HAL
open science

Modifications chimiques et évolution dirigée de la formiate déshydrogénase de Candida boidinii : vers une compréhension de la relation structure/fonction d'une déshydrogénase en liquide ionique

Mourad Bekhouche

To cite this version:

Mourad Bekhouche. Modifications chimiques et évolution dirigée de la formiate déshydrogénase de Candida boidinii : vers une compréhension de la relation structure/fonction d'une déshydrogénase en liquide ionique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10209 . tel-00834194

HAL Id: tel-00834194

https://theses.hal.science/tel-00834194v1

Submitted on 14 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 209 -2011 Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé
EDISS

DIPLOME DE DOCTORAT

BIOCHIMIE

soutenue publiquement le 19 octobre 2011
à Villeurbanne

par

Mr. BEKHOUCHE Mourad

Modifications chimiques et évolution dirigée de la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* : vers une compréhension de la relation structure/fonction d'une déshydrogénase en liquide ionique

Directeur de thèse : Mr. Blum Loïc J. (professeur de l'université Lyon 1)

JURY :

Mr. Buchet René (professeur de l'université Lyon 1, président du jury)

Mme. Hecquet Laurence (professeur de l'université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, rapporteur)

Mme. Chevalot Isabelle (professeur de Nancy université, rapporteur)

Mme. Sarazin Catherine (professeur de l'université de Picardie Jules Verne, membre du jury)

Mr. Doumèche Bastien (maître de conférences de l'université Lyon 1, encadrant, membre du jury)

Mr. Blum Loïc J. (professeur de l'université Lyon 1, directeur de thèse)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. A. Bonmartin**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

Abréviations 5

I. Introduction 7

I. 1. La biocatalyse 7
I. 1. 1. Définition 7
I. 1. 2. La biocatalyse : une chimie verte 8

I. 2. La Biocatalyse en milieu organique 9
I. 2. 1. Bref historique 9
I. 2. 2. Avantages et inconvénients 10
I. 2. 3. Exemples de réactions biocatalysées en milieu organique 12
I. 2. 3. A. Réactions catalysées par les hydrolases 12
I. 2. 3. A. 1. Les lipases 12
I. 2. 3. A. 2. Les peptidases 14
I. 2. 3. B. Les oxydo-réductases 17
I. 2. 3. B. 1. Les oxydases 18
I. 2. 3. B. 2. Les déshydrogénases 18
I. 2. 4. Propriétés des enzymes en solvants organiques et forces mises en jeu 19
I. 2. 4. A. Nature et classification des solvants organiques 19
I. 2. 4. B. Les systèmes réactionnels 21
I. 2. 4. C. La nature de l'enzyme 23
I. 2. 4. D. Paramètres thermodynamiques influençant les réactions biocatalysées en milieu organique 24
I. 2. 4. D. 1. Le Log $P_{o/w}$ 24
I.2.4.D.1.a Définition 24
I.2.4.D.1.b Conséquences sur les réactions biocatalysées en milieu organique 24
I. 2. 4. D. 2. Activité de l'eau 25
I.2.4.D.2.a Définition 25
I.2.4.D.2.b Conséquences sur les réactions biocatalysées en milieu organique 25
I. 2. 4. D. 3. Le pH : effets contre ions et acide/base 28
I.2.4.D.3.a Définition et effets au niveau protéique 28
I.2.4.D.3.b Conséquences du pH sur les réactions biocatalysées en milieu organique 29
I. 2. 5. Préparation du biocatalyseur pour des réactions en solvant organique 30
I. 2. 5. A. Méthodes Physico-chimiques 30
I. 2. 5. A. 1. Enzyme en suspension 30
I. 2. 5. A. 2. Immobilisation 31
I.2.5.A.2.a Immobilisation par fixation à un support 32
I.2.5.A.2.b Immobilisation par inclusion dans un gel 34
I.2.5.A.2.c Immobilisation par réticulation covalente 35
I. 2. 5. A. 3. Modifications chimiques 36
I. 2. 5. A. 4. Modifications par l'intermédiaire de lipides ou de tensio-actifs 38
I. 2. 5. B. Ingénierie des enzymes 39
I. 2. 5. B. 1. Mutagenèse dirigée 40
I. 2. 5. B. 2. Evolution dirigée 43
I.2.5.B.2.a Principe et définition : 43
I.2.5.B.2.b PCR de basse fidélité 44
I.2.5.B.2.c Remaniement aléatoire de fragments d'ADN ("DNA Shuffling") 45
I.2.5.B.2.d Evolution dirigée appliquée à la biocatalyse en milieu organique 46
I. 2. 6. Problèmes liés à la biocatalyse en milieu organique et solutions apportées 47

I. 3. Biocatalyse en Liquide Ionique 48
I. 3. 1. Bref historique 48
I. 3. 2. Les liquides ioniques 49
I. 3. 2. A. Définition 49
I. 3. 2. B. Propriétés physico-chimiques 50
I. 3. 2. C. Avantages et inconvénients des liquides ioniques 52
I. 3. 2. D. Les Liquides Ioniques : des solvants verts ? 52
I. 3. 2. E. Applications des LIs en biocatalyse 55
I. 3. 2. E. 1. Réactions catalysées par les lipases en LI 55
I. 3. 2. E. 2. Réactions catalysées par les peptidases en LI 57
I. 3. 2. E. 3. Réactions catalysées par les oxydoréductases en LI 57

I. 3. 2. F. Effets des liquides ioniques sur la structure des protéines 60
I. 3. 2. F. 1. Les notions de kosmotropie et de chaotropie d'une espèce ionique 60
I. 3. 2. F. 2. La série de Hofmeister 61
I.3.2.F.2.a La série de Hofmeister appliquée aux ions inorganiques 61
I.3.2.F.2.a.1 Effets des anions inorganiques sur les structures protéiques 62
I.3.2.F.2.a.2 Effets des cations inorganiques sur les structures protéiques 63
I.3.2.F.2.b La série d'Hofmeister appliquée aux LIs 63
I. 3. 3. Analyse structurale en LI 66
I. 3. 3. A. Problèmes liés à l'analyse structurale en LI 66
I. 3. 3. B. Spectroscopie Infrarouge en LI 66
I. 3. 3. B. 1. Principe de la spectroscopie IR 66
I. 3. 3. B. 2. Exemples d'analyses structurales par FTIR en LI 70
I. 3. 3. C. Dichroïsme circulaire en LI 71
I. 3. 3. C. 1. Principe du dichroïsme circulaire 71
I. 3. 3. C. 2. Exemple d'analyse structurale par dichroïsme circulaire en LI 73
I. 3. 3. D. Spectroscopie de fluorescence en LI 74
I. 3. 3. D. 1. Principe 74
I. 3. 3. D. 2. Fluorescence intrinsèque des protéines 75
I. 3. 3. D. 3. Atténuation de fluorescence 76
I.3.3.D.3.a Atténuation de fluorescence due à la fixation de ligands 76
I.3.3.D.3.b Atténuation de fluorescence par des agents atténuateurs 77
I.3.3.D.3.b.1 Définition, principe générale 77
I.3.3.D.3.b.2 Interprétation des résultats : modèles mathématiques 79
I.3.3.D.3.b.3 Exemples d'analyses structurales par spectroscopie de fluorescence 80
I. 3. 3. E. Autres techniques d'analyse structurale en LI 80
I. 3. 3. E. 1. Diffusion des neutrons aux petits angles 81
I. 3. 3. E. 2. Spectroscopie de fluorescence en temps résolu 81
I. 3. 3. E. 3. Dynamique moléculaire 82
I. 3. 3. E. 4. Expériences de saut de solvant 82
I. 3. 4. Préparation du biocatalyseur pour des réactions en LIs 83
I. 3. 4. A. Ingénierie des LIs : liquides ioniques fonctionnalisés par des hydroxyles 83
I. 3. 4. B. Utilisation de tensio-actifs : ajout de tensio-actifs ou microémulsions en LI 84
I. 3. 4. C. Fonctionnalisation des enzymes : par association covalente ou non covalente ("coating") 87
I. 3. 4. D. Immobilisation 88

I. 4. But de la thèse 90

I. 5. Modèles d'études 91
I. 5. 1. Choix des Modèles 91
I. 5. 1. A. La formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* 91
I. 5. 1. A. 1. Réaction catalysée 91
I. 5. 1. A. 2. Structure de la FDH 92
I. 5. 1. A. 3. Site actif de la FDH et motifs conservés 93
I. 5. 1. A. 4. Application de la FDH à la biocatalyse 95
I. 5. 1. A. 5. Application de la FDH à l'élaboration de biopiles 96

II. Matériel et méthodes 98

II. 1. Matériels et instrumentations 98
II. 1. 1. Modifications covalentes et analyses structurales 98
II. 1. 2. Evolution dirigée de la FDH 99

II. 2. Méthodes 100
II. 2. 1. Modifications covalentes de la FDH 100
II. 2. 1. A. Synthèse des cations 100
II. 2. 1. A. 1. Synthèse de l'hydroxypropyl imidazolium chloride (cation 1b) : 100
II. 2. 1. A. 2. Synthèse de l'hydroxybutyl imidazolium chloride (cation 1c) : 100
II. 2. 1. A. 3. Synthèse de l'hydroxyhexyl imidazolium chloride (cation 1d) : 100
II. 2. 1. A. 4. Synthèse de l'hydroxypropyl pyrrolidinium chloride (cation 2b) : 101
II. 2. 1. A. 5. Synthèse de l'hydroxybutyl pyrrolidinium chloride (cation 2c) : 101
II. 2. 1. A. 6. Synthèse de l'hydroxyhexyl pyrrolidinium chloride (cation 2d) : 101

II. 2. 1. A. 7. Le (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium dimethylphosphate (cations 3) et l'hydroxyethyl methylimidazolium chloride (cation 1a) 102
II. 2. 1. B. Modification chimique de la formiate déshydrogénase 102
II. 2. 1. C. Mesure des activités enzymatiques 102
II. 2. 1. D. Mesure des temps de demi-vie de la FDH modifiée de manière covalente 103
II. 2. 1. E. Analyses par spectrométrie de masse 104
II. 2. 1. E. 1. Analyse par spectrométrie de masse ESI$^+$ 104
II. 2. 1. E. 2. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF 104
II.2.1.E.2.a Immobilisation des enzymes protéolytiques sur billes de sepharose 104
II.2.1.E.2.b Digestion trypsique et chymotrypsique 105
II.2.1.E.2.c Spectrométrie de masse MALDI-TOF 105
II. 2. 2. Analyses structurales par des méthodes spectroscopiques 106
II. 2. 2. A. Spectroscopie d'absorption dans l'UV-visible 106
II. 2. 2. B. Spectroscopie infrarouge 106
II. 2. 2. C. Dichroïsme circulaire 107
II. 2. 2. D. Spectroscopie de fluorescence 107
II. 2. 2. D. 1. Fluorescence intrinsèque de la FDH 107
II. 2. 2. D. 2. Atténuation de fluorescence 108
II.2.2.D.2.a Atténuation de fluorescence due à la fixation de ligands 108
II.2.2.D.2.b Atténuation de fluorescence par des agents atténuateurs 108
II. 2. 3. Evolution dirigée de la FDH 108
II. 2. 3. A. Stratégie de clonage du gène de la FDH 109
II. 2. 3. A. 1. Les vecteurs utilisés 109
II.2.3.A.1.a Le vecteur de clonage : pUC57 110
II.2.3.A.1.b Le vecteur d'expression : pET-28b 110
II. 2. 3. B. Production de la FDH en système bactérien 111
II. 2. 3. B. 1. Amplification du gène de la FDH 111
II. 2. 3. B. 2. Clonage de la FDH dans le vecteur pET-28b 112
II.2.3.B.2.a Double digestion BamHI/XhoI 112
II.2.3.B.2.b Ligation de l'insert dans le vecteur pET-28b 112
II. 2. 3. B. 3. Production de la FDH dans *Escherichia coli* 113
II. 2. 3. B. 4. Estimation du meilleur temps d'induction 114
II. 2. 3. C. PCR de basse fidélité 114
II. 2. 3. C. 1. PCR en présence de concentrations biaisées de désoxynucléotides 114
II. 2. 3. C. 2. PCR en présence de manganèse 115
II. 2. 3. D. Criblage de la librairie de mutants 116
II. 2. 3. D. 1. Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en milieu solide 116
II. 2. 3. D. 2. Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en milieu liquide 116
II. 2. 3. E. Purification de la FDH 117
II. 2. 3. E. 1. Purification par séparation en deux phases aqueuses ("ATPS: Aqueous Two-Phase Separation") 117
II. 2. 3. E. 2. Purification sur hydroxylapatite 117
II. 2. 3. F. Contrôle des purifications par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante : SDS-PAGE 118

III. Résultats et discussion 119

III. 1. Méthodes d'analyse structurale en LI 119
III. 1. 1. Analyse de la structure protéique en LI par spectroscopie infrarouge 119
III. 1. 2. Analyse de la structure protéique en LI par dichroïsme circulaire 121
III. 1. 3. Analyse de la structure de la FDH en LI par spectroscopie de fluorescence 122
III. 1. 3. A. Théorie et considérations générales 123
III. 1. 3. B. Détermination de l'outil d'analyse approprié à l'atténuation de la fluorescence de la FDH 127
III. 1. 3. C. Fluorescence de la FDH en présence de LIs 128
III. 1. 3. D. Propriétés d'absorption des LIs 130
III. 1. 3. E. Propriétés d'atténuation des LIs 133
III. 1. 3. F. Atténuation de la fluorescence de la FDH par des agents atténuateurs dynamiques et statiques 136
III. 1. 3. G. Activité de la FDH en présence de différents LIs 141
III. 1. 4. Conclusions sur les analyses structurales en LI par des méthodes spectroscopiques 144

III. 2. Modifications covalentes par des cations analogues aux LIs 146
III. 2. 1. Modifications covalentes de la FDH 146
III. 2. 1. A. Principe de la méthode de modification de la FDH 146
III. 2. 1. B. Procédure générale de synthèse des sels de cations hydroxylés 148
III. 2. 1. C. Caractérisation des cations synthétisés 148
III. 2. 2. Effets des modifications sur l'activité de la FDH 150
III. 2. 2. A. Activité des enzymes modifiées 150
III. 2. 2. B. Caractérisation des modifications : nombre et localisation 152
III. 2. 2. B. 1. Détermination du nombre de modifications 152
III. 2. 2. B. 2. Localisation des modifications 154
III. 2. 2. C. Analyse de la fixation des substrats 156
III. 2. 2. C. 1. Fixation du NAD^+ 158
III. 2. 2. C. 2. Fixation de l'azide 160
III. 2. 2. C. 3. Conclusion sur la fixation des substrats 162
III. 2. 2. D. Activité enzymatique de la FDH modifiée en LI 162
III. 2. 2. E. Paramètres cinétiques de la FDH modifiée en présence de LI 165
III. 2. 2. F. Temps de demi-vie de la FDH native et modifiée en LI 168
III. 2. 2. G. Evaluation de la structure par atténuation de fluorescence 170
III. 2. 3. Conclusions et perspectives sur les modifications covalentes de la FDH 172

III. 3. Evolution dirigée de la FDH 174
III. 3. 1. Principe de la méthode d'évolution dirigée 174
III. 3. 2. Production de la FDH en système bactérien 174
III. 3. 2. A. Amplification du gène de la FDH et clonage dans le vecteur pET-28b 174
III. 3. 2. B. Expression de la FDH dans *E. coli BL21* 176
III. 3. 2. C. Purification de la FDH 177
III. 3. 3. Mutagenèse aléatoire par PCR de basse fidélité 180
III. 3. 3. A. PCR en présence de concentrations biaisées de désoxynucléotides 181
III. 3. 3. B. PCR en présence de manganèse 181
III. 3. 4. Criblage de la librairie de mutants 185
III. 3. 4. A. Criblage des mutants actifs directement sur boîte de pétri 185
III. 3. 4. B. Criblage en présence de LI 187
III. 3. 4. B. 1. Mise au point du test de criblage en présence de LI 187
III. 3. 4. B. 2. Criblage des mutants en présence de LI 188
III. 3. 5. Etude des mutants sélectionnés 191
III. 3. 5. A. Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques 191
III. 3. 5. B. Test d'activité des mutants sélectionnés en LI 195
III. 3. 5. C. Détermination des paramètres cinétiques 197
III. 3. 5. D. Analyse de la fixation des substrats 199
III. 3. 5. D. 1. Fixation du NAD^+ 199
III. 3. 5. D. 2. Fixation du formiate 200
III. 3. 6. Conclusions et perspectives de l'évolution dirigée de la FDH 202

IV. Conclusion générale 205
Bibliographie 209
Annexes 219

Abréviations

aa. : acides aminés

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AOT : sodium-bis(2-éthyle-hexyle sulfosuccinate)

