifié. La modification porte en premier lieu sur le type de montage de la colonne de chromatographie. En effet, la colonne échangeuse d'ion n'a été pas soumise à l'effet de la pression dans une FPLC mais nos fractions sont juste récupérées par effet de gravité. Dans un second temps, notre protocole de purification c'est résumé à la chromatographie échangeuse d'ion en omettant le gel filtration et chromatographie d'affinité.

La résine échangeuse d'anions qui a été utilisé pour la purification de la chaperonine CCT est Q-Sepharose® (GE Healthcare). Cette résine comporte l'ion ammonium quaternaire

R_4N^+ (désigné par la lettre Q) qui est un atome d'azote portant une charge positive et dont les 4 valences sont occupées chacune par un radical R. L'ammonium quaternaire est un échangeur fort issu d'une base ou d'un acide fort qui est donc tout le temps ionisé et interagit avec les charges négatives des acides aminés (Kamoun *et al.*, 2003)

II.3.1. Préparation des colonnes

Avant de remplir les colonnes, la résine Q-Sepharose® a été lavé avec de l'eau distillée afin de la débarrassée de toute trace d'éthanol qui a servi à sa conservation à 4°C, et ce à plusieurs reprises. Les deux mini-colonnes sont placées verticalement, sur deux potences (l'une pour le foie et l'autre pour le lysat de réticulocytes de lapins), de 5 ml chacune. Le fond des colonnes a été tapissé d'une fine couche de laine de verre afin d'éviter les fuites de résine. Nous avons par la suite procédé au remplissage des colonnes avec 5 ml de la résine échangeuse d'anions lavée à l'aide d'une pipette Pasteur. Une fois compactée, elle a subit un équilibrage en ions et pH dans les deux colonnes dans du tampon A (TrisHCl pH 7,2; EGTA, $MgCl_2$ 0,02M, KCl) et ce en faisant passé 3 volumes de colonnes (15 ml). En suite le chargement des échantillons.

II.3.2. Chargement des échantillons

Après avoir équilibré la résine, nous avons déposé en haut de chaque colonne 50 μ l d'extrait brute correspondant (de foie ou de lysat réticulocytes de lapins) et ont été laissé environ 3minute le temps de se propager le long de la résine. Par la suite un lavage avec 3 volumes de résine de tampon A a été effectué afin d'éliminer toutes les protéines qui ne se sont pas accrochées à la résine. Et les fractions de lavage sont récupérées en sortie de colonne à raison de 500 μ l par tube puis avons procédé à l'éluion des protéines accrochées à l'échangeur d'ions, et avons suivie les variations de densité optique à 280 nm.

II.3.3. Elution

L'éluion des protéines acides a été réalisée à l'aide d'un gradient de $MgCl_2$ allant de 0,02 à 0,5 M et ce en faisant passé dans les colonnes 5 volumes de tampon B (TrisHCl pH7,2; EGTA, $MgCl_2$ 0,5M, KCl). Au fur et à mesure récupéré des fractions de 500 μ l sont récupérées et leurs densités optiques sont mesurées à 280 nm.

À la fin de l'éluion (densités optiques stables), la résine Q-Sepharose® a été lavé successivement avec de l'eau distillée, du tampon B puis du tampon A, puis a été remise au réfrigérateur en vue d'une proche réutilisation.

II.3.4 Dosage des protéines totales

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines, parmi lesquelles celle décrite par Bradford en 1976 et que nous avons choisi d'appliquer. Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250, en milieu éthanolique acide, sur des acides aminés basiques à travers des liaisons ioniques et sur des acides aminés hydrophobes à travers des interactions hydrophobes. Le sérum albumine bovine (BSA) se colorant de façon beaucoup plus intense que les autres protéines, nous avons opté pour l'utiliser comme étalon (Gavrilovic *et al.*, 1996).

Pour estimer la concentration en protéines totales dans les fractions de chromatographie sélectionnées, en premier lieu une gamme de BSA a été préparé dont les concentrations varient de 0.5 à 15g/l à partir d'une solution mère à 30g/l comme l'indique le tableau I

Tableau I : Gamme de BSA

Concentration en BSA g/l	0	0,5	1,5	5	10	15
solution de BSA (ml)	0	0,166	0,33	1,66	3,33	5
Eau distillée (ml)	10	9,83	9,67	8,34	6,67	5

De chacune de ces solutions des quantités 2 ml sont prélevées et sont mélangées avec 5 ml de réactif de Bradford (Bleue de coomassie, acide phosphorique, éthanol) puis leurs densités optiques sont mesurées à 465nm. Les résultats que nous avons obtenu nous ont servi à tracer une droite d'étalonnage dont l'équation de type $y = ax + b$ a été servi à son tour à calculer les concentrations des fractions.

En plus des extraits bruts, pour le dosage de Bradford, quelques fractions collectées correspondants aux pics des chromatogrammes ont été sélectionné. Pour le foie, l'extrait brut ainsi que les fractions ont été dilué 50 fois dans de l'eau distillée. Pour le lysat de réticulocytes de lapins, la dilution s'est faite au centième. De chacune de ces dilutions 2 ml

sont prélevés et sont mélangés avec 5 ml de réactif de Bradford. Et immédiatement leurs densités optiques ont été mesurées à 465 nm puis le calcul de leurs concentrations en protéines totales en comparant à la droite d'étalonnage.

II.4. Évaluation de la pureté par électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE à 12 %

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel sous l'influence d'un champ électrique permettant ainsi leur séparation. Cette étape a été réalisée selon le protocole décrit par Ulrich Laemmeli en 1970 (Laemmeli, 1970). Pour se faire, nous avons suivi les étapes suivantes :

II.4.1. Dénaturation des échantillons

Les fractions ont été dénaturées dans des tubes 2 ml en présence du tampon de dénaturation contenant notamment un détergent anionique (SDS) (Tris-HCl 0,125M, SDS 4%, glycérol 20%, β -mércaptoéthanol 4%, bleue de bromophénol 0,002%) à raison de 45 μ l de tampon de dénaturation pour 5 μ l de fraction de foie et 57 μ l de tampon dénaturant pour 3 μ l de fraction de lysat de réticulocytes de lapins. Les mélanges sont ensuite chauffés à 100°C dans un bain-Marie pendant environ 10 minutes.