ATPS : "Aqueous Two Phases Separation", séparation en deux phases aqueuses

a_w : "activity water" ou activité de l'eau

BF_4 : tetrafluoroborate

[BMIm][CH_3COO] (ou **LI-2**) : 1-Butyl-3-Methylimidazolium acétate

btma : butyltrimethylammonium

CLEA: "Cross-Linked Enzyme Aggregates" ou aggrégats d'enzyme réticulées

CLEC : "Cross-Linked Enzyme Cristals" ou cristaux d'enzymes réticulées

COV : Composés Organiques Volatiles

DC : Dichroïsme Circulaire

dca : dicyanamide

dhp : dihydrogène phosphate

DMF: Dimethylformamide

[DMIm] : 1-Decyl-3-Methylimidazolium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : "Ethylenediaminetetraacetic acid"

EMBL : " European Molecular Biology Laboratory "

[EMIm] : 1-Ethyl-3-Methylimidazolium

ESI^+ : Electospray Ionisation

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FDH : Formiate déshydrogénase

FTIR : "Fourrier Transformed Infrared Spectroscopy" ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourrier

HMG-CoA : Hydroxy Methyl Glutaryl Coenzyme A

[HMIm] : 1-Hexyl-3-Methylimidazolium

HSA : "Human Serum Albumin" ou albumine de serum humain

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

IR : Infrarouge

LI ou IL: Liquide Ionique

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation

MCS : "Multi Clonage Site" ou site multiple de clonage

$MeSO_4$: Methylsulfate

[MMIm][$CH_3HPO_2(OCH_3)$] (ou **LI-3**) : 1-Methyl-3-Methylimidazolium methylphosphonate

[MMIm][Me_2PO_4] (ou **LI-1**) : 1-Methyl-3-Methylimidazolium dimethylphosphate

[MOEMIM] : 1-MethOxyEthyl-3-Methylimidazolium

N4444 : N,N,N-Tributyl-1-butanaminium

NAD^+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NBT : Nitroblue Tetrazolium

[OMIm] : 1-Octyl-3-Methylimidazolium

P4444 : Tetrabutylphosphonium

pb : paire(s) de base

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : "Polymerase Chain Reaction"

PES : Phenazine Ethosulfate

PF_6 : hexafluorophosphate

Pip14 : 1-Methyl-1-Butylpiperidinium

Pip18 : 1-Methyl-1-Octylpiperidinium

[PrMIm] : 1-Propyl-3-Methylimidazolium

Py4-4Me : 1-Butyl-4-Methylpyridinium

Py8-4Me : 1-Octyl-4-Methylpyridinium

Pyr14 : 1-Butyl-1-Methylpyrrolidinium

Pyr18 : 1-Octyl-1-Methylpyrrolidinium

rpm : rotation par minute

SAB : sérum d'albumine bovin

SANS : "Small Angle Neutron Scattering" ou diffusion des neutrons aux petits angles

Tf_2N ou NTf_2: bis (trifluoromethyl sulfonyl)amide

THF : tétrahdyrofurane

TMS : Tétraméthylsilane

ToF : Time of Flight

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

λ : longueur d'onde

I. Introduction

I. 1. La biocatalyse

I. 1. 1. Définition

Toute substance organique existe à un état métastable sur terre. Au cours d'une réaction (bio)chimique, la transformation de molécules dites substrat(s) en produit(s) nécessite le passage d'une barrière énergétique, ou énergie d'activation. Le catalyseur, qu'il soit organique ou inorganique, diminue l'énergie nécessaire à la formation de l'état de transition et par voie de conséquence, il réduit l'énergie nécessaire à la formation des produits. Ce phénomène se traduit par une réaction plus rapide (schéma 1) (Hartmeier W, 1986).

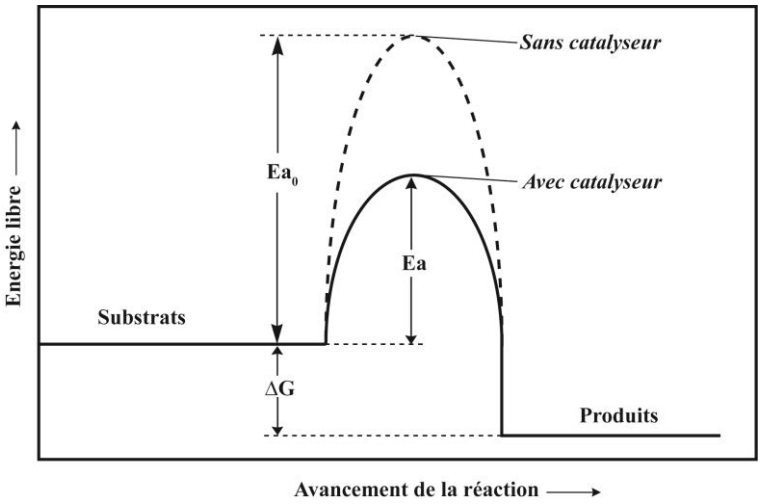


Schéma 1 : Représentation schématique des états d'énergie d'une réaction (bio)chimique (bio)catalysée. Ea_0 et Ea sont respectivement les énergies d'activation en absence et en présence de catalyseur. La variation d'énergie libre engendrée par la réaction (bio)chimique est notée ΔG. L'image est inspirée de Hartmeier W, 1986.

La biocatalyse est la stimulation d'une réaction chimique par un catalyseur de type biologique tel qu'une enzyme. Les biocatalyseurs entrent dans le cadre du développement de la chimie verte; une chimie développée dans le respect de l'homme et de l'environnement.

I. 1. 2. La biocatalyse : une chimie verte

La (bio)chimie est considérée comme verte lorsqu'elle respecte les douze principes représentés sur le schéma 2 (http://www.cnrs.fr/inc/recherche/programmes/docs/chimieverte). Les biocatalyseurs de type enzymatiques entrent dans le cadre de la chimie verte contrairement aux catalyseurs métalliques couramment utilisés. Les catalyseurs métalliques telles que le palladium ou le nickel, ajoutés en quantités stoechiométriques, sont toxiques pour l'environnement et difficiles à traiter après utilisation; ce qui va à l'encontre des principes 1; 3 et 9 de la chimie verte (schéma 2). La régio- et stéréo-spécificité des enzymes permet de réduire les étapes et de simplifier les schémas de synthèse (principes 2; 3; 4; 5; 8).

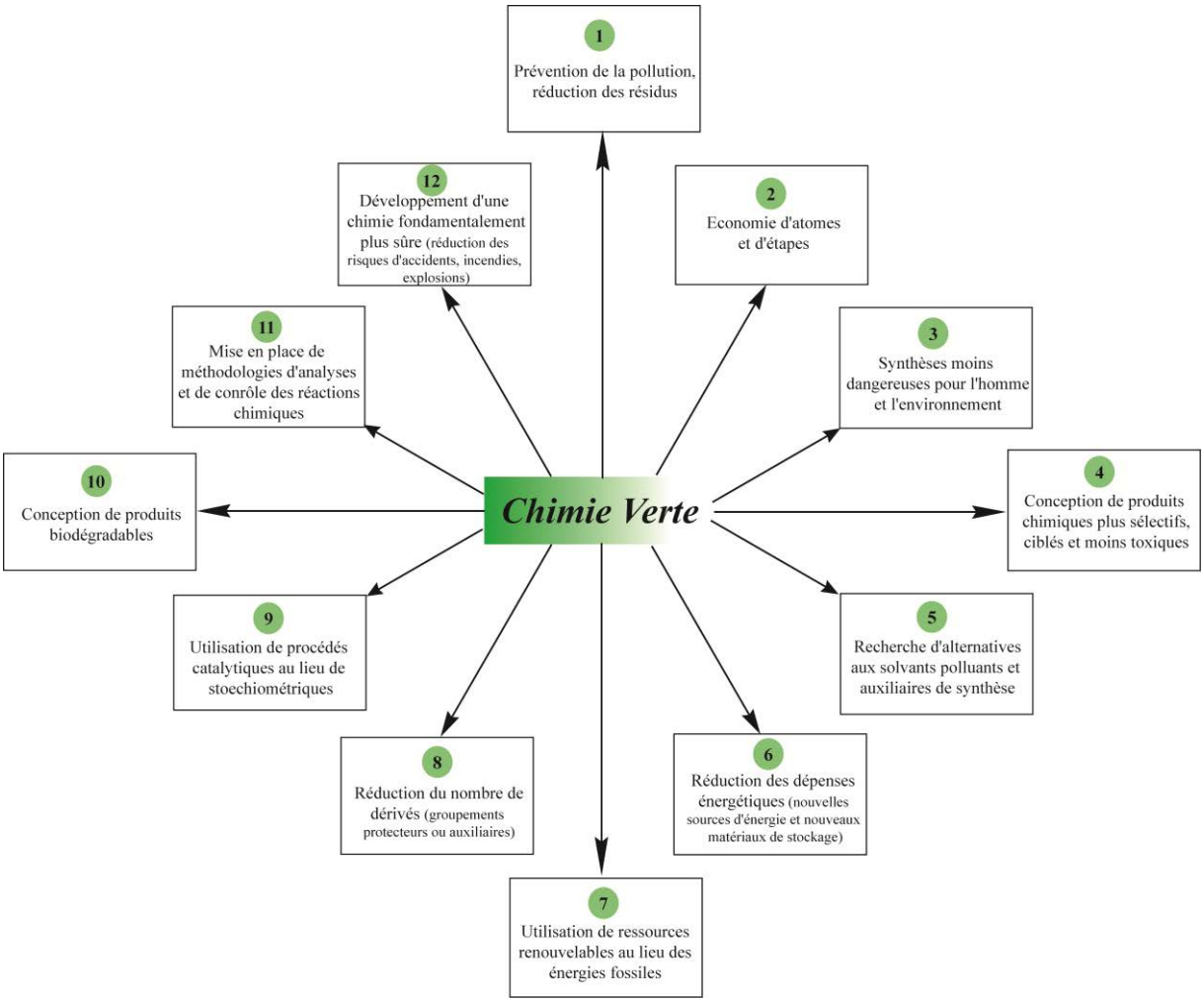


Schéma 2 : Représentation schématique des douze principes de la chimie verte selon le centre national de la recherche scientifique (CNRS). http://www.cnrs.fr/inc/recherche/programmes/docs/chimieverte.pdf

Les enzymes ne sont pas fondamentalement dangereuses dans la mesure où elles fonctionnent en très faibles quantité (10^{-6} - 10^{-9} M) et en raison de leur nature biocompatible (principes 9 et 12, schéma 2). L'immobilisation des biocatalyseurs ainsi que la mise en place de réacteurs biocatalytiques permettent de séparer facilement les produits réactionnels, de contrôler et de suivre les réactions (principe 11) (schéma 2) (Hartmeier W, 1986). De plus, les enzymes sont des biocatalyseurs renouvelables, catalysant essentiellement la biotransformation de substances issues de la biomasse (principe 7, schéma 2). Enfin, de par leur nature protéique, les biocatalyseurs fonctionnent en condition douce de température et de pression, ce qui minimise les risques d'accidents (principe 12), ne nécessite pas l'apport d'énergie extérieur (principe 6) et sont facilement dégradables sans former de résidus (déchets) difficiles à traiter (principe 1) (schéma 2).

Dans le cadre de la chimie verte, la biocatalyse est donc une discipline de choix par comparaison à la catalyse classique. Cependant, les milieux aqueux utilisés en biocatalyse sont dans certains cas inappropriés en raison de la faible solubilité des certains substrats tels que les acides gras et de la stabilité restreinte des biocatalyseurs. Par conséquent, l'utilisation des solvants organiques s'est avérée être nécessaire et la biocatalyse en milieu organique a alors vu le jour (Schulze B et Wubbolts MG, 1999).

I. 2. La Biocatalyse en milieu organique

I. 2. 1. Bref historique

Le développement des industries pharmaceutiques, sans cesse à la recherche entre autre de nouveaux procédés de synthèse de molécules énantiopures, a fait de la biocatalyse en milieu organique un domaine de recherche en expansion (Schulze B et Wubbolts MG, 1999; Zaks A et Dodds DR 1997). Les premières expériences de réactions (bio)catalysées en milieu organique datent des années 1930 (Sym EA, 1930 et 1936). A l'origine, l'idée d'utiliser les solvants organiques lors de réactions enzymatiques est née d'un problème technique : l'insolubilité des substrats des lipases (les acides gras) en milieu aqueux (Sym EA, 1936). Ce n'est qu'à partir des années 1980 que la biocatalyse en milieu organique est devenue un domaine de recherche à part entière. Durant cette période, Klibanov AM démontre l'intérêt de la biocatalyse en milieu organique. La première étude de Kiblanov AM montre l'extrême stabilité thermique de la lipase

pancréatique porcine en milieu organique; son temps de demi-vie est de 12 heures dans le mélange heptanol/tributyrine à 100°C tandis que l'enzyme est inactive en présence de 1% d'eau dans le même milieu (Zaks A et Klibanov AM, 1984). Durant les années qui suivirent, la démonstration fut faite qu'un certain nombre de biotransformations, impossible en solution aqueuses pour des raisons thermodynamiques, peuvent être catalysées en milieu organique. La biocatalyse en milieu organique s'est alors étendue à différentes classes d'enzymes. Ainsi, la peroxydase de raifort a été utilisée afin de dépolymériser la lignine, qui n'est pas son substrat naturel, dans le dioxane ou le diméthylformamide (Dordick JS *et al.* 1986). Une autre étude montre que la subtilisine Carlsberg de *Bacillus subtilis* ou l'α-chymotrypsine de pancréas bovin catalysent des réactions de trans-esterification d'alcools aliphatiques au lieu de réaction d'hydrolyse en présence de différents solvants organiques hydrophobes tels que l'octane ou l'hexadécane (Zaks A et Klibanov AM, 1988a). Aujourd'hui, les exemples de réactions biocatalysées en milieu organique sont nombreux et des applications industrielles ont vu le jour (Klibanov AM, 2001; Wohlgemuth R, 2010).

I. 2. 2. Avantages et inconvénients

L'utilisation des solvants organiques dans le domaine de la biocatalyse présente différents avantages et inconvénients listés dans le tableau 1. Parmi ces différents avantages, l'amélioration de la stabilité thermique et temporelle des biocatalyseurs, la possibilité de déplacer des équilibres réactionnels ainsi que la meilleure solubilité de certains substrats (tels que les acides gras) sont à l'origine du gain d'intérêt des solvants organiques dans le domaine de la biocatalyse (Brink LES *et al.*, 1988; Klibanov AM, 2001). Le principal inconvénient est la toxicité de ce type de milieu aussi bien pour l'Homme que pour l'environnement. La pénétration de solvants organiques dans l'organisme peut être à l'origine de pathologies telles que des lésions eczématiformes ou encore des encéphalopathies caractérisées par des altérations des fonctions cognitives (Iregren A, 1996). La toxicité des solvants organiques est liée à la libération des composés organiques volatiles (COV) pénétrant dans l'organisme par inhalation (Iregren A, 1996). Pour toutes ces raisons, les solvants organiques n'entrent pas strictement dans le cadre de la chimie verte et notamment en ce qui concerne les principes 3; 5 et 12 (schéma 2). Cependant, la biocatalyse en milieu organique reste avantageuse par comparaison aux catalyseurs métalliques usuels et offre de nouvelles opportunités de synthèse (Dordick JS, 1989).

Avantages	Inconvénients
○ Meilleure solubilité des espèces hydrophobes ○ Modification de la régio- et stéréo-spécificité de substrat ○ Déplacement des équilibres réactionnels ○ Réduction des réactions secondaires dépendantes de l'eau telles que l'hydrolyse des substrats et/ou produits ○ Limitation de la désorption d'enzymes immobilisées ○ Partition du biocatalyseur, du substrat et des produits (facilitant la séparation et améliorant le rendement) ○ Réduction de la contamination microbienne ○ Amélioration de la stabilité thermique et de la demi-vie des enzymes en milieux organiques non polaires	○ Utilisation de plus grande quantité d'enzyme ou de temps de réactions plus long en raison de l'inactivation du biocatalyseur ○ Dénaturation de la structure protéique en présence de solvants polaires ○ Observation de phénomènes d'inactivation interfaciale en systèmes biphasiques ○ Nécessité de contrôler l'activité thermodynamique de l'eau dans le cadre des réactions de condensations en solvants organiques ○ Toxicité des solvants organiques pour l'organisme et l'environnement

Tableau 1 : Principaux avantages et inconvénients de la biocatalyse en milieu organique (Sellek GA et Chaudhuri JB, 1999; Gupta MN, 1992; Dordick JS, 1989; Brink LES et al., 1988).