II.4.2. Préparation des gels

a). Le gel de séparation à 12 %

Pour la préparation de ce gel nous avons utilisé les produits indiqués dans le tableau II.

Tableau II: La composition de gel de séparation.

Acrymalide/bisacrylamide (30%/0,8%) (annexe I)	2,5 ml
Tampon de séparation (annexe VI.2)	5,2 ml
Eau distillée	4,9 ml
Ammonium persulfate (APS)	80 μ l
TEMED	20 μ l

Après avoir bien mélangé la solution, elle a été ensuite versée entre les deux plaques suivie par quelques gouttes de l'éthanol pour la linéarité de la surface du gel.

b). Gel de concentration

La composition de ce gel est indiquée dans le tableau III.

Tableau III: Composition du gel de concentration.

Acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%)	2,5 ml
Tampon de concentration (annexe VI.2)	2,5 ml
Eau distillée	4,9ml
Ammonium persulfate (APS)	100 μ l
TEMED	10 μ l

Après la polymérisation du gel de séparation, nous nous sommes débarrassé de l'éthanol puis avons coulé le gel de concentration. Immédiatement après, les peignes ont été placés entre les plaques. Après polymérisation du gel de concentration, les peignes sont retirés délicatement.

c). Dépôt des échantillons et migration

Dans les puits des gels sont déposées les quantités suivantes 7 μ l de protéines de références aux poids moléculaires connues (BioRad®) et 20 μ l de chaque fraction sélectionnées issue de la purification à partir du foie de mouton ou du lysat de réticulocytes de lapins.

Une fois le dépôt des échantillons terminé, la cuve d'électrophorèse a été remplie avec le tampon de migration (Tris 0,025M, glycine 0,192M, SDS 0,1%). Nous avons alors refermé la cuve, placé les électrodes et réglé le générateur sur 80 Volt les 20 premières minutes puis sur 140 Volt pendant 1h13min (jusqu'à ce que le front de Bleu de bromophénol atteigne le bord du gel).

d). Coloration et décoloration des gels

A la fin de la migration, les gels ont été fixés dans la solution de décoloration (acide acétique 5%, éthanol 50%, bleu de coomassie R250) pendant quelques minutes puis placés dans la solution de coloration (acide acétique 3%, éthanol 40%) pendant environ 40 minutes

sous agitation. Enfin les gels sont décolorés dans la solution de décoloration jusqu'à ce que les bandes soient bien visibles.

I. La purification de la CCT

Pour purifier la chaperonine cytoplasmique CCT, nous avons utilisé une résine échangeuse d'anions la Q-Sepharose®. La CCT ayant un pHi global d'environ 6,1 (Kubota *et al.*, 1994), elle comporte donc une charge négative à pH 7,2 (pH recommandé par le protocole de Gao *et al.*, 1992 pour réaliser cette chromatographie).

Dans un premier temps, le lavage de la résine a permis d'éliminer des molécules non chargées et celles qui portent des charges positives des extraits bruts. C'est par exemple le cas de l'hémoglobine qui constitue la protéine majoritaire dans le lysat de réticulocytes de lapins et dont le pHi est aux environs de 6,9.

Dans un second temps, l'élution avec le tampon B riche en ions chlorure (Cl^-) permet de détacher les protéines liées en interagissant avec le groupement alkyle ammonium quaternaire (RN_4^+).

I.1. Analyse du chromatogramme de purification de la CCT à partir de l'extrait de foie:

Sur le graphe en figure 8, nous avons retranscrit les densités optiques à 280 nm des fractions recueillies en sortie de colonne à partir du lavage à l'aide du logiciel aspect plus. L'élution des protéines s'est faite grâce au gradient de concentrations de MgCl_2 qui s'est créé en faisant passer successivement dans la colonne du tampon A puis du tampon B. Le chromatogramme que nous avons obtenu a le profil caractéristique de la purification de la CCT marqué par deux pics successifs; le premier correspond, au fait, à un chevauchement de deux pics: l'un dû à l'élimination des protéines non fixées sur la résine et l'autre à l'élution des protéines liées à la résine. Le second pic qui apparaît plus tardivement correspond probablement aux acides nucléiques qui à pH 7,2 portent des charges négatives.

I.2. Analyse du chromatogramme de purification de la CCT à partir du lysat de réticulocytes de lapins:

Pour le lysat de réticulocytes de lapins, les résultats de la purification de la CCT sont retranscrits dans le chromatogramme en figure. 7. Ici nous remarquons que le profil est différent de celui que l'on a obtenu sur l'extrait de foie de mouton. En effet, sur ce chromatogramme nous constatons la présence d'un pic majeur à partir de la fraction 10 qui est vraisemblablement dû à l'élution des protéines liées à la résine et l'absence du pic tardif. Ceci peut être expliqué par le fait que les réticulocytes sont des cellules anucléés qui possèdent

quelques résidus d'ARN. De plus, le lysat a été débarrassé de la principale source d'acides nucléiques à savoir les globules blancs par centrifugation.

II. Évaluation des quantités de protéines purifiées

Nous avons dosé les protéines des extraits brutes ainsi que des fractions supposées pures par la méthode de Bradford en utilisant l'équation d'une droite d'étalonnage de BSA. Les résultats indiquent que nous avons récupéré des quantités appréciables de protéines comme le montrent les tableaux ci-dessous et que la chromatographie échangeuse d'anion que nous avons réalisée nous a permis d'obtenir des fractions concentrées notamment celles extraites du foie.