I. 2. 3. Exemples de réactions biocatalysées en milieu organique

Au départ limités aux réactions catalysées par des lipases dont les substrats sont insolubles dans l'eau, les solvants organiques sont aujourd'hui utilisés avec différentes classes d'enzyme jouant un rôle dans l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique (Zaks A et Dodds DR, 1997). La demande accrue des industries pharmaceutiques et agroalimentaires de molécules (ou intermédiaires) de structures complexes et à moindre coût a entraîné le développement de la biocatalyse en milieu organique (Schulze B et Wubbolts MG 1999, Zaks A et Dodds DR, 1997). Le développement de la biocatalyse est d'autant plus important pour les industries pharmaceutiques que la FDA ("Food and Drug Administration" aux Etats-Unis) exige un excès énantiomérique supérieure à 99,5 % afin que la molécule soit commercialisée. Cet excès énantiomérique suppose, dans le cas de molécules difficiles à synthétiser par voie chimique, un certain nombre d'étapes de protection et de déprotection coûteuses aussi bien en temps qu'en coût de revient ce qui ne cadre pas avec les principes de la chimie verte (Pollard DJ et Woodley JM, 2006). Les propriétés régio- et stéréo-sélectives des enzymes font de la biocatalyse une option qui, aujourd'hui, passe du simple postulat à l'application industrielle, comme le titre cet article de 2006 : "Biocatalysis for pharmaceutical intermediate : the futur is now" (Pollard DJ et Woodley JM, 2006). Quelques exemples d'application de la biocatalyse en milieu organique seront présentés.

I. 2. 3. A. Réactions catalysées par les hydrolases

Les hydrolases sont les plus communément utilisées dans des processus industriels. Selon la nomenclature officielle, elles correspondent à la classe 3 d'enzyme ("Enzyme Commission number" 3; EC 3). Les hydrolases catalysent le clivage hydrolytique de liaisons de type C(O)-O; C(O)-N et de quelques autres liaisons telles que les liaisons phosphate P(O)-O (schéma 3) (Krishna SH, 2002).

I. 2. 3. A. 1. Les lipases

Les lipases sont des hydrolases particulières catalysant l'hydrolyse d'esters carboxyliques en milieu aqueux (schéma 3) (Krishna SH, 2002). Dans la nature, ces enzymes participent à la digestion en dégradant les triglycérides. Les lipases sont parfois associées aux membranes biologiques et sont intrinsèquement actives en milieu organique (Verger R *et al.*, 1976; Zaks A

et Klibanov AM, 1984 et 1985). En présence de solvants organiques, les lipases catalysent des réactions d'alcoolyse (schéma 3a) ainsi que des réactions de trans- et inter-esterification (schéma 3b) (Zaks A et Klibanov AM, 1984 et 1985).

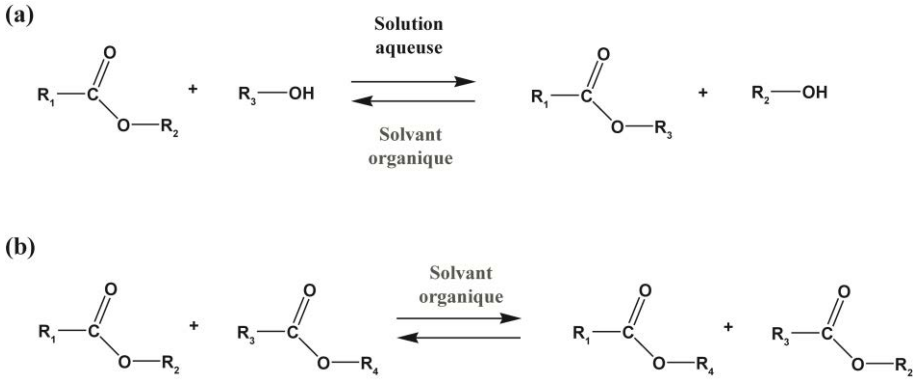


Schéma 3 : Schéma représentant les réactions catalysées par les lipases en milieux aqueux (a) ou organiques (b). En milieux aqueux, les lipases catalysent des réactions d'hydrolyse/alcoolyse. En milieu organique, la réaction inverse de condensation peut avoir lieu. En solvant organique des réactions d'inter- et de trans-esterification peuvent également avoir lieu (b).

Un grand nombre d'études, plus ou moins abouties dans des applications industrielles, utilisent des lipases en milieu organique (Zaks A et Dodds DR, 1997; Khmelnitsky YL et Rich JO, 1999; Wohlgemuth R, 2010). La synthèse d'inhibiteurs de l'hydroxy-méthyle-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase par l'intermédiaire de lipases reste aujourd'hui l'exemple le plus pertinent (Krishna SH, 2002). L'HMG-CoA réductase est une enzyme intervenant dans la synthèse du cholestérol. Son inhibition réduit le taux de cholestérol et de triglycérides dans le sang minimisant ainsi les risques d'accidents cardiovasculaires (Cziraky MJ *et al.*, 2009). La mort suite à des accidents cardiovasculaires (accident vasculaire cérébral, crise cardiaque) était jusqu'en 2007 la première cause de mortalité en France et dans le monde (légèrement dépassé aujourd'hui par les tumeurs) (http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=T10F091). L'exemple d'inhibiteur de l'HMG-CoA réductase le plus parlant est le Lipitor® (schéma 4b), commercialisé par Pfizer. En 2008, le Lipitor® a été la meilleure vente de produit de la marque, pour 12,4 milliards de dollars de chiffre d'affaire (rapport annuel de Pfizer). Bristol-Myers Squibb a également utilisé une lipase (la lipase de *Pseudomonas Cepiaca*) afin de synthétiser un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase (schéma 4a) (Krishna SH, 2002). Au cours de cette synthèse, la lipase catalyse l'acétylation de l'énantiomère non désiré dans du toluène ce qui conduit à l'obtention d'un produit de configuration R – (+) avec rendement molaire de 48% et

une pureté optique (excès énantiomérique) de 98 % (schéma 4b) (Patel RN *et al.*, 1992; Zaks A et Dodds DR, 1997).

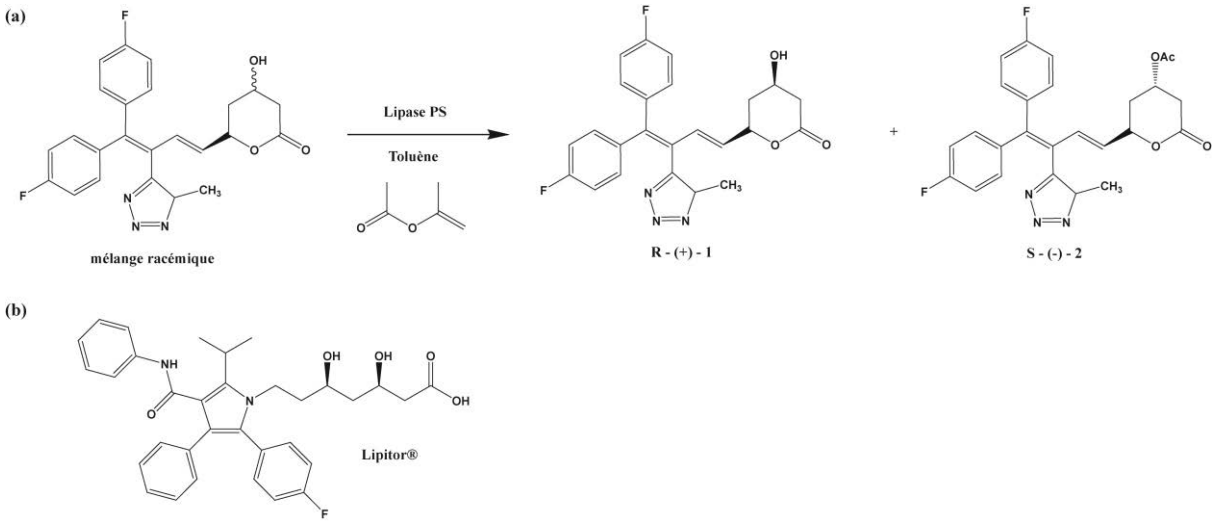


Schéma 4 : Représentation d'un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase faisant intervenir des lipases en milieu organique. (a) Résolution du mélange racémique de [4-[4-alpha,6-beta (E)]]-6-[4,4-bis(4-fluorophenyl)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,3-butadienyl]-tetrahydro-4-hydroxy-2H-pyran-2-one afin d'aboutir au produit ***2*** *S – (-) acétylé et au réactif* ***1*** *de configuration R – (+) qui est le produit désiré. La réaction est catalysée par la lipase PS dans du toluène et le donneur d'acyle est l'acétate d'isoprenyl. Le schéma (b) montre la structure moléculaire du Lipitor®.*

I. 2. 3. A. 2. Les peptidases

Les peptidases ont été utilisées en solvants organiques afin de catalyser des réactions thermodynamiquement impossibles en milieu aqueux (Kimura Y *et al.*, 1990). En conditions physiologiques, les peptidases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques (schéma 5a). L'essentiel des travaux concernant les peptidases en milieu organique a été réalisé sur des protéases à sérine. En milieu organique, les peptidases peuvent catalyser des réactions de condensations, inverses de celles catalysées en milieu aqueux (schéma 5a) (Kimura Y *et al.*, 1990). L'eau peut également être remplacée par des substrats hydroxylés (telles que les alcools aliphatiques) et les peptidases catalysent alors des réactions d'alcoolyse (schéma 5b) (Zaks A et Kilbanov AM, 1988a).

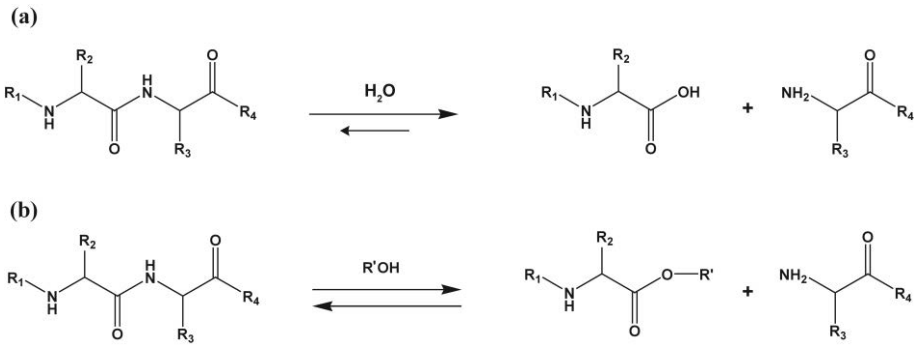


Schéma 5 : Réactions catalysées par les peptidases. Le schéma (a) montre la réaction physiologique d'hydrolyse d'une liaison peptidique, la réaction inverse peut être catalysée en milieu organique. Le schéma (b) montre la réaction d'alcoolyse catalysée en milieu organique.

Par exemple, la subtilisine Carlsberg de pancréas bovin et l'α-chymotrypsine de *Bacillus subtilis* catalysent la réaction de trans-esterification entre l'ester ethylique de la N-acétyle-L-phénylalanine et le n-propanol dans de l'octane tandis que la réaction est thermodynamiquement impossible en milieu aqueux (Zaks A et Klibanov AM, 1988a).

Plus récemment les peptidases en milieu organique ont été utilisées afin de synthétiser des molécules d'intérêt pharmaceutique tel que la castanospermine (Delink DL et Margolin AL, 1990). La castanospermine est un alcaloïde issu d'une plante (*Castanospermum australe*), utilisé pour inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Taylor DL *et al.*, 1994). Les glycoprotéines à la surface du virus, et notamment gp120 et gp41, jouent un rôle primordial dans l'interaction hôte-virus. Ces alcaloïdes inhibent la glycosidase I participant à la maturation de ces glycoprotéines de surface. La subtilisine Carlsberg de *Bacillus subtilis* catalyse l'acylation régiosélective de la castanospermine dans de la pyridine comme solvant (schéma 6) (Delink DL et Margolin AL, 1990). Les dérivés O-acylés de la castanospermine sont 20 fois plus actifs que la molécule de départ (Delink DL et Margolin AL, 1990; Zaks A et Dodds DR, 1997).

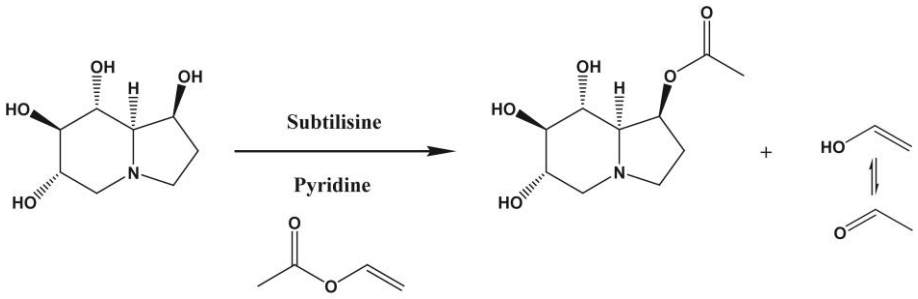


Schéma 6 : Acylation de la castanospermine par la subtilisine Carlsberg de Bacillus subtillis en milieu organique. Le donneur d'acyle est l'acétate de vinyle.

La réaction de condensation entre acides aminés, catalysée par les peptidases en milieu organique, a été utilisée afin de synthétiser l'édulcorant de synthèse : le Z-aspartame (Isowa Y *et al.*, 1979). Le Z-aspartame (ou *N*-(benzoyloxycarbonyl)-aspartame) est un dipeptide de formule : Z-L-Asp-L-Phe-OMe. La synthèse de ce dipeptide par voie chimique entraîne la formation du sous produit β-L-Asp-L-Phe-OMe dont le goût est amer (Yagasaki M et Hashimoto S, 2008). La thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* a été utilisée afin de synthétiser le Z-Aspartame dans de l'acétate d'éthyle (schéma 7) (Nakanishi K *et al.*, 1990). La sélectivité de l'enzyme permet l'utilisation du D ou L-Asp au lieu du L-Asp seulement et n'entraîne pas la formation de la forme β de l'aspartame (Yagasaki M et Hashimoto S, 2008).

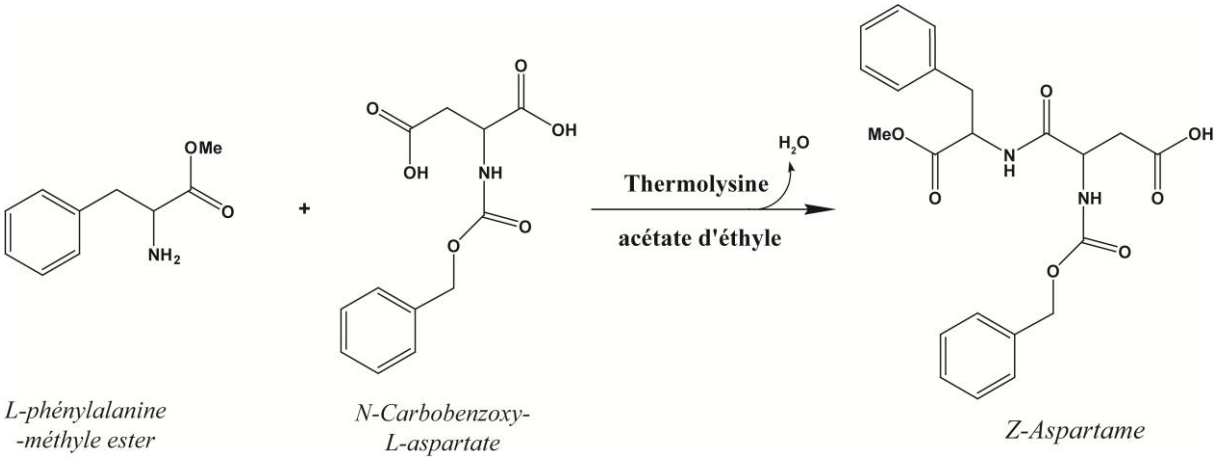


Schéma 7 : Synthèse du précurseur de l'aspartame catalysé par la thermolysine dans de l'acétate d'éthyle.

I. 2. 3. B. Les oxydo-réductases

Les oxydo-réductases (EC 1) catalysent le transfert d'électrons d'une molécule à une autre. L'espèce qui reçoit les électrons est l'oxydant tandis que l'espèce qui les donne est le réducteur. Selon la nature de l'accepteur d'électrons, deux sous classes d'oxydo-réductases sont distinguées : les oxydases d'une part, utilisant l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électrons; et les déshydrogénases d'autre part, utilisant un cofacteur tel que le $NAD(P)^+$ ou le FAD comme accepteur d'électrons (schéma 8).