Tableau III: résultats du dosage des protéines totales sur quelques fractions du lysat de réticulocytes de lapins

Fraction	Extrait brut	F11	F12	F14
Concentration en protéines mg/ml	48	22	21	22

Tableau IV: résultats du dosage des protéines totales sur quelques fractions de l'extrait de foie de mouton

Fraction	Extrait brut	F14	F15	F24
Concentration en protéines mg/ml	80	93	36	92

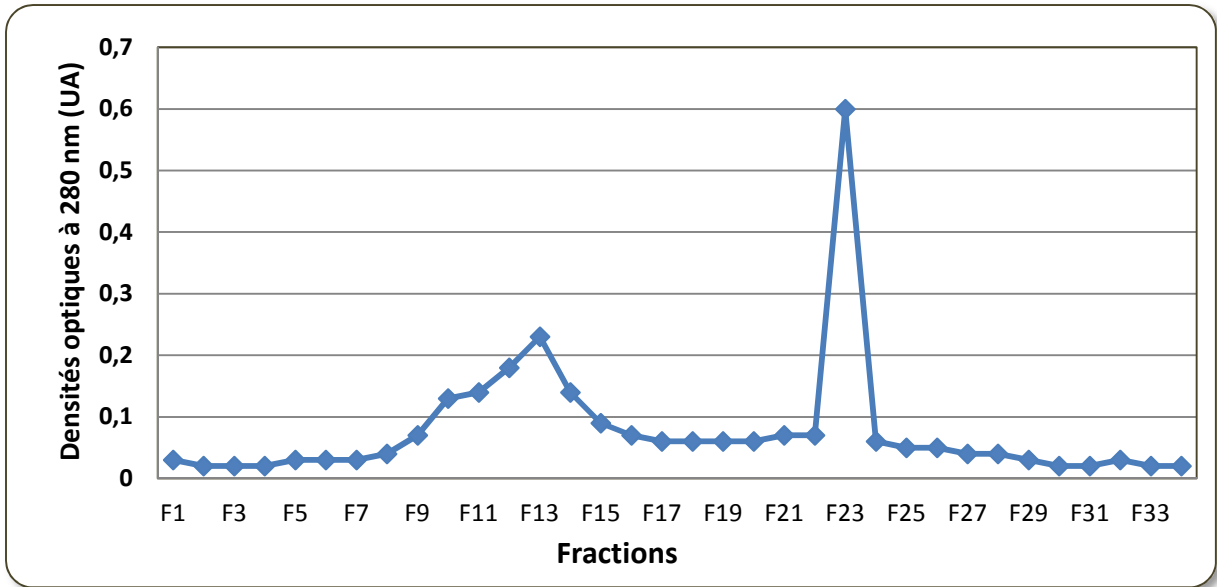


Figure 7: Chromatogramme de purification de la chaperonine cytoplasmique à partir du lysat de réticulocytes de lapins. Représentant la variation des DO en fonction du nombre de fractions. De F1 à F9, il s'agit des fractions de lavage avec le tampon A d'un volume de 4,5ml. Ces fractions ont des DO comprises entre 0 et 0,05 U.A. de F10 à F30 s'agit des fractions d'élution avec le tampon B un volume de 10ml. Le débit de la colonne est de 500µl/30s.

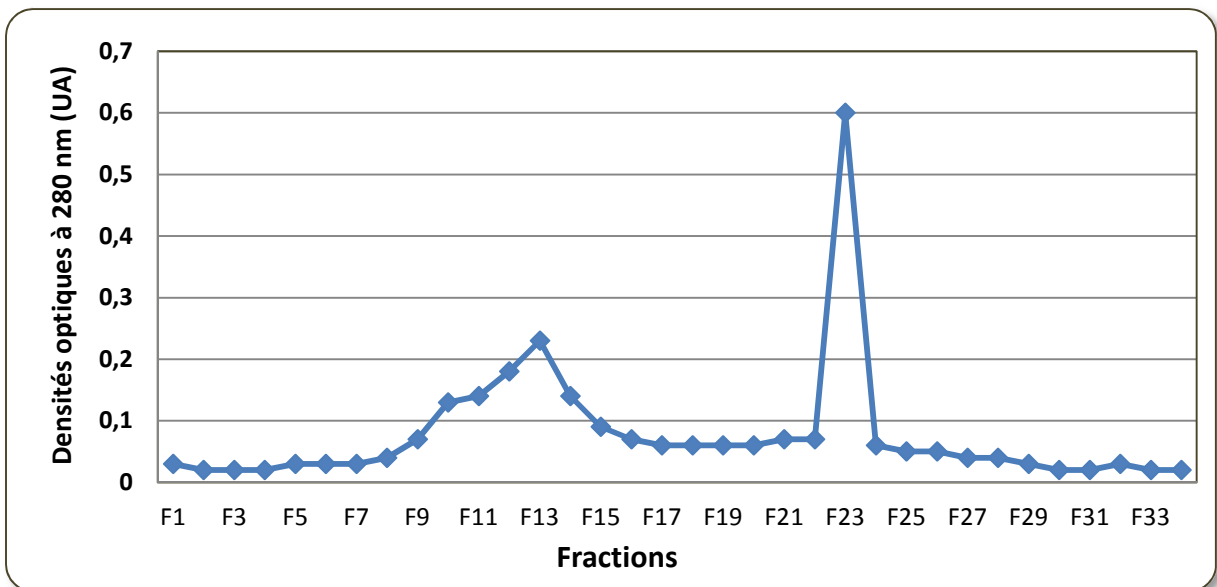


Figure 8: Chromatogramme de purification de la chaperonine cytoplasmique CCT à partir d'un extrait de foie de mouton. Représentant la variation des DO en fonction de fraction et leur débit. De F1 à F10 s'agit des fractions de lavage avec le tampon A. Ces fractions ont des DO comprises entre 0 et 0,13 UA. De F11 à F30 s'agit des fractions d'élution avec un volume de 10ml de tampon B. le débit de la colonne est de 500µl/30s.