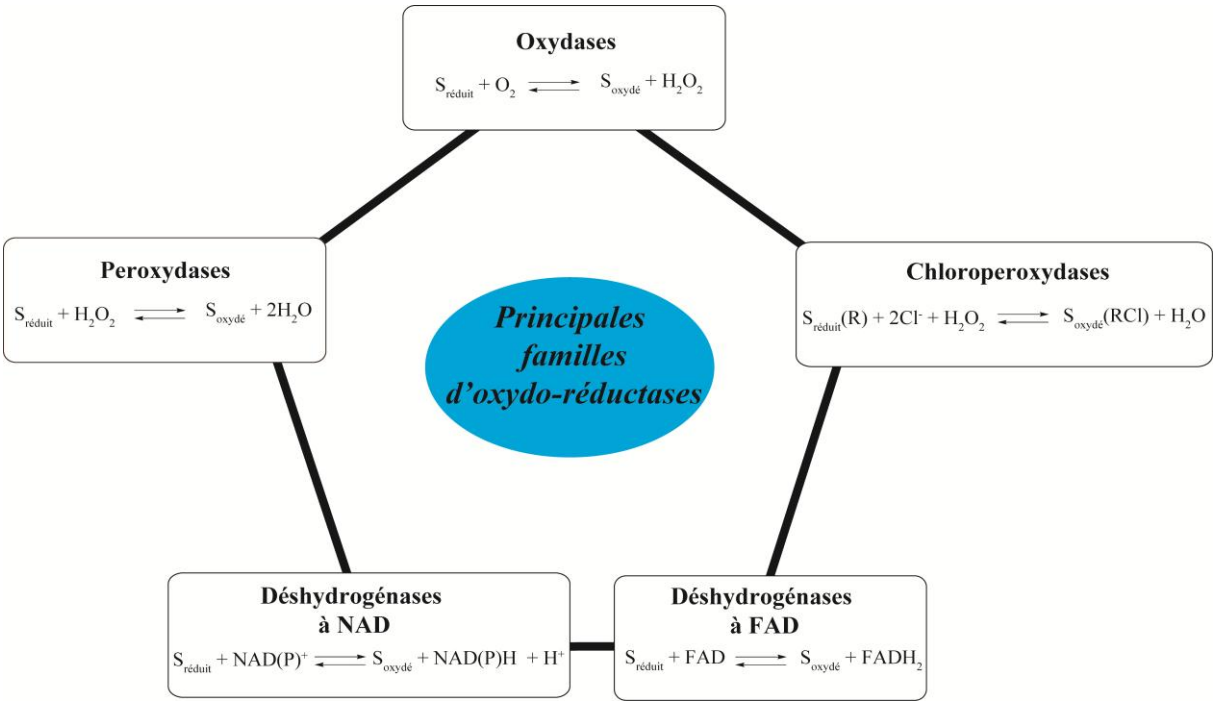


Schéma 8 : Réactions catalysées par les principales familles d'oxydo-réductases. Dans le cas des chloroperoxydases, l'oxydation du substrat conduit à sa chloration.

I. 2. 3. B. 1. Les oxydases

En milieu organique, les oxydases catalysent l'oxydation ou la réduction de substrats différents de leur substrat naturel (Dordick JS, 1986). Par exemple, la peroxydase de raifort catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau selon un processus à un électron en solution aqueuse. En présence de 95% de dioxane, l'enzyme catalyse l'oxydation de la lignine ce qui conduit à sa dépolymérisation (Dordick JS, 1986). La lignine est une composante essentielle du bois, lors du processus de fabrication du papier, la dépolymérisation de la lignine ou delignification est une étape nécessaire à l'extraction de cellulose et d'hemi-cellulose de bois.

I. 2. 3. B. 2. Les déshydrogénases

Les déshydrogénases sont largement utilisées lors de la synthèse de molécules d'intérêt pharmaceutique (Matsuda T *et al.*, 2009). Par exemple, le (*S*)-4-phenyl-2-butanol est un précurseur de la synthèse d'agents anti-hypertensifs; sa synthèse à partir du 4-phenyl-2-butanone par l'intermédiaire de l'alcool déshydrogénase de *Thermoanaerobacter ethanolicus* a été réalisée dans de l'hexane (schéma 9) (Matsuda T *et al.*, 2009).

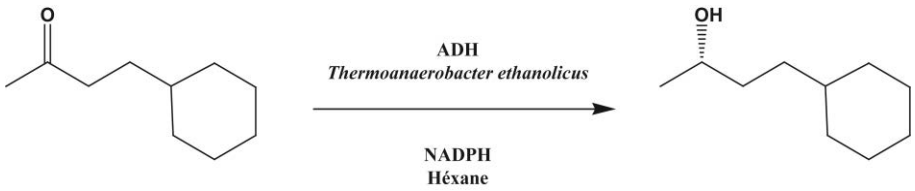


Schéma 9 : Réduction assymétrique du 4-phényl-2-butanone par l'alcool déshydrogénase en milieu organique.

Enzyme	Réaction catalysée	Rôle du produit	Solvant utilisé	référence
Lipase PS de *Pseudomonas cepiaca*	Résolution du [4-[4-alpha,6-beta (E)]]-6-[4,4-bis(4-fluorophenyl)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,3-butadienyl]-tetrahydro-4-hydroxy-2H-pyran-2-one	Inhibiteur de l'HMG-CoA réductase (anti-cholestérol)	toluène	Patel RN *et al.*, 1992
Subtilisine Carlsberg de *Bacillus subtilis*	Acylation de la castanospermine	Inhibition de la réplication du VIH	pyridine	Delink DL et Margolin AL, 1990
Thermolysine de *Bacillus subtilis*	Synthèse du Z-aspartame	Edulcorant de synthèse	acétate d'éthyle	Isawa Y *et al.*, 1976 Nakanishi K *et al.*, 1990
Alcool déshydrogénase de *Thermoanaerobacter ethanolicus*	Synthèse du (*S*)-4-phenyl-2-butanol	Précurseur d'agents anti-hypertensifs	hexane	Matsuda T *et al.*, 2009

Tableau 2 : Tableau récapitulant les exemples de réactions biocatalysées en milieu organique.

I. 2. 4. Propriétés des enzymes en solvants organiques et forces mises en jeu

L'étude des enzymes en milieu organique nécessite de prendre en considération différents paramètres liés les uns des autres.

I. 2. 4. A. Nature et classification des solvants organiques

Ces solvants organiques sont des liquides qui, comme leur nom l'indique, sont composés de molécules organiques (contenant des atomes de carbone). Ces solvants sont classés en trois catégories; soit en fonction de leur capacité à interagir avec l'eau soit en fonction de leur nature chimique (tableau 3).

Selon la capacité ou non du solvant à former des liaisons hydrogène les trois classes de solvants organiques sont :

- *les solvants protiques polaires*; capables de former des liaisons hydrogène (avec l'eau) et dont le moment dipolaire n'est pas nul.
- *les solvants aprotiques polaires*; capables d'accepter des liaisons hydrogènes et dont le moment dipolaire est non nul
- *les solvants aprotiques apolaires*; n'interagissant pas avec l'eau.

Les solvants peuvent également être classés en trois classes selon leur composition :

- les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques
- les solvants oxygénés
- les solvants halogénés

Classification	Classe de solvant	exemples
Réactivité	- Protiques polaires - Aprotiques polaires - Aprotiques apolaires	- Méthanol, éthanol - Diméthylsulfoxyde, diméthylformamide - Benzène, octane
Composition	- Hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques - Solvants oxygénés - Solvants halogénés	- Octane, benzène - Ethanol, acétone, éther diéthylique - Diméthylsulfoxyde, diméthylformamide

Tableau 3 : Classification des solvants organiques.

Parmi ces différents critères, la miscibilité du solvant à l'eau influe directement sur la thermodynamique des réactions.

I. 2. 4. B. Les systèmes réactionnels

Considérant l'eau et les solvants organiques, il y a 4 combinaisons de systèmes réactionnels possibles. Les considérations thermodynamiques seront différentes selon le système réactionnel utilisé (Halling PJ, 1994; Kvittingen L, 1994). Les 4 combinaisons sont :

- les solutions aqueuses classiques, contenant moins de 20 % (v/v) de solvants organiques
- les mélanges de solvants aqueux contenant plus de 20 % (v/v) de solvants organiques miscibles à l'eau (schéma 10c)
- les systèmes biphasiques qui sont l'association de solvants aqueux et de solvants organiques non miscibles (schéma 10b)
- les systèmes monophasiques que sont les solvants organiques purs (schéma 10a) (Sellek GA et Chaudhuri JB, 1999; Krichna SH, 2002).

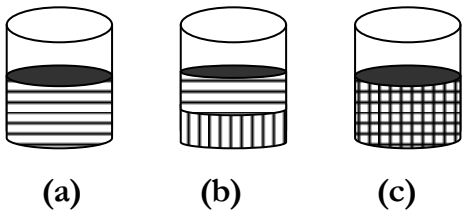


Schéma 10 : Représentations schématiques des différentes phases utilisées en biocatalyse. Solvant pur (a), milieu biphasique (b) et mélanges (c).

Les paramètres thermodynamiques (viscosité, activité de l'eau, pH, partition des espèces…) à considérer, et influençant directement la réaction biocatalysée, varieront selon le système réactionnel (Halling PJ, 1994; Kvittingen L, 1994).

Dans le cas d'un système monophasique ou d'un mélange, la viscosité du milieu aura une incidence directe sur la diffusion des espèces et par conséquent sur leur probabilité à interagir les unes avec les autres (Halling PJ, 1994). L'augmentation de la viscosité du milieu induira donc une diminution de l'activité enzymatique. La miscibilité du solvant organique à l'eau est également à prendre en considération. La répartition des molécules d'eau, entre la protéine et le solvant, variera selon la polarité du solvant et sa miscibilité à l'eau (voir section I. 2. 4. D. 2.). Si le solvant organique est polaire et miscible à l'eau, les molécules d'eau interagiront avec le solvant et l'activité de l'enzyme diminuera à mesure que la concentration du solvant est élevée (Halling PJ, 1994).

Dans le cas d'un système réactionnel biphasique, la partition des espèces entre les différentes phases est à prendre en compte (Halling PJ, 1994). Si l'on suppose une réaction biocatalysée dans un milieu composé de deux phases A et B : l'activité observée pour l'ensemble du système est en réalité une moyenne des activités observées dans chacune des phases. Cette activité dépend de la partition du biocatalyseur et du substrat entre les deux phases. L'activité dans une phase donnée peut être décrite selon l'équation 1 où a_A est l'activité observée dans la phase A, γ est le coefficient d'activité du biocatalyseur dans cette phase et X est la fraction molaire du biocatalyseur.

$$a_A = \gamma_A \cdot X_A \qquad (1)$$

Le coefficient de partition (P) est défini à l'équilibre selon l'équation 2, il correspond au rapport des fractions molaires du biocatalyseur dans chacune des phases. Pour des solutions diluées, le coefficient de partition correspond au rapport des concentrations (C) de biocatalyseur.

$$\gamma_A \cdot X_A = \gamma_B \cdot X_B \qquad (2)$$

$$\frac{\gamma_A}{\gamma_B} = \frac{X_B}{X_A} = \frac{C_B}{C_A} = P$$

La partition du biocatalyseur et du substrtat entre les différentes phases est souvent omise et seule la vitesse globale de la réaction est considérée. Ceci rend l'interprétation des résultats issus de la biocatalyse en système biphasique sujette à discussion.

I. 2. 4. C. La nature de l'enzyme

La nature de l'enzyme utilisée est un facteur primordial et déterminant pour l'analyse de son comportement en milieu organique. La grande majorité des travaux concernant la biocatalyse en milieu organique a été réalisée en présence de lipases. Ces enzymes lipolytiques, naturellement associées aux membranes biologiques, sont intrinsèquement actives à faible activité de l'eau ("a_w : water activity") (Klibanov AM, 1989; Zaks A et Dodds DR, 1997). Ces enzymes fonctionnent sous forme solide (lyophilisée), insoluble, dans des systèmes réactionnels monophasiques constitués de solvants organiques apolaires telles que l'hexane ou la tributyrine (tributyrylglycérol) faisant office de substrat et de milieu réactionnel (Zaks A et Klibanov AM, 1984 et 1985). Les lipases étant des enzymes particulières fonctionnant à proximité des membranes biologiques, l'étude de ces dernières en milieu organique ne permet pas une extrapolation de l'utilisation de tous les biocatalyseurs en milieu organique. D'autres classes d'enzymes sont actives en milieux organiques presque anhydres, tels que les peptidases (α-chymotrypsine et subtilisine) (Zaks A et Klibanov AM, 1988a), et font office d'exemple : *"chymotrypsin and subtilisin are catalytically active in organic solvents, there is no reason why other enzymes should not be."* (Klibanov AM, 1989). Cependant, les différentes études réalisées en milieux organiques montrent que les enzymes, autres que les hydrolases, sont faiblement actives en milieu organique.

Par exemple, les enzymes de la classe des oxydo-réductases sont fortement dépendantes de l'activité de l'eau du milieu. L'activité de trois oxydo-réductases issues de différents organismes (l'alcool oxydase de *Pichia pastoris* (EC 1.1.3.13), la polyphénol oxydase de champignon (EC 1.10.3.1) et l'alcool déshydrogénase de foie de cheval (EC 1.1.1.1)) a été mesurée en présence de différents solvants organiques et de différentes concentrations en eau. En présence de solvant organique, l'activité enzymatique des oxydoréductases augmente parallèlement à la concentration en eau. Ce type d'enzyme est donc plus sensible aux effets

délétères des solvants organiques et notamment en raison de l'utilisation de cofacteurs (Zaks A et Klibanov AM, 1988b).

I. 2. 4. D. Paramètres thermodynamiques influençant les réactions biocatalysées en milieu organique

I. 2. 4. D. 1. Le Log $P_{o/w}$

I.2.4.D.1.a Définition

Le log $P_{o/w}$ est un paramètre définissant l'hydrophobicité du solvant, il correspond à la partition d'une molécule X entre le 1-octanol et l'eau dans un système biphasique. Il est calculé à partir de la relation (3).

$$P_X = [X]_{octanol} / [X]_{eau} \quad (3)$$

Où P_X et [X] sont respectivement le coefficient de partition et la concentration de la molécule X. Les solvants dont le log $P_{o/w}$ est inférieur à 2 sont considérés comme miscibles à l'eau, tels que les alcools, esters et ethers dont la chaîne alkyle est de petite taille (2-4 carbones). Inversement, les solvants hydrophobes dont le log $P_{o/w}$ est supérieur à 4, tels que le décanol ou l'hexadécane, ne sont pas miscibles à l'eau (Dordick JS, 1989).

I.2.4.D.1.b Conséquences sur les réactions biocatalysées en milieu organique

En ce qui concerne les réactions biocatalysées en milieu organique, les solvants miscibles à l'eau ont généralement un effet délétère sur l'activité enzymatique (Singer SJ, 1962; Dordick JS, 1989). Ce type de solvant interagit avec les molécules d'eau liées à l'enzyme (Yang L *et al.*, 2004), nécessaires à son activité et à sa structuration, ce qui a pour conséquence l'inactivation de cette dernière (voir section *I. 2. 4. D. 2. b.*).

Le paramètre log P peut donc être utilisé pour le choix du solvant, il permet de prévoir le système réactionnel (monophasique ou biphasique) et d'avoir une idée de l'effet du solvant sur

l'activité enzymatique. Ainsi, les solvants dont le log P est inférieur à 2 sont miscibles à l'eau et auront tendance à inactiver les enzymes de manière plus importante que les solvants non miscibles à l'eau et dont le log P est supérieur à 4.

I. 2. 4. D. 2. Activité de l'eau

I.2.4.D.2.a Définition

L'activité de l'eau a_w ("water activity") décrit la distribution de l'eau entre différentes phases pouvant entrer en compétition pour sa fixation. L'activité de l'eau donne une indication sur l'association de l'eau avec une molécule ou un solvant. Elle est décrite selon l'équation 4 et correspond au rapport de la pression de vapeur de l'eau d'une substance (solution ou mélange, p) donnée à la pression de vapeur de l'eau pure (p_0).

$$a_w = \frac{p}{p_0} \qquad (4)$$

Sur une échelle de 0 à 1, l'activité de l'eau est décrite à la disponibilité de l'eau dans un mélange (Halling PJ, 1994; Singer SJ, 1962). Généralement, les enzymes sont faiblement solubles dans les solvants organiques non miscibles à l'eau. Dans ce type de solvants, l'activité de l'eau est proche de 1 et cela en présence de faibles quantités d'eau. Par exemple, l'activité de l'eau du toluène en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,99. Inversement plus le solvant est miscible à l'eau, et par conséquent entrera en interaction avec cette dernière, et moins l'activité de l'eau sera importante pour une même fraction molaire. Par exemple, l'activité de l'eau de l'éthanol en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,2 (Halling PJ, 1994).

I.2.4.D.2.b Conséquences sur les réactions biocatalysées en milieu organique

L'activité de l'eau joue un rôle essentiel dans le domaine de la biocatalyse en milieu organique (Valivety *et al.*, 1992). En ce qui concerne les réactions naturellement biocatalysées en solutions aqueuses, tels que l'hydrolyse ou les réactions d'oxydo-réduction, l'activité enzymatique sera diminuée à faible a_w car l'eau n'est plus disponible pour la réaction (Halling PJ, 1994; Singer SJ, 1962; Zaks A et Russel AJ, 1988; Zaks A et Klibanov AM, 1988b). Inversement, les

réactions non naturelles de condensations (peptidases) et d'alcoolyse (lipases) ne seront possibles qu'à faible activité de l'eau car l'eau n'est plus disponible pour la réaction inverse d'hydrolyse (Halling PJ, 1994; Zaks A et Klibanov AM, 1985).

Afin de contrôler l'activité de l'eau, Kuhl et Halling ont ajouté des hydrates de sels solides dans le milieu réactionnel (Kuhl P et Halling PJ, 1990 et 1991). Les paires de sels hydratés vont capter ou libérer des molécules d'eau et ainsi réguler l'activité de l'eau dans le milieu (schéma 11) (Kvittingen L *et al.*, 1992). La limite de cette méthode est qu'il faille trouver une paire de sels n'interagissant pas avec le milieu et qui ne soit pas liquide dans les conditions réactionnelles. Or, beaucoup de sels saturés en eau ont un point de fusion relativement bas. Par exemple, le $Na_2CO_3.10H_2O$ a un point de fusion de 32°C (Kvittingen L, 1994).

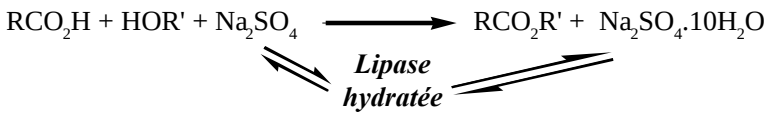


Schéma 11 : Fonctionnement des hydrates de sels en milieu organique.

L'activité d'une enzyme est associée à sa structure native et cette dernière est maintenue par une somme d'interactions non covalentes de faible énergie : liaisons hydrogènes, ioniques, de Van Der Waals et hydrophobes (Tanford C et De PK, 1961). L'eau joue un rôle important dans la mise en place et la préservation de ces liaisons de faible énergie et par extension de la structure secondaire et tertiaire des enzymes (Singer SJ, 1962; Wangikar PP *et al.*, 1997). Selon la nature du solvant organique utilisé, l'eau va se répartir de manière différente dans le milieu, ce qui aura une incidence directe sur la structure de l'enzyme (figure 1) (Singer SJ, 1962; Yang L *et al.*, 2004; Halling PJ, 1994).

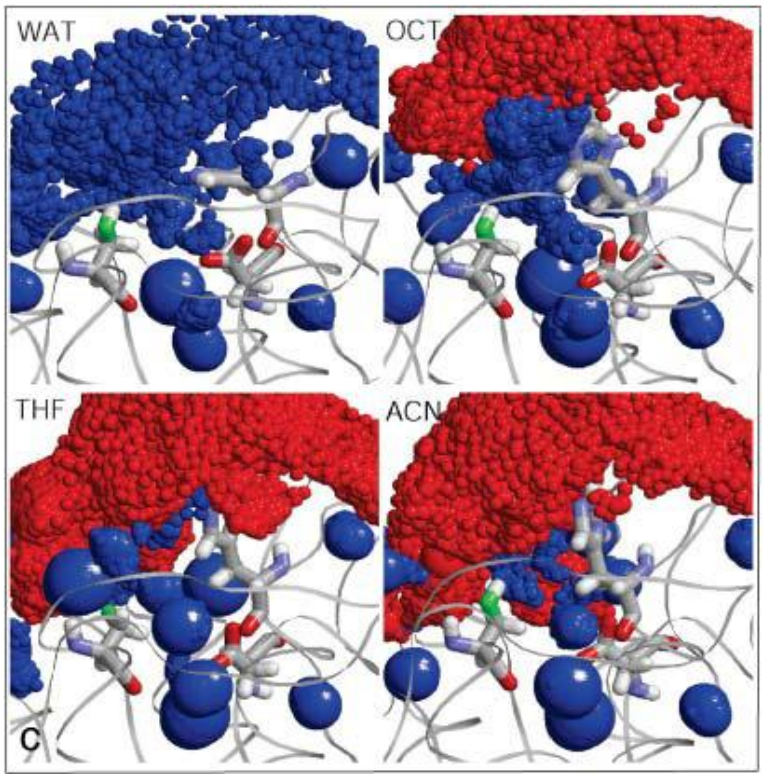


Figure 1 : Interaction de différents solvants dans le site actif de la subtilisine. Carte de densité tridimensionnelle de l'eau (WAT), de l'octane (OCT), du tetrahydrofurane (THF) et de l'acétonitrile (ACN) à proximité du site actif. Le squelette peptidique est visualisé sous forme ruban tandis que la triade catalytique (Asp, His et Ser) est représentée sous forme de bâtonnets ("Sticks"). L'atome d'oxygène de la sérine est coloré en vert pour le distinguer de la carte de densité des solvants à proximité. L'ensemble des densités moyennes de l'eau (bleu) et des solvants organiques (rouge) sont représentés par des sphères dont les rayons sont proportionnels à la densité locale. Par conséquent, les grandes sphères bleues indiquent des molécules d'eau structurale fortement liées tandis que les sphères de petite taille correspondent à des molécules d'eau faiblement liées ou mobiles dans le site actif (Yang L et al., 2004).

La dynamique moléculaire de la subtilisine en présence d'un solvant organique non polaire (l'octane) et de deux solvants polaires (le tetrahydrofurane et l'acétonitrile) montre que les solvants organiques polaires interagissent avec l'eau et s'infiltrent au sein de la structure tertiaire des protéines, tandis que les solvants non polaires n'interagissent pas avec l'eau et tendent à préserver l'hydratation essentielle du biocatalyseur (figure 1) (Yang L *et al.*, 2004). En interagissant avec l'eau de la couche d'hydratation essentielle des protéines et la protéine elle-même, les solvants organiques polaires tels que le tetrahydrofurane ou l'acétonitrile, sont susceptibles d'interférer avec les liaisons de faible énergie et induisent des variations structurales pouvant aller jusqu'à la dénaturation protéique (Wangikar PP *et al.*, 1997; Zhang LY *et al.*, 2009; Kamal JKA *et al.*, 2004). Les solvants organiques non polaires, tels que

l'octane, ne vont pas ou très peu interagir avec l'eau (figure 1) (Yang L *et al.*, 2004; Zaks A et Klibanov AM, 1988b). Cette particularité peut être utilisée afin d'étudier la couche d'hydratation essentielle des enzymes (Kamal JKA *et al.*, 2004). Tandis que les solvants polaires induisent la dénaturation protéique lorsque leur concentration est importante, les solvants non polaires induisent quant à eux la rigidification de la structure protéique (Affleck R *et al.*, 1992; Yang L *et al.*, 2004; Wangikar PP *et al.*, 1997). On parle alors du pouvoir lubrificateur de l'eau; un phénomène correspondant à l'augmentation de la flexibilité des protéines en milieu organique non polaire lorsque l'activité de l'eau augmente (Clark DS, 2004; Hudson EP *et al.*, 2005).

I. 2. 4. D. 3. Le pH : effets contre ions et acide/base

I.2.4.D.3.a Définition et effets au niveau protéique

Les enzymes sont actives sur une gamme de pH plus ou moins large. Le pH dicte l'état de protonation des différents groupements des chaînes latérales des acides aminés présents à la surface et dans le site actif de l'enzyme (tableau 4) et ceci participe à la structuration des protéines.

Acide aminé	Fonction de la chaîne latérale	pK_a
Cys	Sulfhydryle	8,18
Asp	Carboxyle	3,90
Glu	Carboxyle	4,07
His	Imidazole	6,04
Lys	Amine primaire	10,54
Arg	Amine secondaire	12,48
Tyr	Hydroxyle/phenol	10,46

Tableau 4 : Tableau reportant les acides aminés dont la chaîne latérale comporte un groupement protonable.

I.2.4.D.3.b Conséquences du pH sur les réactions biocatalysées en milieu organique

En ce qui concerne les enzymes utilisées sous forme lyophilisée (à l'état solide) en milieu organique non polaire; le pH de la solution à partir de laquelle l'enzyme a été lyophilisée influe directement sur son activité en milieu organique. On parle alors de "mémoire pH" ("pH memory") (Zaks A et Klibanov AM, 1985 et 1988a; Zaks A et Russel AJ, 1988). L'utilisation de ces enzymes résistantes à la lyophilisation dans des solvants organiques non polaires permet d'ajuster le pH car une très faible quantité d'eau (< 0,1 fraction molaire) suffit pour avoir une activité de l'eau proche de 1 en présence de ce type de solvant (Halling PJ, 1994; Zaks A et Klibanov AM, 1985).

En présence de solvants organiques et notamment en présence de solvants polaires, la partition de ces sels entre les différentes composantes du système (eau; solvant; protéine) fait que le pH réel est difficile à estimer. La définition du pH devient dès lors problématique dans la mesure où le pH apparent, estimé pour l'ensemble du système à l'équilibre, ne reflète pas nécessairement le pH réel à proximité de la couche d'hydratation de l'enzyme (Halling PJ, 1994). A l'image de l'activité de l'eau, le pH est également dépendant de la polarité du solvant. La mesure de pH en présence de solvant organique plus ou moins polaire montre que le pH diminue lorsque la polarité du milieu augmente (Brown L *et al.*, 1990).

Il est difficile de savoir si la diminution du pH parallèlement à l'augmentation de la polarité du milieu est liée à la diminution de l'activité de l'eau avec la polarité du milieu (voir section I. 2. 4. D. 2.) et quel est l'impact de cette variation de pH sur l'inactivation des enzymes en présence de solvants organiques polaires. Néanmoins, ces effets acides/bases jouent certainement un rôle important dans le domaine de la biocatalyse en milieu organique et sont encore aujourd'hui en cours d'étude (Halling PJ, 2000).

I. 2. 5. Préparation du biocatalyseur pour des réactions en solvant organique

La diminution de l'activité enzymatique en milieux organiques est associée à la dénaturation des enzymes (Wangikar PP *et al.*, 1997). Un certain nombre d'approches ont été utilisées afin de maintenir la structure et l'activité des enzymes en milieux organiques. Les différentes approches sont classées en deux parties : d'une part les méthodes physico-chimiques cherchant à améliorer la structure/activité des enzymes en milieu organique à partir de biocatalyseurs à l'état natif; et d'autre part les méthodes de type ingénierie des enzymes consistant à modifier l'enzyme au niveau génique par l'intermédiaire de techniques de biologie moléculaire.

I. 2. 5. A. Méthodes Physico-chimiques

I. 2. 5. A. 1. Enzyme en suspension

Les réactions sensibles à l'eau, telle que l'alcoolyse catalysée par les lipases en milieu organique, nécessite d'utiliser les enzymes en présence de faibles quantité d'eau (inférieure à 1% v/v). La première approche utilisée a donc consisté à utiliser le biocatalyseur sous forme de poudre en milieux organiques non polaires (Zaks A and Klibanov AM, 1984). La lipase pancréatique porcine utilisée sous forme de poudre dans un mélange tributyrine/alcool présente une extrême stabilité thermique et une demi-vie prolongée. En présence de 0,015% (v/v) d'eau, l'enzyme est active durant plusieurs heures à 100°C tandis qu'en présence de 0,8% (v/v) d'eau la lipase est inactive en moins d'une heure (Zaks A and Klibanov AM, 1984).

Cette technique a ses limites dans la mesure où toutes les enzymes ne supportent pas nécessairement bien le processus de lyophilisation. La lyophilisation peut entraîner la sublimation des molécules d'eau de la couche de solvatation essentielle des enzymes et par conséquent son inactivation. Afin de préserver l'hydratation essentielle des protéines durant le processus de lyophilisation, des carbohydrates tel que le tréhalose ou des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG), connus pour leur effet lyoprotectant, ont été ajoutés (Serdakowsky AL et Dordick JS, 2008). Par exemple, l'activité de la subtilisine Carlsberg dans de l'hexane est augmentée de 14 fois lorsque le tréhalose est ajouté avant lyophilisation (Serdakowsky AL et Dordick JS, 2008).

A travers une approche différente, Khmelnitsky, Y.L. *et al.* montrent que l'ajout de sels avant lyophilisation permet d'améliorer l'activité enzymatique en milieu organique (Khmelnitsky YL *et al.*, 1994). Par exemple, l'ajout de KCl à la subtilisine Carlsberg augmente son activité dans l'hexane de 1920 fois (Ru MT *et al.*, 2001). Les sels sont de petites molécules chargées capables d'interagir avec les protéines et de structurer les molécules d'eau à la surface de cette dernière (Baldwin RL, 1996). L'effet des sels sur la stabilité des enzymes en milieu organique est similaire à celui observé en solution et décrit par Hofmeister (Serdakowsky AL et Dordick JS, 2008) (cf. section I. 3. 2. F. 2.).

L'utilisation d'enzymes sous forme lyophilisée reste limitée à la biocatalyse en milieu organique non polaire et ne répond pas aux problèmes de dénaturations protéiques en milieu organique polaire.

I. 2. 5. A. 2. Immobilisation

En milieu organique les biocatalyseurs tendent à être moins actifs et structurés du fait de l'interaction des solvants avec la structure protéique (Yang L *et al.*, 2004). L'immobilisation d'enzymes conduit à l'établissement de nouvelles interactions avec d'autres molécules (support, agent réticulant…) permettant ainsi d'améliorer la stabilité structurale du biocatalyseur en milieu organique. En système biphasique, l'immobilisation du biocatalyseur permet de contrôler sa partition dans le milieu réactionnel et par conséquent de réduire les interactions possiblement délétères avec le solvant organique.

L'immobilisation d'un biocatalyseur consiste en la restriction de sa mobilité par des méthodes physico-chimiques (Hartmeier W, 1986). Le biocatalyseur peut être immobilisé à travers différentes techniques tels que la fixation à un support (par covalence ou par des interactions de faible énergie), la (co-)réticulation covalente, l'emprisonnement dans une matrice ou l'inclusion dans une membrane (tableau 5) (Hartmeier W, 1986; Tramper J, 1985).

Liaison du biocatalyseur				Rétention physique			
Fixation sur un support		Réticulation covalente		Emprisonnement dans une matrice		Inclusion	
Adsorption ou interactions ionique	Fixation covalente	Réticulation	Co-réticulation	billes	fibres	encapsulation	membranes planes

Tableau 5 : Tableau résumant les différentes méthodes d'immobilisation.

I.2.5.A.2.a Immobilisation par fixation à un support

La liaison du biocatalyseur à un support peut se faire soit par adsorption soit par des interactions ioniques ou covalentes. En ce qui concerne la biocatalyse en milieu organique, l'immobilisation d'enzymes par adsorption a essentiellement été utilisée du fait de la simplicité de la méthode.

L'adsorption d'une enzyme sur une surface fait intervenir des interactions physiques telles que les forces de Van der Waals. Les interactions de faible énergie (liaisons hydrogènes, ioniques) et notamment les interactions hydrophobes jouent également un rôle lors de l'adsorption. L'adsorption fait donc intervenir un ensemble d'interactions de faible énergie; l'importance de ces différentes interactions dans le phénomène d'adsorption va dépendre de la nature du support et de l'enzyme utilisés. L'avantage de cette méthode est sa simplicité de mise en œuvre car pour se faire il suffit de mettre le biocatalyseur en présence du support. L'inconvénient de cette méthode est la faiblesse du lien entre l'enzyme et le support et par conséquent la facilité de désorption du biocatalyseur (schéma 12). De plus l'immobilisation est non spécifique et non contrôlée ce qui peut conduire à des phénomènes de gènes stériques empéchant les substrats d'avoir accès au site actif du biocatalyseur (Hartmeier W, 1988).

L'immobilisation du biocatalyseur par des interactions ioniques correspond à l'interaction des acides aminés chargés, situés à la surface de l'enzyme, avec un support de charge opposée (schéma 12). Les acides aminés basiques tels que l'arginine ou la lysine permettront l'immobilisation de l'enzyme sur un support chargé négativement (carboxymethyl sepharose poreuse); inversement, les acides aminés acides tels que l'acide aspartique ou l'acide glutamique seront utilisés afin d'immobiliser le biocatalyseur sur un support chargé

positivement (diethylaminoethyl sepharose poreuse). Les avantages et les inconvénients de cette méthode sont similaires à l'immobilisation par adsorption. Néanmoins, l'avantage de l'immobilisation par l'intermédiaire d'interactions ioniques est la possibilité d'adapter le support et les conditions (force ionique, pH) afin d'immobiliser plus spécifiquement une enzyme à partir d'un milieu complexe.