La dernière étape de notre expérience a consisté à vérifier la pureté des fractions se trouvant aux centres des pics d'élution par rapport aux extraits brutes. Pour cela nous avons réalisé une SDS-PAGE à 12%. Sur le gel que nous avons obtenu (Fig. 9) nous constatons après coloration au bleu de Coomassie et décoloration que le passage à travers une colonne de Q-Sepharose a permis d'éliminer une grande partie des protéines présentes dans l'extrait brut clarifié. Nous remarquons cependant que le nombre de bandes présentes sur l'extrait brut du foie est bien plus supérieur que celui du lysat de réticulocytes de lapins. Nous pouvons expliquer cela par le fait que le foie est un organe qui comporte une plus grande variété de protéines par rapport aux réticulocytes. Sur les pistes correspondantes au lysat de réticulocytes de lapins et à ses fractions d'élutions (1, 2, 3 et 4), nous remarquons une diminution progressive du nombre de bandes présentes mais aussi de l'intensité de celles qui subsistent. La bande située entre 75 et 50 kDa reste stable et ne diminue d'intensité que légèrement. Ces observations sont aussi valables pour les pistes correspondantes à l'extrait de foie de mouton et de ses fractions d'élutions (5, 6, 7 et 8). Toutefois, nous constatons que sur la piste 8 la fraction ne contient quasiment plus de protéines or la densité optique à 280 nm et le dosage de Bradford donnent tous deux des valeurs élevées. Les acides nucléiques absorbent aussi dans l'ultraviolet à des longueurs d'ondes proches de celles des protéines, leur présence peut dès lors fortement impacter les valeurs de densité optique à 280 nm, ce qui expliquerait la valeur de la densité optique de la fraction 24. Pour appuyer ce fait il aurait fallu mesurer la densité optique à 260 nm et calculer le ratio DO280/DO260.

Sur les pistes correspondantes au lysat de réticulocytes de lapins et à ses fractions d'élution, il est également observé une bande contaminante qui s'estompe légèrement et dont le poids moléculaire avoisine les 70 kDa. Selon la littérature sur sujet, il s'agirait vraisemblablement de Hsp70. Cette famille de chaperons est fortement inductible par le stress et largement présente dans le lysat de réticulocytes du fait du traitement subi par les lapins (injection de phénylhydrazine). Cette bande est faiblement visible sur les pistes relatives au foie.

Vers les 90 kDa, se trouve une bande assez diffuse et qui s'estompe au fur et à mesure dans les pistes relatives au lysat de réticulocytes de lapin mais assez marquée et disparaît au lavage dans celles relatives au foie. Là encore, il s'agirait d'un autre type de chaperons moléculaires, Hsp90 abondamment exprimée dans le foie (Myung *et al.*, 2004).

Dans l'ensemble des pistes, nous remarquons la présence d'une bande de faible poids moléculaire qui s'estompe après lavage et élution. Il s'agit probablement de produits de dégradation de différentes sortes de protéines.

Du fait de la forte quantité de protéines que nous avons déposée dans les puits de gels, il n'a pas été possible de distinguer les bandes caractéristiques du profil de migration de la chaperonine CCT et qui sont au nombre de 5. En effet, la CCT comprend 8 types de sous-unité différentes de poids moléculaires allant de 52 à 65 kDa (Kubota *et al.*, 1994) que l'on peut aisément distinguer.