L'immobilisation du biocatalyseur sur un support par l'intermédiaire de liaisons covalentes fait intervenir les fonctions réactives des acides aminés exposés à la surface de l'enzyme. Parmi les 20 acides aminés naturels il existe essentiellement 4 fonctions utilisées pour créer des liaisons covalentes avec le support : la fonction amine (Lys), la fonction hydroxyle (Tyr, Ser, Thr), la fonction carboxyle (Asp et Glu) et la fonction thiol (Cys). L'immobilisation peut se faire soit directement sur le support, soit par l'intermédiaire d'un bras espaceur afin de réduire les contraintes stériques. En comparaison des autres méthodes d'immobilisation (adsorption et interaction ioniques), la fixation par des liaisons covalentes est plus difficile à mettre en œuvre et peut présenter l'inconvénient d'une mauvaise orientation du biocatalyseur. L'avantage des liaisons covalentes réside en la force de liaison du biocatalyseur au support réduisant ainsi les problèmes de désorption.

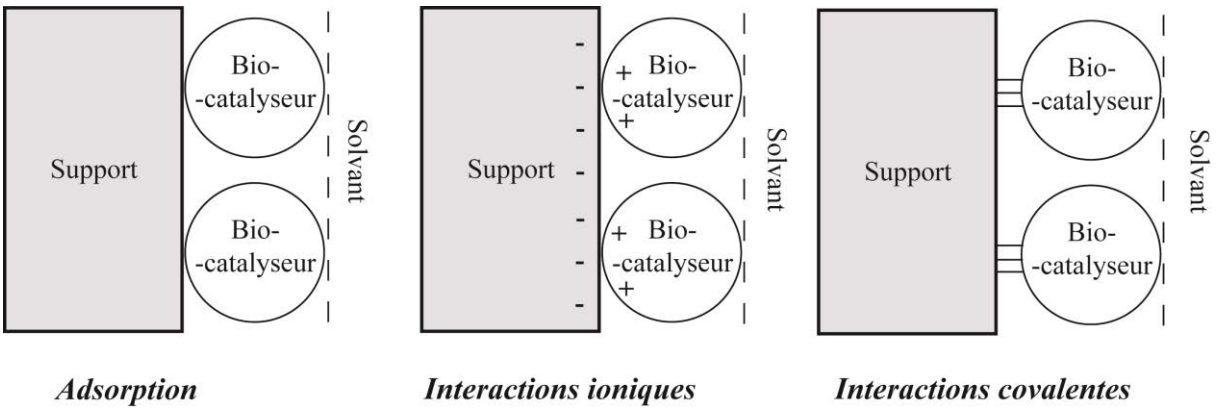


Schéma 12 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation sur un support. La fixation du biocatalyseur au support peut se faire par adsorption en mettant directement l'enzyme en contact du support (gauche), par des interactions ioniques (milieu), ou par des liaisons covalentes (droite).

Les milieux organiques non polaires, tel que l'octane, ne vont pas ou peu entrer en interaction avec les molécules d'eau situées à la surface du support et par conséquent avec l'enzyme elle-même. Ces milieux non polaires réduisent la désorption des biocatalyseurs en interagissant de

manière moins importante que les milieux aqueux classiques (Sellek GA et Chaudhuri JB, 1999).

Inversement, lors de réactions (bio)catalysées en milieux organiques non polaires, l'immobilisation du biocatalyseur par adsorption sur des supports de différentes natures permet de réguler l'activité de l'eau à proximité de l'enzyme (Valivety RH *et al.*, 1994). Par exemple, l'adsorption de la lipase de *Rhizomucor miehei* sur des billes de polypropylène améliore son activité (estérification de l'acide décanoïque par le dodécanol) dans de l'hexane de 18 fois en comparaison à l'immobilisation sur une résine échangeuse d'anions par des interactions ioniques. L'activité de l'eau (a_w) du biocatalyseur est de 0,97 après adsorption sur des billes de polypropylène alors que l'immobilisation sur la résine polaire réduit l'activité de l'eau à 0,55 (Valivety RH *et al.*, 1994).

Les bénéfices de l'immobilisation de biocatalyseurs par adsorption en milieu organique non polaires sont donc partagés. Les solvants organiques réduisent la désorption du biocatalyseur d'une part, et d'autre part l'immobilisation permet de contrôler la partition du biocatalyseur et l'activité de l'eau.

I.2.5.A.2.b Immobilisation par inclusion dans un gel

L'inclusion de biocatalyseurs dans un gel correspond à l'emprisonnement de l'enzyme dans un polymère naturel ou synthétique. Le contrôle de la taille des pores est un facteur primordial à la réussite de cette technique. Le mailles du gel doivent être suffisamment lâches afin de permettre la diffusion des substrat(s) et produit(s), et suffisamment étroites pour empêcher le relargage de l'enzyme (Hartmeier W, 1986). L'inclusion dans un gel permet de garder l'enzyme dans un gel hydraté la protégeant ainsi de l'interaction directe avec les milieux organiques (schéma 13) (Hartmeier W, 1986; Tramper J, 1985).

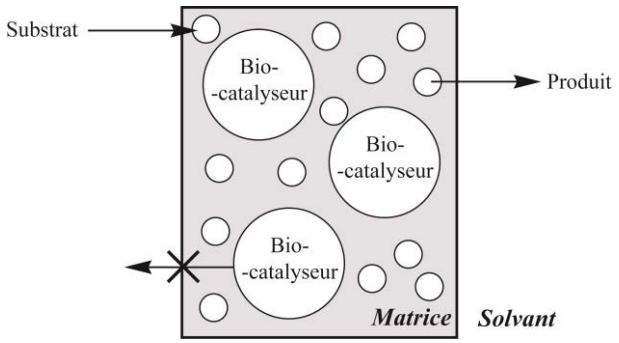


Schéma 13 : Représentation schématique de l'inclusion d'un biocatalyseur dans une matrice (ou gel).

L'alcool déshydrogénase de *Lactobacillus kefir*, ainsi que son cofacteur (NADPH), a été incluse dans des billes de gel d'alcool polyvinylique. L'enzyme ainsi immobilisée catalyse la transformation de différentes cétones hydrophobes en (*R*)-alcools énantiomériquement purs dans de l'hexane. L'immobilisation dans le gel d'alcool polyvinylique protège l'enzyme du solvant organique et augmente sa stabilité thermique ainsi que sa demi-vie à 4°C (de Temino DM *et al.*, 2005).

Des matrices amphiphiles ont été synthétisées afin de supporter les enzymes en milieu organique. Ces matrices exposent leur partie hydrophobe au milieu organique non polaire tandis que le biocatalyseur est immobilisé dans des régions hydrophiles permettant ainsi de préserver l'activité de l'eau nécessaire au maintient de sa structure. La peroxydase de raifort, la tyrosinase et la bilirubine oxydase ont été incluses dans un gel de dimethylformamide (DMF)-polyhydroxyl cellulose (formé par mélange de poly(vinyl alcool) et de carboxymethyl hydroxyethyl cellulose). Les enzymes ainsi immobilisées sont utilisées pour l'élaboration de biocapteurs pour la détection de composés organiques insolubles dans l'eau, tel que le catéchol ou le phénol dans le cas de la tyrosinase, et dissous dans des solvants organiques non polaires tel que le chloroforme (Guo YZ et Dong SJ, 1997).

I.2.5.A.2.c Immobilisation par réticulation covalente

Lors de l'immobilisation par réticulation covalente, les biocatalyseurs sont liés les uns aux autres par l'intermédiaire de réactifs bi- ou multi-fonctionnels. La co-réticulation covalente consiste à ajouter une protéine ou un polymère afin de réduire les phénomènes de gène stérique et d'améliorer les propriétés enzymatiques du biocatalyseur. L'enzyme ainsi que les protéines co-immobilisées forment en quelque sorte le support et le biocatalyseur à la fois. L'agent réticulant le plus utilisé est le glutaraldéhyde. Cet agent bi-fonctionnel forme, par l'intermédiaire des groupements aldéhyde situés de part et d'autre de la molécule, des bases de Schiff avec les fonctions amines de la protéine. La réticulation covalente d'enzyme conduit à la formation d'agrégats : les CLEA ("Cross-Linked Enzyme Aggregates") (schéma 14). L'avantage de cette méthode est la simplicité de sa mise en œuvre. Les inconvénients sont la formation de substances gélatineuses difficiles à manipuler et limitant la diffusion des espèces (substrat et produit). De plus, les parties actives du biocatalyseur sont généralement modifiées rendant ainsi le biocatalyseur inactif. La réticulation covalente de cristaux d'enzyme ("CLEC :

Cross-Linked Enzyme Cristals") est un cas particulier de réticulation covalente, il consiste en l'ajout d'agents réticulants après la formation de cristaux. Les CLECs ont l'avantage de réduire les effets de gène stérique par l'utilisation de biocatalyseurs organisés à travers un réseau cristallin et de faciliter la manipulation du fait de leur consistance.

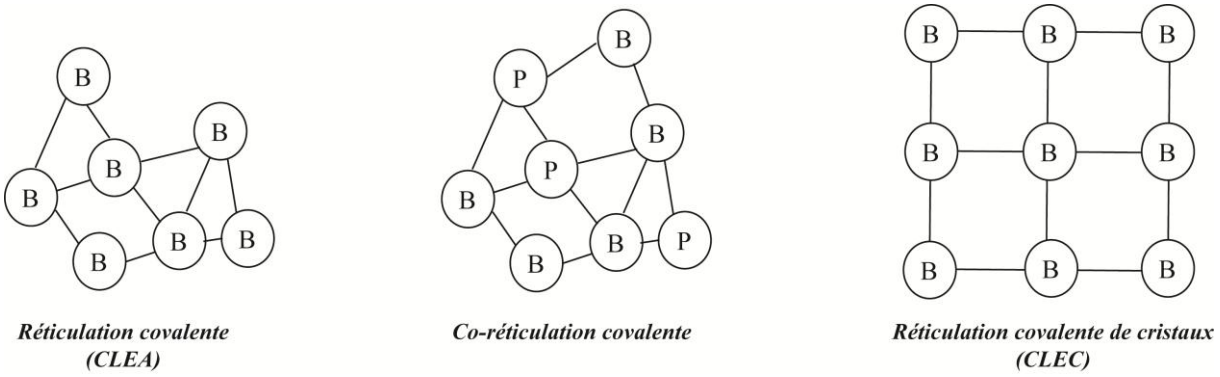


Schéma 14 : Schéma représentant les différentes méthodes de réticulation covalente. Les sphères notées B correspondent au biocatalyseur alors que celles notées P correspondent à un polymère ou à une protéine quelconque associée au biocatalyseur afin de réduire les phénomènes de gène stérique.

Par exemple, la formation de CLECs de la glucoamylase (α-(1-4)-glucanohydrolase) d'*Aspergillus niger*, une enzyme hydrolysant l'amidon, améliore sa stabilité thermique et sa demi-vie ainsi que le taux de production de glucose dans des systèmes biphasiques 1/1 (v/v) eau-hexane ou eau-chloroforme (Abraham TE *et al.*, 2004). La glucoamylase ainsi immobilisée présente 82% et 30,82% de son activité initiale après incubation durant 1 h à 70°C et 30 minutes à 80°C sans amidon tandis que l'enzyme non immobilisée est inactive dans les mêmes conditions (Abraham TE *et al.*, 2004).

I. 2. 5. A. 3. Modifications chimiques

Les modifications chimiques des biocatalyseurs consistent au greffage covalent de molécules/polymères à la surface de protéines afin d'améliorer leur fonctionnalité et leur stabilité dans des conditions réactionnelles particulières (DeSantis G et Jones JB, 1999; Serdakowsky AL et Dordick JS, 2008). Les modifications chimiques permettent de modifier les propriétés physicochimiques des biocatalyseurs. La plupart des enzymes sont naturellement solubles dans l'eau en raison de la polarité des chaines latérales des acides aminés exposés à

leur surface. En milieu organique non polaire, les biocatalyseurs sont généralement insolubles. Le greffage de polymères hydrophobes tels que le polyéthylène glycol (PEG) ou des chaînes alkyles conduit à augmenter l'hydrophobicité de surface du biocatalyseur et améliore sa solubilité en milieu organique non polaire (Serdakowsky AL et Dordick JS, 2008).

Par exemple, la peroxydase de raifort a été modifiée de manière covalente par des groupements de type benzyles (schéma 15a), des polymères de PEG (schéma 15b) ou bien a été déglycosylée afin de réduire la polarité de la surface (Vazquez-Duhalt R *et al.*, 1992). Cette étude révèle une corrélation entre l'hydrophobicité de l'enzyme et son activité dans les milieux organiques non polaires. Dans le meilleur des cas, l'efficacité catalytique de la peroxydase de raifort modifiée par des polymère de PEG est augmentée de 7,5 fois dans du toluène (Vazquez-Duhalt R *et al.*, 1992). A travers une approche similaire, une protéase alcaline de *Bacillus sp.* a été modifiée par du chlorure de décanoyl (schéma 15c). L'enzyme modifiée est plus soluble (~ 2 $mg.mL^{-1}$) dans de l'isooctane ou de l'hexane tandis que dans ces mêmes milieux la solubilité des enzymes PEGylés est inférieur à 1 $mg.mL^{-1}$. La modification de la protéase par des chaînes alkyles augmente son activité de 6,6 fois en présence de 50% (v/v) de chloroforme (Distel KA *et al.*, 2005). La modification de la peroxydase de raifort (HRP) par des groupements de type anhydride phtalique (schéma 15d) améliore son activité en présence de DMF ou de tetrahydrofurane (THF), deux solvants polaires et miscibles à l'eau (Song HY *et al.*, 2005). La modification par des groupements de type anhydride phtalique réduit les interactions des solvants polaires avec les protéines (Song HY *et al.*, 2005).

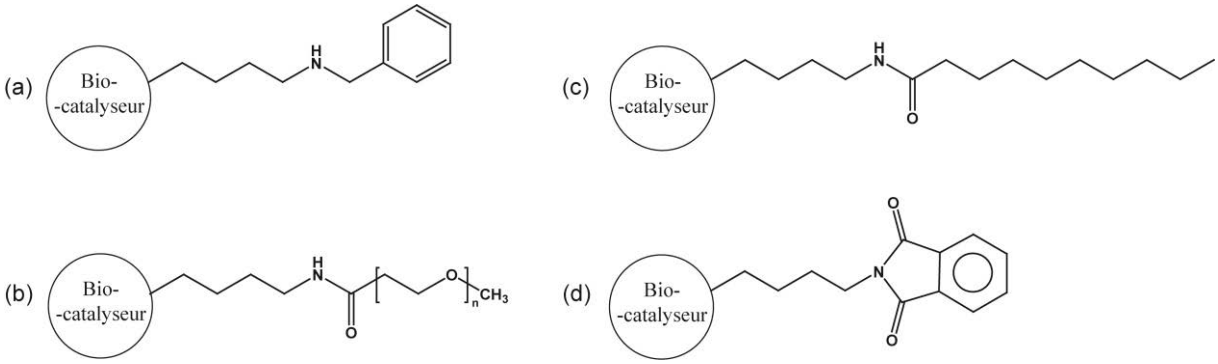


Schéma 15 : Représentation schématique des enzymes modifiées de manière covalente. Les enzymes sont modifiées par l'intermédiaire de leur résidus lysine par des groupements benzène (a), des polyméres de polyethylène glycol (b), des alcanes (c) ou des groupements de type anhydride phtalique (d) .

I. 2. 5. A. 4. Modifications par l'intermédiaire de lipides ou de tensio-actifs

Les tensio-actifs ont la particularité d'être des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire suivie d'une chaîne carbonée hydrophobe. Cette particularité est utilisée pour préserver la couche d'hydratation essentielle des enzymes : soit en produisant des micelles inversées à l'aide de tensio-actifs, utilisées dans des émulsions eau-huile, soit en associant les lipides directement aux biocatalyseurs par interactions ioniques (schéma 16).

L'inconvénient des réactions biocatalysées en micelles inversées est la formation d'une interface (mono- ou multi-laméllaire) par les tensio-actifs qui constitue une barrière s'ajoutant aux problèmes de diffusions intrinsèques aux systèmes biphasiques. Par exemple, les cinétiques de l'α-chymotrypsine dans des micelles inversées d'AOT (sodium-bis(2-éthyle-hexyle sulfosuccinate)) sont diminuées de 72,5 fois par rapport à l'enzyme native dans de l'hexane (Biswas R et Pal SK, 2004). Rodkiewicz-Nowak J et Ito M utilisent la tyrosinase naturellement résistante aux solvants organiques de *Streptomyces sp.* : REN-21 (Ito M et Oda K, 2000) afin de catalyser des réactions en micelle inversée d'AOT dans de l'isooctane. Ces auteurs démontrent que les substrats se fixent parfois préférentiellement à l'interface des couches de tensio-actifs (Rodkiewicz-Nowak J et Ito M, 2005), ce qui explique la diminution d'activité des biocatalyseurs observée lors de l'utilisation de micelles inversées en milieu organique.