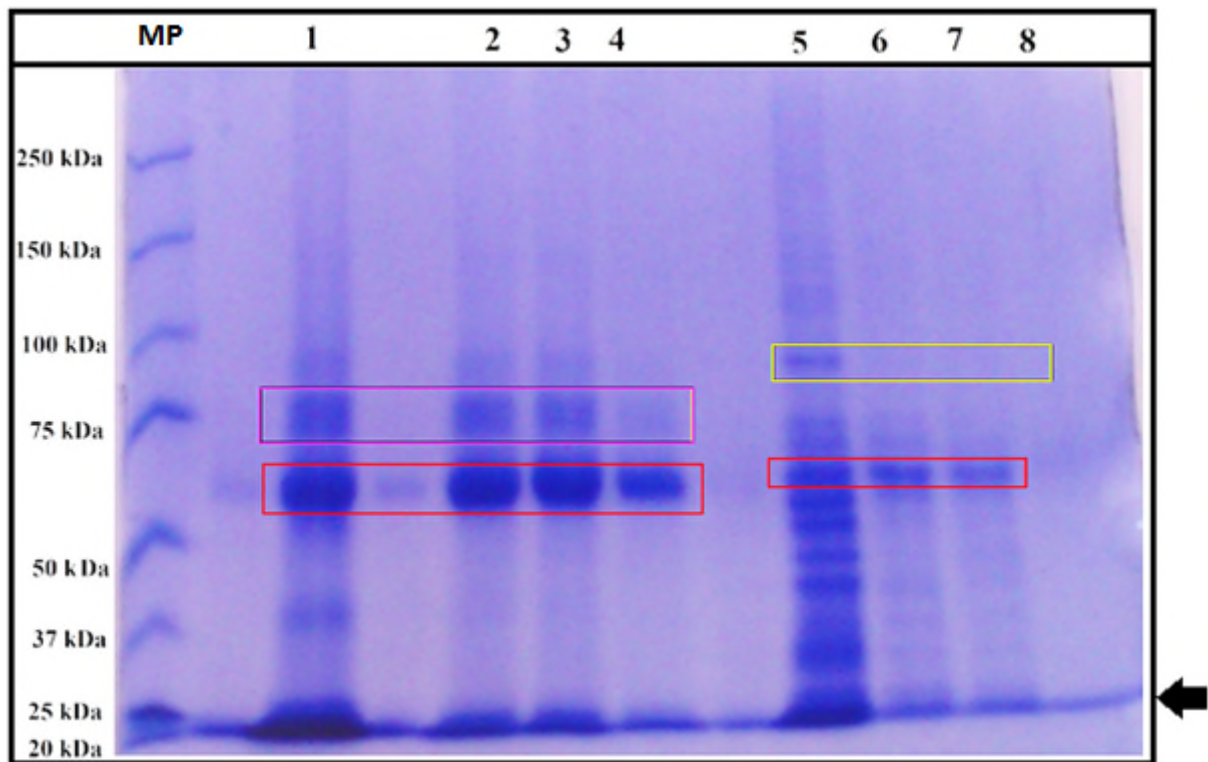


Figure 9 : Comparaison des profils de migration de protéines sur gel SDS-PAGE à 12% contenues dans différentes fractions de purification de la chaperonine CCT. À partir d'un lysat de réticulocytes de lapins (pistes 1, 2, 3 et 4) correspondant aux fractions (extrait brut, 11, 12, 14) et d'un extrait de foie de mouton (pistes 5, 6, 7 et 8) correspondant aux fractions (extrait brut, 14, 15, 24) dans chaque puits nous avons déposé 20 µl d'échantillon. La piste MP correspond au marqueur de poids moléculaire dans laquelle nous avons déposé 7 µl. Les zones encadrées en rouge, représentent les bandes d'un poids moléculaire d'environ 60 kDa qui correspondrait à de la CCT, la zone encadrée en rose représente des bandes d'un poids moléculaire d'environ 70 kDa qui correspond à la Hsp70. La zone encadrée en jaune représente les bandes qui se situent entre 75 et 100 kDa qui correspond à la Hsp90. Les autres bandes qui apparaissent notamment dans les pistes des extraits bruts

correspondent à la présence d'autres protéines. La ligne bleue en bas du gel indiquée par la flèche noire correspond au front de migration.

Pour appuyer nos résultats de SDS-PAGE nous avons déterminé les poids moléculaires des protéines qui constituent les bandes d'intérêt et ce en utilisant les standards du poids moléculaires. La droite d'étalonnage que nous avons obtenu en rapportant le logarithme des poids moléculaires à rapport frontal des protéines ont montré que les protéines des bandes encadrées en rouge, move et jaune ont des poids moléculaires respectivement de 58,5 et 61,5, 78,6 et 91,2 kDa et qui ont migré à des distances respectives de 5,8 et 5,5, 4,8 et 4,2 cm.

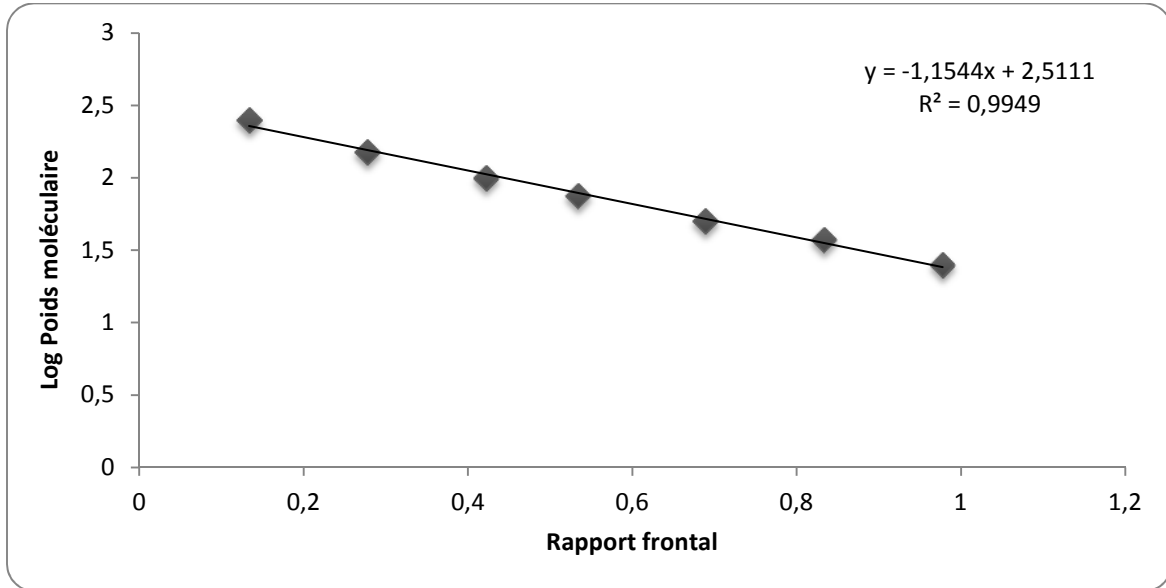


Figure 10: évaluation des logarithmes des poids moléculaires des protéines en fonction du rapport frontal de leurs distances relatives.

Conclusion

Dans notre travail nous avons pu extraire et purifier la CCT à partir des deux sources différentes dans lesquelles cette chaperonine est abondamment exprimée : le lysat de réticulocytes de lapins et le foie de mouton selon le protocole de Gao (1992) adapté. Pour cela, nous avons réalisé une chromatographie échangeuse d'anions sur Q-Sepharose. Nous avons également dosé les protéines totales dans les fractions supposées contenir la CCT plus ou moins pures et enfin nous avons suivi les étapes de purification par SDS-PAGE selon le protocole de Laemmli 1970.

L'évaluation de la pureté de la CCT par électrophorèse SDS-PAGE à 12% a montré des bandes de poids moléculaire de 60kDa qui correspondent vraisemblablement à la CCT. Egalement d'autres bandes minoritaires apparissent qui signifie que le protocole que nous avons suivi a permet d'éliminer une majorité de protéines contaminantes.

Ce travail nous a permit de s'initier aux techniques de bases de la protéomie, et apprendre à optimiser et à adapter un protocole expérimental selon les moyens disponibles au laboratoire.

La purification de la CCT pourrai être faite par d'autre méthodes chromatographiques tel que le gel de filtration et la chromatographie d'affinité

La forme pure de la CCT pourra être utilisée pour mieux comprendre son mécanisme d'action, replier *in vitro* ses substrats, son implication dans le contrôle des processus cellulaires et aussi dans les phénomènes pathologiques. Ce la permettra son exploitation dans le domaine thérapeutique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, *181*(4096), 223-230.

Apetri, A.C., & Horwich, A. L. (2008). Chaperonin chamber accelerates protein folding through passive action of preventing aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(45), 17351-17355.

Archibald, J.M., Logsdon, J.M., & Doolittle, W.F. (2000). Origin and evolution of eukaryotic chaperonins: phylogenetic evidence for ancient duplications in CCT genes. *Molecular biology and evolution*, *17*(10), 1456-1466.

Archibald, J.M., Blouin, C., & Doolittle, W. F. (2001). Gene duplication and the evolution of group II chaperonins: implications for structure and function. *Journal of structural biology*, *135*(2), 157-169.

Arrigo, A.P. (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines: L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *M/S: médecine sciences*, *21*(6-7), 619-625.

Arrigo, A.P., & Pauli, D. (1988). Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during *Drosophila* development. *Experimental cell research*, *175*(1), 169-183.

Benhabilès, N., Thomas, A., & Brasseur, R. (2000). Les mécanismes de repliement des protéines solubles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, *4*(2), 71-81.

Ben-Zvi, A.P., & Goloubinoff, P. (2001). Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of structural biology*, *135*(2), 84.

Bosh, G., Baumeister, W., & Essen, L.O. (2000). Crystal structure of the beta-apical domain of the thermosome reveals structural plasticity in the protrusion region. *Journal of Molecular Biology*, *301*, 19-25.

Références bibliographiques

Bruey, J. M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E., & Garrido, C. (2000). Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*, *19*(42), 4855.

Buchner, J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *The FASEB journal*, *10*(1), 10-19.

Chaudhuri, T.K., Verma, V.K., & Maheshwari, A. (2009). GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in Escherichia coli: Present scenario and assignments for the future. *Progress in biophysics and molecular biology*, *99*(1), 42-50.

Clarke, A.R. (1996). Molecular chaperones in protein folding and translocation. *Current opinion in structural biology*, *6*(1), 43-50.

Cong, Y., Baker, M.L., Jakana, J., Woolford, D., Miller, E.J., Reissmann, S., & Chiu, W. (2010). 4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(11), 4967-4972.

Csermely, P., Schneider, T., Prohászka, Z., & Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*, *79*(2), 129-168.

Dekker, C., Roe, S.M., McCormack, E.A., Beuron, F., Pearl, L.H., & Willison, K.R. (2011). The crystal structure of yeast CCT reveals intrinsic asymmetry of eukaryotic cytosolic chaperonins. *The EMBO journal*, *30*(15), 3078-3090.

Deloche, O., Kelley, W.L., & Georgopoulos, C. (1997). Structure-function analyses of the Ssc1p, Mdj1p, and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *179*(19), 6066-6075.

Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal*, *16*(2), 221-229.

Références bibliographiques

Ellis, R.J. (1990). Molecular chaperones: the plant connection. *Science*, 250(4983), 954-959.

Ellis, J. (1992). Protein folding. Cytosolic chaperonin confirmed. *Nature*, 358(6383), 191.

Ellis, J.R. (1996). The "Bio" in Biochemistry--Protein Folding Inside and Outside the Cell. *Science*, 272(5267), 1448-1448.

Encarta, D. (2009). Enciclopedia Microsoft.

Farr, G.W., Scharl, E.C., Schumacher, R.J., Sondek, S., & Horwich, A.L. (1997). Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell*, 89(6), 927-937.

Feige, U., & Polla, B.S. (1994). Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experientia*, 50(11-12), 979-986.

Feldman, D.E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R.G., & Frydman, J. (1999). Formation of the VHL–elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Molecular cell*, 4(6), 1051-1061.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J. S., Tempst, P., & Hartl, F. U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *The EMBO journal*, 11(13), 4767.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., & Hartl, F.U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111 - 117

Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H., & Cowan, N.J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β -actin folding. *Cell*, 69(6), 1043-1050.

Références bibliographiques

- Gao, Y., Melki, R., Walden, P.D., Lewis, S.A., Ampe, C., Rommelaere, H., & Cowan, N.J. (1994). A novel cochaperonin that modulates the ATPase activity of cytoplasmic chaperonin. *The Journal of cell biology*, *125*(5), 989-996.
- Garrido, C., Mehlen, P., Fromentin, A., Hammann, A., Assem, M., Arrigo, A.P., & Chauffert, B. (1996). Inconstant Association between 27-kDa Heat-Shock Protein (Hsp27) Content and Doxorubicin Resistance in Human Colon Cancer Cells. *European Journal of Biochemistry*, *237*(3), 653-659.
- Garrido, C., Ottavi, P., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Chauffert, B., & Mehlen, P. (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer research*, *57*(13), 2661-2667.
- Gavriloic, M., Maginot, M. J., & Wallach, J. (1996). *Manipulations d'analyse biochimique*. Doin Editions, 171-174.
- Gibert, B. (2010). La protéine de stress Hsp27/HspB1, une cible de choix en thérapie anti-cancéreuse, (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I), 23-26.
- Goetz, M.P., Toft, D.O., Ames, M.M., & Erlichman, C. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of Oncology*, *14*(8), 1169-1176.
- Grantcharova, V., Alm, E.J., Baker, D., & Horwich, A.L. (2001). Mechanisms of protein folding. *Current opinion in structural biology*, *11*(1), 70-82.
- Gutsche, I., Essen, L.O., & Baumeister, W. (1999). Group II chaperonins: New TriC(K)s and turns of a folding machine. *Journal of Molecular Biology* (293), 295-312.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, *381*(6583), 571-580.
- Hartl, F.U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, *475*(7356), 324-332.

Références bibliographiques

Horwich, A.L., Willison, K.R., Cowan, N.J., Viitanen, P., Micklethwaite, P., Gething, M.J., & Willison, K. (1993). Protein Folding in the Cell: Functions of Two Families of Molecular Chaperone, hsp 60 and TF55-TCP1 [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 339(1289), 313-326.

Horwich, A.L., & Fenton, W.A. (2009). Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Quarterly reviews of biophysics*, 42(02), 83-116.

Horwich, A.L., Buchner, J., Sock, R.G., Gierasch, L.M., & Saibil, H.R. (2012). Chaperones and protein folding. Elsevier, 213-233.

Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10449-10453.

Hunt, C., & Morimoto, R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(19), 6455-6459.