Afin de réduire les problèmes de diffusion, les tensio-actifs peuvent être directement associés au biocatalyseur par des interactions ioniques. Les têtes polaires des lipides (ou tensio-actifs) interagissent directement avec les groupements polaires des acides aminés situés à la surface du biocatalyseur. L'association de tensio-actif augmente la solubilité du biocatalyseur en milieu organique non polaire tout en préservant son hydratation. Lorsque les tensio-actifs (AOT) sont associés à la HRP par des interactions ioniques, l'enzyme modifiée présente une efficacité catalytique augmentée d'un facteur 10 par comparaison à l'enzyme native dans du toluène (Bindhu LV et Abraham TE, 2003). L'association de différents tensio-actifs à la lipase de *Candida cylindracea* améliore son activité dans de l'isooctane. La solubilité du tensio-actif dans le milieu organique utilisé joue un rôle dans cette activation (Kamiya N *et al.*, 1996). Par conséquent, l'utilisation d'un tensio-actif soluble dans un milieu organique donné permet donc d'améliorer la solubilité du biocatalyseur dans ce même solvant. L'association d'un tensio-actif non ionique (le dioleyl-N-D-glucono-L-glutamate) à la lipase D de *Rhizopus delemar* augmente la vitesse initiale d'estérification du glycidol avec de l'acide laurique de 100 fois par

comparaison à l'enzyme native dans du cyclohexane à 35°C (Okazaki S *et al.*, 1997). Les fonctions carboxyles du tensio-actif dioleyl-N-D-glucono-L-glutamate permettent de préserver l'hydratation du biocatalyseur.

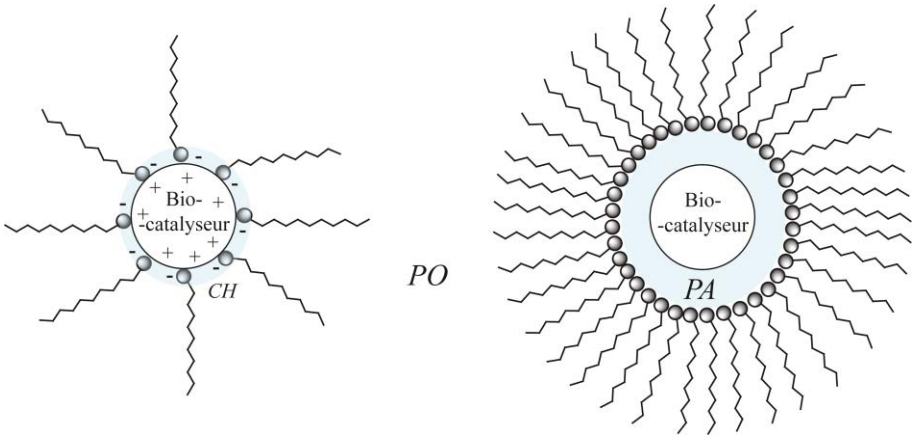


Schéma 16 : Représentation schématique des deux modes d'utilisation des tensio-actifs en biocatalyse en milieu organique. Les tensio-actifs associés par interaction ionique sont représentés à gauche tandis que la formation de micelles inversées est représentée à droite. CH, PO et PA correspond respectivement à la couche d'hydratation essentielle du biocatalyseur, la phase organique et la phase aqueuse.

I. 2. 5. B. Ingénierie des enzymes

Dans cette partie nous considérerons les approches faisant appel à des techniques de biologie moléculaire afin d'améliorer l'activité et la stabilité des enzymes en milieu organique. L'ingénierie des protéines consiste en l'introduction de mutations au niveau des gènes codant pour les enzymes. Les mutations peuvent être introduites de deux manières; soit de manière réfléchie s'appuyant sur une hypothèse préalable (la mutagénèse dirigée) soit de manière aléatoire par évolution dirigée.

I. 2. 5. B. 1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée consiste à introduire les mutations désirées au niveau du gène codant pour le biocatalyseur. Les mutations sont introduites par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'amorces contenant le codon mutagénique. En fin de PCR, la mutation s'est propagée et le milieu réactionnel contient en grande majorité l'ADN muté. Le plasmide muté nouvellement synthétisé est linéaire, sous forme double brin. Ce dernier est transformé en bactéries afin de liguer ses extrémités et de l'amplifier (schéma 17).

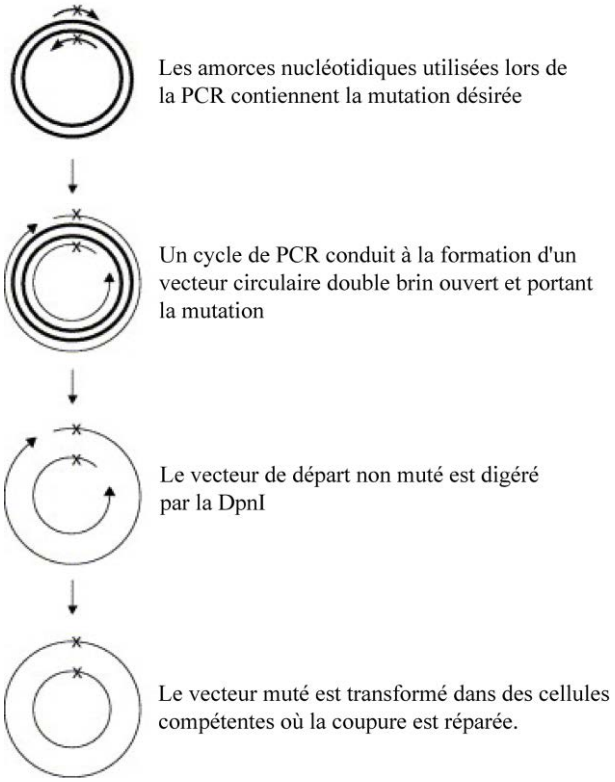


Schéma 17 : Représentation schématique d'un cycle de mutagenèse dirigée. Les traits épais correspondent à l'ADN plasmidique matrice alors que les traits plus fins correspondent à l'ADN nouvellement synthétisé. La mutation (ou le codon mutagénique) est représentée par une croix. L'image est extraite de la publication d'Antikainen NM et de Martin SF de 2005.

Tenant compte du rôle de l'hydrophobicité du biocatalyseur sur son activité en milieu organique (Vazquez-Duhalt R *et al.*, 1992), les premières études ont consisté à muter les acides aminés chargés, situés à la surface du biocatalyseur, par des acides aminés moins polaires (schéma 18 gauche) afin d'améliorer sa solubilité et son activité en milieu organique (Martinez P et Arnold

FH, 1991; Arnold FH, 1993; Pantoliano MW, 1992). La mutation d'un seul résidu polaire situé à la surface de la subtilisine E (Asp 248) par un résidu moins polaire tel que l'alanine ou la leucine augmente l'activité enzymatique du biocatalyseur de 2 fois en présence de 80% (v/v) de DMF. La mutation d'un résidu polaire plus enfoui (Asn 218) dans la structure tridimensionnelle par un résidu légèrement moins polaire (Ser) a également le même effet. Cette seconde mutation est supposée altérer le réseau de liaisons hydrogènes à l'intérieur de l'enzyme. Les effets des deux mutations (Asp 248 et Asn 218) sont cumulatifs (Pantoliano MW, 1992).

Schéma 18 : Représentation schématique de l'approche de mutagenèse dirigée utilisée pour augmenter l'hydrophobicité de surface du biocatalyseur; une approche appliquée par Martinez P et Arnold FH en 1991 sur la subtiline E. Les acides aminés polaires tels que l'acide aspartique sont remplacés par des acides aminés moins polaires (ou non polaire) tels que l'alanine ou la leucine.

La structure tridimensionnelle d'une protéine est maintenue par un ensemble de liaisons de faibles énergie (hydrogène, ionique, de van der Waals et hydrophobe) mais également par les liaisons covalentes que forment les ponts disulfures. Dans le cas des métalloprotéines, la complexation d'un métal au sein de la structure protéique participe au maintient de la structure (Arnold FH, 1993, Pantoliano MW, 1992). En condition normale, une protéine structurée reste stable un temps donné. Le passage d'un état natif à un état dénaturé nécessite l'apport d'énergie qui peut se caractériser par des contraintes physico-chimiques telles que l'augmentation de la température ou de la force ionique. L'énergie libre de dépliement correspond à l'énergie nécessaire au passage du biocatalyseur d'un état natif et structuré à un état dénaturé; elle correspond à la somme de l'énergie nécessaire à la rupture de différentes interactions. Plus l'énergie libre de dépliement est importante et plus le biocatalyseur sera structuralement stable (schéma 19).

$$E \underset{}{\overset{\Delta G_d}{\rightleftharpoons}} E^d$$

$$\Delta G_d = \Delta G_{conf} + \sum_i \Delta g_{i,int} + \sum_i \Delta g_{i,s} + \Delta W_{el} \qquad (5)$$

Schéma 19 : Représentation schématique de l'énergie libre de dépliement d'une enzyme. E et E_d sont respectivement l'enzyme à l'état natif et l'enzyme à l'état dénaturé. L'énergie libre de dépliement (ΔG_d) est définie selon l'équation 5. ΔG_{conf} est l'énergie libre de configuration, $\Delta g_{i,int}$ correspond aux interactions de courtes portées et de faible énergie (liaisons hydrogènes, de van der Waals, ponts salins, liaison de cofacteur ou de métaux), $\Delta g_{i,s}$ correspond aux interactions de courte portée avec le solvant (effet hydrophobe, hydratation des ions…) et ΔW_{el} correspond aux interactions électrostatiques de longue portée (tel que le moment dipolaire de certaines hélices α) (Pantoliano MW, 92).

Certaines études ont cherché à augmenter l'énergie libre de dépliement afin d'améliorer la stabilité structurale du biocatalyseur en milieu organique en augmentant, par exemple, l'hydrophobicité des résidus enfouis dans la protéine (schéma 19, équation 5). Ainsi, un mutant de la subtilisine BNP' comportant 6 mutations obtenues par différentes approches, dont la mutagenèse dirigée, présente une énergie libre de dépliement 4,3 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage à 58,5°C (Pantoliano MW *et al.*, 1989) et une activité accrue d'un facteur 50 dans du DMF anhydre (Pantoliano MW, 1992). L'augmentation de son énergie libre de dépliement est notamment due à l'augmentation de l'hydrophobicité de résidus enfouis.

La mutagenèse dirigée est finalement une approche rationnelle difficile à mettre en œuvre car elle suppose que l'on dispose de suffisamment d'informations concernant le lien entre la séquence en acides aminés d'une enzyme donnée et son état structuré. Tenant compte des considérations générales liées à l'énergie libre de dépliement du biocatalyseur, les possibilités de mutations sont très nombreuses. Il est par conséquent difficile de toutes les tester et de prévoir leurs effets.

I. 2. 5. B. 2. Evolution dirigée

I.2.5.B.2.a Principe et définition :

De Charles Darwin à Frances Arnold, l'évolution est passée de la simple théorie à la pratique. Au départ sous le nom de mutagenèse aléatoire (Arnold FH, 1993), l'évolution dirigée désigne aujourd'hui l'ensemble des techniques de biologie moléculaire qui ont pour but d'améliorer un paramètre d'une enzyme (stabilité, (stéréo)sélectivité, activité…) par la création de banques de mutants suivie du criblage de ces derniers pour le paramètre désiré (schéma 20) (Arnold FH, 1998; Tobin MB *et al.*, 2000; Turner NJ, 2003). Couramment, les mutations au niveau génique sont introduites soit par PCR de basse fidélité ("error-prone PCR") soit par recombinaison aléatoire de fragments de gène ("DNA shuffling") (schéma 20). Le criblage du paramètre désiré constitue l'étape critique de la méthode d'évolution ("*you get what you screen for*") (Arnold FH, 1998). La méthode d'évolution dirigée a aujourd'hui été utilisée afin de modifier des spécificités de substrat (Gupta N *et al.*, 2010; Wu ZL *et al.*, 2005), d'améliorer la thermo-stabilité de biocatalyseurs (Khan MIH *et al.*, 2005; Gupta N *et al.*, 2010) ou encore afin d'améliorer l'activité enzymatique en présence de solvant organique (Arnold FH, 1993).

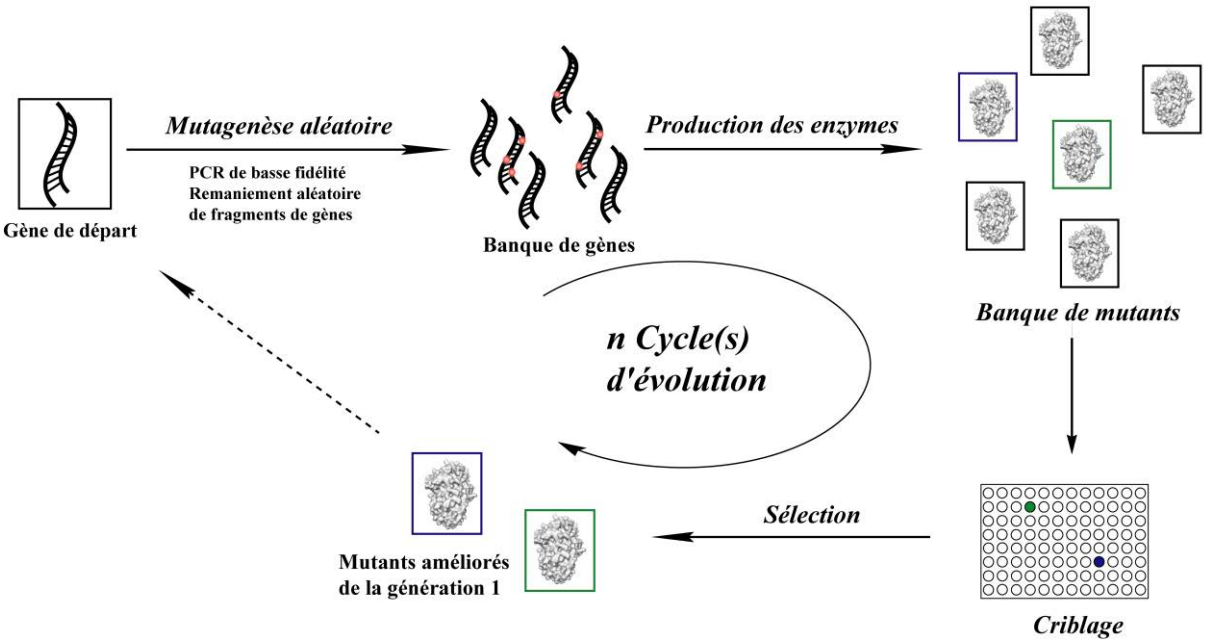


Schéma 20 : Schéma de principe général de l'évolution dirigée. Un seul cycle d'évolution est représenté.

I.2.5.B.2.b PCR de basse fidélité

La PCR ("Polymerase Chain Reaction"), ou réaction en chaîne par polymérase, est une méthode commune en biologie moléculaire, utilisée dans le but d'amplifier un fragment d'ADN par l'intermédiaire d'ADN polymérase et à partir d'amorce d'ADN s'hybridant spécifiquement de part et d'autre de la région à amplifier.

Le principe de la PCR de basse fidélité ("error prone PCR") est de modifier les conditions de PCR classiques afin que le taux d'erreur soit augmenté (schéma 21). Dans le cas de ce type de PCR, la Taq polymérase est le plus souvent utilisée. La Taq polymérase ne possède pas d'activité exonucléasique 3' → 5' de relecture, par conséquent après l'élongation du brin complémentaire de l'extrémité 5' phosphate à l'extrémité 3' hydroxyle, la polymérase ne corrigera pas les erreurs introduites. De plus, parmi les ADN polymérases connues, le taux d'erreurs de la Taq polymérase est le plus important (environ 1 erreur toutes les 1 000 paires de base) (Cadwell RC et Joyce GF, 1994). Le taux d'erreur de la Taq polymérase n'est généralement pas suffisant afin d'induire de la variation génétique dans le cadre de l'évolution dirigée et ceci est spécialement valable pour des gènes de petite taille (inférieurs à 1000 pb). Par conséquent, en plus d'utiliser la Taq polymérase, le milieu réactionnel est modifié afin de réduire la fidélité de l'enzyme. Ainsi, des ions manganèse peuvent être ajoutés, ces ions sont des agents mutagènes connus pour réduire la fidélité de polymérases utilisant le magnésium en condition physiologique (Dube DK et Loeb LA, 1975). La PCR classique est réalisée en présence de désoxynucléotides en quantité equimolaires; les concentrations de désoxynucléotides peuvent être biaisées, favorisant alors l'incorporation d'un type de nucléotide ou des analogues de nucléotides peuvent être ajoutés. Enfin, l'ajout d'un co-solvant organique, tel que l'isopropanol, dans le milieu réactionnel réduit également la fidélité de l'ADN polymérase (Wong TS *et al.*, 2006).