Hynes, G.M., and Willison, K.R. (2000) Individual subunits of the eukaryotic cytosolic chaperonin mediate interactions with binding sites located on subdomains of beta-actin, *J. Biol. Chem.* **275**, 18985–18994.

Ingolia, T.D., & Craig, E. A. (1982). Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(7), 2360-2364.

Jaenicke, R. (1993). Role of accessory proteins in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(1), 104-112.

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1517-1520.

Références bibliographiques

Kabir, M.A., Uddin, W., Narayanan, A., Reddy, P.K., Jairajpuri, M.A., Sherman, F., & Ahmad, Z. (2011). Functional subunits of eukaryotic chaperonin CCT/TRiC in protein folding. *Journal of amino acids*, 2-7.

Kafri, G., Willison, K.R., & Horovitz, A. (2001). Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1. *Protein Science*, 10(2), 445-449.

Kafri, G., & Horovitz, A. (2003). Transient kinetic analysis of ATP-induced allosteric transitions in the eukaryotic chaperonin containing TCP-1. *Journal of molecular biology*, 326(4), 981-987.

Kamoun, P., Lavoigne, A., & Verneuil, H.H. (2003). *Biochimie et biologie moléculaire. Flammarion médecine-sciences*, 122.

Kappe, G., Leunissen J.A., & de Jong W.W. (2002). Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 1-17.

Kim S., Willison K.R & Horwich A.L. (1994). Cytosolic chaperonine subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide binding domains. *Trends of Biochemical Science*(19), 543-548.

Knapp, P.M., Lingeman, J.E., Siegel, Y.I., Badylak, S.F., & Demeter, R.J. (1994). Biocompatibility of small-intestinal submucosa in urinary tract as augmentation cystoplasty graft and injectable suspension. *Journal of endourology*, 8(2), 125-130.

Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A., & Willison, K. (1994). Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Current biology: CB*, 4(2), 89.

Kubota, H. (2002). Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT. *Vitamins & Hormones*, 65, 313-331.

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

Références bibliographiques

Landry, D.W., Akabas, M.H., Redhead, C., Edelman, A., Cragoe Jr, E.J., & Al-Awqati, Q. (1989). Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science*, 244(4911), 1469-1472.

Lanneau, D. (2010). Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique, (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne), 27-41

Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., & Vierling, E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO journal*, 16(3), 659-671.

Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., & Subject, J.R. (1995). Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), 15725-15733.

Leitner, A., Joachimiak, L.A., Bracher, A., Mönkemeyer, L., Walzthoeni, T., Chen, B., & Frydman, J. (2012). The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Structure*. 20(5), 814–825.

Leroux, M.R., & Hartel, F.U. (2000). Protein folding: Versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT. *Current Biology*, (10), R260-264.

Liou, A.K., & Willison, K.R. (1997). Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. *The EMBO journal*, 16(14), 4311-4316.

Llorca, O., Marco, S., Carrascosa, J.L., & Valpuesta, J.M. (1997). Conformational changes in the GroEL oligomer during the functional cycle. *Journal of Structural Biology*, (118), 31-42.

Llorca, O., McCormack, E.A., Hynes, G., Grantham, J., Cordell, J., Carrascosa, J.L., & Valpuesta, J.M. (1999). Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. *Nature*, 402(6762), 693-696.

Références bibliographiques

Llorca, O., Martín-Benito, J., Ritco-Vonsovici, M., Grantham, J., Hynes, G.M., Willison, K.R., & Valpuesta, J. M. (2000). Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *The EMBO journal*, 19(22), 5971-5979.

Llorca, O., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas, P., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K.R., Carrascosa, J.L., & Valpuesta, J.M. (2001). Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. *Journal of structural biology*, 135(2), 205-218.

Maurel, S. (2011). Rôle des protéines de choc thermique dans la régulation du facteur de transcription HIF, (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne), 18-33.

McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., & Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *Journal of molecular biology*, 249(1), 126-137.

McCormack, E.A., Rohman, M.J., & Willison, K.R. (2001). Mutational screen identifies critical amino acid residues of β -actin mediating interaction between its folding intermediates and eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *Journal of structural biology*, 135(2), 185-197.

Melki, R., Batelier, G., Soulié, S., & Williams, R.C. (1997). Cytoplasmic chaperonin containing TCP-1: structural and functional characterization. *Biochemistry*, 36(19), 5817-5826.

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., & Yahara, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and cellular biology*, 14(2), 1459-1464.

Moore, P.B. (1997). Ribosomes: Protein synthesis in slow motion. *Current Biology*, 7(3), R179-R181.

Myung, J.K., Afjehi-Sadat, L., Felizardo-Cabatic, M., Slavic, I., & Lubec, G. (2004). Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines. *Proteome science*, 2(1), 8.

Références bibliographiques

Neirylich, K., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., & Ampe, C. (2004). The folding pathways of actin and tubulin, mechanism of and recognition by the eukaryotic perfoling chaperones and CCT. *Molecular Cell Biology*, (5): ISBN 81-7736-213-5.

Oh, S.A., Park, J.H., Lee, G.I., Paek, K.H., Park, S.K., & Nam, H.G. (1997). Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 12(3), 527-535.

Pappenberger, G., Wilsher, J.A., Mark Roe, S., Counsell, D.J., Willison, K.R., & Pearl, L.H. (2002). Crystal structure of the CCT γ apical domain: implications for substrate binding to the eukaryotic cytosolic chaperonin. *Journal of molecular biology*, 318(5), 1367-1379.

Pearl, L.H., & Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 271-294.

Prodromou, C., Roe, S. M., Piper, P.W., & Pearl, L.H. (1997). A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4(6), 477-482.

Prodromou, C., & Pearl, L.H. (2003). Structure and functional relationships of Hsp90. *Current cancer drug targets*, 3(5), 301-323.

Réty, S. (2011). Le repliement des proteines. Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques Faculté de Pharmacie, 75270 Paris Cedex 06, 46-48.

Rommelaere, H., Neve, M., Melki, R., Vandekerckhove, J., & Ampe, C. (1999). The cytosolic class II chaperonin CCT recognizes delineated hydrophobic sequences in its target proteins. *Biochemistry*, 38(11), 3246-3257.

Silver, M., Barnes, R.J., Comline, R.S., Fowden, A.L., Clover, L., & Mitchell, M.D. (1979). Prostaglandins in the foetal pig and prepartum endocrine changes in mother and foetus. *Animal Reproduction Science*, 2(1), 305-322.

Références bibliographiques

Soti, C., & Csermely, P. (2003). Aging and molecular chaperones. *Experimental gerontology*, 38(10), 1037-1040.

Spiess, C., Meyer, A.S., Reissmann, S., & Frydman, J. (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends in cell biology*, 14(11), 598-604.

Vabulas, R.M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F.U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12).

Valpuesta, J.M., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., & Willison, K.R. (2002). Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS letters*, 529(1), 11-16.

Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., & Willison, K.R. (2005). Structure and function of the cytosolic chaperonin CCT. *Protein folding handbook*, 725-755.

Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W.E., Zahn, R.K., & Kurelec, B. (1995). Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 342(3), 113-123.

Won, K.A., Schumacher R.J., Farr, G.W., Horwich A.L., & Reed, S.I. (1998). Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Molecular and Cellular Biology*, (18), 7584-7589.

Xu, Z., Horwich A.L., & Sigler, S.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) 7 chaperonin complex. *Nature*, (388), 741-750.

Yam, A.Y., Xia, Y., Lin, H. T. J., Burlingame, A., Gerstein, M., & Frydman, J. (2008). Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nature structural & molecular biology*, 15(12), 1255-1262.

Yébenes, H., Mesa, P., Muñoz, I. G., Montoya, G., & Valpuesta, J.M. (2011). Chaperonins: two rings for folding. *Trends in biochemical sciences*, 36(8), 424-432.

Références bibliographiques

Yifrach, O., & Horovitz, A. (1995). Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry*, 34(16), 5303-5308.

Yon, J.M. (1997). Protein folding: concepts and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(7), 557-567.

Zhang, X., Beuron, F., & Freemont, P.S. (2002). Machinery of protein folding and unfolding. *Current opinion in structural biology*, 12(2), 231-238.

Annexes

Annexe I : Composition des solutions mères par litre

- Tris-HCl pH 7,5(1M)	24,2g
- Tris-HCl pH7,2(0,1M)	15,76g
- KCl(0,5M)	1,86g
- EDTA(0,1M)	2,92g
- EGTA(0,1M)	0,38g
- MgCl ₂ (0,5M)	101,60g
- Acrylamide/Bisacrylamide(30%/0,8%)	300g/8g
- SDS (10%)	100g

Annexe II : Tampon T₁₀E₁

- Tris HCL(10mM)	1,2g
- EDTA(1 mM)	0,37g
- Eau distillée qsp	10ml

Annexe III: Tampon de lyse

- T ₁₀ E ₁	4ml
- EGTA(0, 1M)	1ml
- Eau distillée qsq	10ml

Annexe IV: Tampon d'ajustement

- Tris-HCL(0,14M) pH 7,5	16,8g
- Eau distillée qsq	10ml

Annexe V: Tampons de purification

	TrisHClpH72	EGTA	Mgcl ₂	KCL	Eaudistilléeqsq
TamponA	8ml (20 mM)	4ml (2 mM)	4ml (20mM)	4ml (10mM)	200ml
TamponB	8ml (20 mM)	4ml (2 mM)	100ml(0,5M)	4ml (10 mM)	200ml

Annexe VI: Tampons d'électrophorèse

1. Tampon de dénaturation

produit	volume
Tris-HCl(0,125M)	2,5ml
SDS(4%)	0,4ml
Glycérol(20%)	2ml
β-Mercaptoéthanol (4%)	0,4ml
bleu de bromophénol (0,002%)	0,002ml
Eau distillée qsq	10ml

2. Tampon pour la préparation des gels

	Tampon de séparation	Tampon de concentration
Tris-HCl ,pH8,8	72,7g(3M)	–
Tris- HCl, pH6,8	–	12,114g (0,5M)
SDS	1,6g (0,8%)	0,8g (0,5%)
βMercaptoéthanol	0,8ml	400µl (0,2%)
Eau distillée qsq	200ml	200ml

3. Tampon de migration pH8

produit	quantité
Tris(0,025M)	1,06g
Glycine(0,192M)	5,04g
SDS(0,1%)	175µl
Eau distillée qsq	350ml

Annexe VII: Solution de coloration et de décoloration de gels

	Acide acétique	éthanol	Bleu de coomassie R250	Eau distillée qsq
Solution de coloration	5ml (5%)	50ml (50%)	0,05g	500ml
Solution de décoloration	20ml (3%)	1,5ml (40%)	–	50ml

Annexe VIII :Réactif de Bradford

.. -Bleu de Coomassie G250	0,01g
-Acide phosphorique à 85%	10ml
-éthanol95%	5ml
-Eau distillée qsp	200ml

Résumé

Les chaperons moléculaires assistent le repliement des protéines et sont classés en plusieurs familles en fonction de leurs poids moléculaires. On retrouve parmi eux la famille de Hsp60 à laquelle appartient la chaperonine cytoplasmique CCT.

La CCT est un complexe oligomérique composé de deux anneaux empilés composé chacun de huit sous-unités différentes. Elle interagit avec des polypeptides naissants ou mal repliés parmi lesquels les actines et les tubulines ou encore des protéines oncogéniques comme le suppresseur de tumeur de Von Hippel Lindeau (VHL).

La CCT a été extraite et purifiée à partir de deux sources différentes : le lysat de réticulocytes de lapins et le foie de mouton dans des conditions que nous avons optimisées par chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose. Les résultats de l'électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE 12% que nous avons réalisé montre que le protocole que nous avons suivi permet d'éliminer une majorité de protéines contaminantes et d'obtenir la chaperonine cytoplasmique sous une forme assez pure.

Mots clés : chaperonine cytoplasmique CCT, lysat des réticulocytes de lapins, foie de mouton, Q-Sepharose, SDS-PAGE.