La taille de la banque à cribler étant directement liée au nombre de mutations induites, il est donc très important de contrôler les conditions de PCR afin d'obtenir une banque exploitable dans le cadre du criblage utilisé. Souvent, les méthodes de criblage n'excèdent pas 10^4 mutants testés par cycle d'évolution (Arnold FH, 1998) et constituent le point limitant de la technique d'évolution dirigée (Arnold FH, 1998). Selon Arnold FH, la première loi de la mutagenèse aléatoire est : "*you get what you screen for*". Par exemple, si une condition de PCR induisant la mutation d'un acide aminé est utilisée, le nombre de mutants possible est de 20^{300} dans le cas d'une protéine de 300 acides aminés ce qui constitue déjà une librairie difficile à cribler dans sa

globalité. Par conséquent, les conditions de PCR conduisant à la mutation d'un acide aminé par génération sont plus couramment préférées à l'accumulation de mutations résultant des banques immenses et difficiles à exploiter (Arnold FH, 1998).

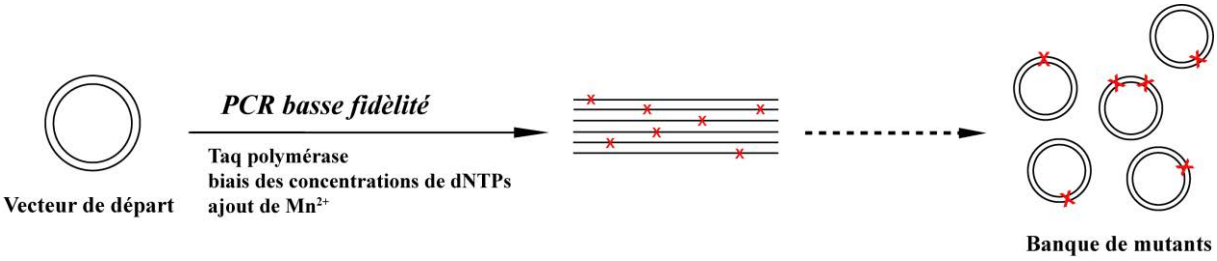


Schéma 21 : Représentation schématique de la PCR de basse fidélité. Les croix rouges correspondent à des mutations au niveau génique, les cercles correspondent aux vecteurs portant le gène de départ.

I.2.5.B.2.c Remaniement aléatoire de fragments d'ADN ("DNA Shuffling")

La technique de remaniement aléatoire de fragments d'ADN a été mise au point au début des années 90 par Stemmer WPC et son équipe; à la période où le Pr. Arnold utilisait les PCR de basse fidélité afin d'améliorer l'activité enzymatique en milieu organique (Stemmer WPC, 1994; Chen KQ et Arnold FH, 1991). Le remaniement aléatoire de fragment de gène permet d'augmenter la variabilité génétique. Le point de départ est un lot de gènes homologues (gènes issues du même ancêtre commun et présentant une identité de séquence supérieure à 30%) ou différents mutants obtenus à l'issue de PCR de basse fidélité (Tobin MB *et al.*, 2000; Arnold FH, 1998). Ces gènes sont coupés (fragmentés) à l'aide de la DNAse I (une désoxyribonucléase clivant les liaisons phosphodiesters préférentiellement au niveau 5' des nucléotides de type pyrimidine C et T) puis une PCR sans amorces est réalisée en présence de ces fragments d'ADN (schéma 22). En fin de PCR, le dernier cycle est réalisé en présence des amorces 5' et 3' du gène afin d'obtenir des fragments d'ADN de la taille du vecteur de départ et comprenant *a priori* l'ensemble de la séquence. Le remaniement aléatoire de fragments de gène permet d'obtenir une grande diversité sans nécessairement cribler une grande librairie; cette méthode est souvent utilisée afin de remanier des mutants préalablement obtenus par PCR de basse fidélité.

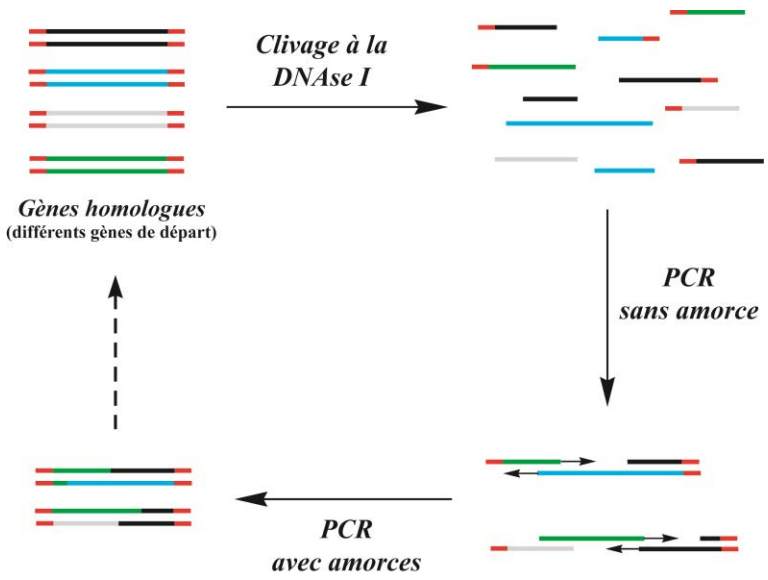


Schéma 22 : Représentation schématique de la méthode de remaniement aléatoire de fragments de gènes.

I.2.5.B.2.d Evolution dirigée appliquée à la biocatalyse en milieu organique

La technique d'évolution dirigée a été initiée dans le but d'améliorer l'activité de biocatalyseurs en milieu organique (Chen KQ et Arnold FH, 1991). Par exemple, l'activité de la subtilisine E dans du DMF a été améliorée selon la méthode d'évolution dirigée. La mutagenèse aléatoire de l'enzyme conduit à la mise en évidence de 3 mutations (D60N, Q103R et N128S) améliorant l'activité de l'enzyme de 38 fois en présence de 85% (v/v) de DMF (Chen KQ et Arnold FH, 1991). Des cycles séquentiels de mutagenèse aléatoire et de criblage conduisent à une enzyme portant 10 mutations et dont l'activité est 256 fois supérieure à celle de l'enzyme sauvage en présence de 60% (v/v) de DMF. La plupart des mutations sont localisées au niveau de boucles de surface faisant office de connecteurs entre les éléments de structures secondaires (Chen KQ et Arnold FH, 1993).

L'élargissement de la banque conduit à l'observation de 3 nouvelles mutations bénéfiques. Ajoutées aux 10 mutations précédentes, le mutant portant 13 mutations est 471 fois plus actif que l'enzyme sauvage en présence de 60% (v/v) de DMF pour l'hydrolyse d'un peptide modèle; le succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (You L et Arnold FH, 1996). L'effet bénéfique d'une mutation sur l'activité du biocatalyseur en milieu organique ne s'explique pas seulement selon la nature de l'acide aminé et son effet théorique sur l'énergie libre de dépliement (schéma 19, section I. 2. 5. B. 1). Par conséquent, la mutagenèse aléatoire semble être plus adaptée à l'amélioration de l'activité de biocatalyseurs en milieu organique que la mutagenèse dirigée.

Cependant, l'efficacité de la méthode d'évolution dirigée repose sur la capacité de cribler un grand nombre de mutants de manière simple, peu coûteuse et rapide. Le criblage reste donc aujourd'hui le point critique dans la réussite de la méthode.

I. 2. 6. Problèmes liés à la biocatalyse en milieu organique et solutions apportées

L'inconvénient majeur des solvants organiques est la difficulté de les utiliser à l'échelle industrielle. Ces milieux libèrent des composés organiques volatiles (COV) ce qui nécessite de les manipuler avec précaution. Les COV ont des effets néfastes sur l'organisme pouvant aller jusqu'à induire des encéphalopathies caractérisées par des altérations des fonctions cognitives (Iregren A, 1996). La toxicité des solvants organiques va à l'encontre des principes 3; 5 et 12 de la chimie verte. Le fait que les solvants organiques soient des déchets nécessitant un traitement particulier va à l'encontre des principes 1 et 2 de la chimie verte. Le début du 21ième siècle a vu l'émergence d'un nouveau milieu pour le remplacement des milieux organiques : les liquides ioniques.

I. 3. Biocatalyse en Liquide Ionique

I. 3. 1. Bref historique

La date de découverte du premier liquide ionique (LI) est controversée. Un LI est, par sa définition la plus simple, un sel dont la température de fusion est inférieure à 100°C. Or dès le début du 20ième siècle un certain nombre de travaux ont été publiés en présence de sels fondus ("molten salts") et prenant la définition la plus stricte d'un liquide ionique. Le premier serait le nitrate d'éthanolammonium (température de fusion de 52-55°C) rapporté en 1888 par Gabriel S. et Weiner J. Aujourd'hui, la plupart des liquides ioniques utilisés sont liquides à température ambiante ("RTILs : Room Temperature Ionic Liquids") et selon cette définition, le premier liquide ionique est le nitrate d'éthylammonium (température de fusion de 12°C) publié par Paul Walden en 1914. L'apparition du terme "liquide ionique" et des liquides ioniques à proprement parler date du milieu du 20ième siècle. La première génération de liquide ionique était constituée d'un mélange de chlorure d'aluminiun et de N-butylpyridinium ou de dialkylimidazolium dans différentes proportions. Ces liquides ioniques de première génération étaient utilisés comme électrolytes conducteurs d'ions pour l'électrodéposition de métaux ou pour l'élaboration de batterie (Wilkes JS *et al.*, 1982; Gale RJ et Osteryoung RA, 1979). Ces liquides ioniques étaient difficiles à manipuler dans la mesure où ils étaient sensibles à l'oxygène et sujets à l'humidité et à la contamination microbienne.

La seconde génération de liquide ionique, apparue au début des années 1990, est composée de 1-alkyl-3-methylimidazolium associé à un anion (comme l'héxafluorophosphate) (Wilkes JS et Zaworotko MJ, 1992). Cette seconde génération de liquides ioniques possède différents avantages tels que l'inhibition de la croissance de microorganismes, la stabilité à l'air, une faible pression de vapeur et la capacité de dissolution de molécules difficiles à dissoudre dans l'eau telles que les carbohydrates ou les molécules hydrophobes. Ces différents avantages des liquides ioniques ont attiré l'attention des chercheurs et ils ont rapidement été proposés pour le remplacement des solvants organiques. Aujourd'hui, les liquides ioniques ainsi que leurs champs d'application se sont diversifiés; ces milieux sont utilisés dans des domaines tels que la catalyse, la biocatalyse, les sciences analytiques, l'électrochimie, les biotechnologies…

I. 3. 2. Les liquides ioniques

I. 3. 2. A. Définition

Un LI est un sel, composé d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique, dont la température de fusion est inférieure à 100°C. Les cations les plus fréquemment utilisés sont de type imidazolium, pyridinium, ammonium, pyrrolidinium ou phosphonium (schéma 23) (Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Les anions utilisés sont plus nombreux, cependant, les plus fréquemment utilisées sont l'héxafluorophosphate, le tetrafluoroborate, le methylsulfate ou le diméthylphosphate. Les différentes combinaisons cations/anions possibles sont à l'origine de la grande diversité des liquides ioniques. Les propriétés physicochimiques des liquides ioniques vont varier selon la combinaison cation/anion. Par exemple, comme les solvants organiques, les LIs peuvent être miscibles à l'eau ou non, ce qui aura une incidence directe sur les paramètres thermodynamiques à considérer.

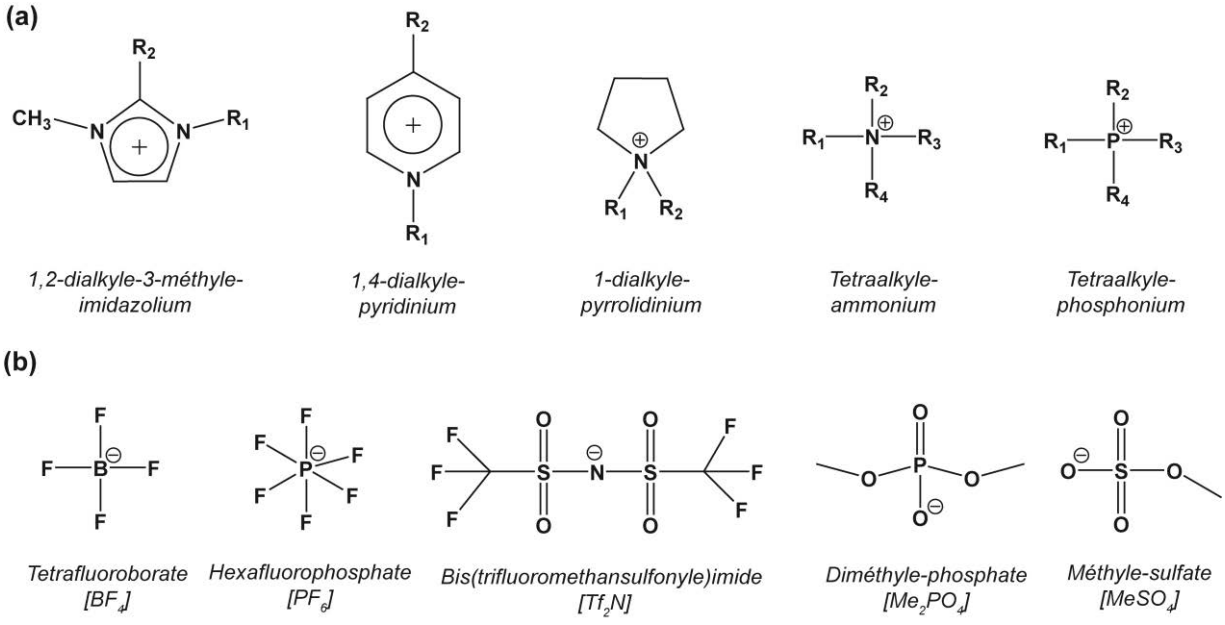


Schéma 23 : Structure des principaux cations (a) et anions (b) retrouvés dans la composition des LIs. Les chaînes alkyles sont représentées par la lettre R.

I. 3. 2. B. Propriétés physico-chimiques

A l'image des solvants organiques, les considérations thermodynamiques telles que l'activité de l'eau, le log de P ou le pH s'appliquent également aux réactions biocatalysées en LI. Néanmoins les LIs sont des espèces ioniques à différencier des solvants moléculaires classiques. Les propriétés d'un LI varient en fonction de la nature du cation et de l'anion qui le composent. Parmi les différents paramètres physico-chimiques tels que la viscosité ou la miscibilité à l'eau, la polarité du solvant est une notion difficile à appliquer aux LIs (Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). La polarité d'une molécule est liée à la différence d'électronégativité entre deux de ses atomes liés de manière covalente. Plus la différence d'électronégativité est importante et plus la molécule est dite polaire (possédant un fort moment dipolaire). Les solvants moléculaires classiques, tels que l'eau ou les solvants organiques, sont composés d'une seule espèce et la polarité du milieu peut aisément être anticipée par l'observation de la structure moléculaire du solvant. Par exemple, l'eau est un solvant polaire de par la différence d'électronégativité entre l'atome d'oxygène et l'atome d'hydrogène; l'hexane est un solvant apolaire du fait qu'il n'y ait pas ou peu de différence d'électronégativité entre les atomes de carbone et d'hydrogène. La notion de polarité *stricto sensu* est difficile à appréhender pour les LIs car ces derniers sont constitués d'espèces chargées (anion/cation). Les molécules polaires se solubilisent dans les solvants polaires et inversement. En ce qui concerne les LIs, la charge de l'anion et du cation laisse supposer que ces milieux sont polaires. Or certains LIs ne se dissolvent pas dans l'eau malgré leur charge.

Trois méthodes ont été utilisées afin d'estimer la polarité des LIs. Parmi ces différentes méthodes, l'utilisation des colorants solvato-chromiques, tels que le Rouge du Nil (Dutta AK *et al.*, 1996) ou les colorants de Reichardt, est la plus répandue (Weingärtner H, 2008). Le spectre d'absorption de ces colorants est modifié en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent. L'intensité, la longueur d'onde maximale et l'allure des bandes d'absorption des chromophores varieront en fonction de la polarité et de la structure moléculaire du solvant (Dutta AK *et al.*, 1996; Dzyuba SV et Bartsch RA, 2002). Les variations du spectre d'absorption peuvent être exprimées en un paramètre de polarité normalisé (E^N_T) compris entre 0 et 1. La valeur de 1 est attribuée à l'eau alors que la valeur 0 est attribuée au tétraméthylsilane.

Solvant	E^N_T
eau	1
Méthanol	0,762[b]
[EMIm][BF_4]	0,710[a]
[EMIm][Tf_2N]	0,676[a]
[BMIm][BF_4]	0,673[a]
[BMIm][PF_6]	0,667[a]
Ethanol	0,654[a]
[BMIm][Tf_2N]	0,642[a]
DMSO	0,444[a]
Dichlorométhane	0,309[a]
Hexane	0,009[b]
TMS	0

Tableau 6 : Polarité normalisée de différents solvants. Les valeurs, calculées à partir de colorants solvatochromiques de Reichardt sont extraites de [a]Weingärtner H, 2008 et de [b]Lee JM et Prausnitz JM, 2010.

Selon cette méthode le [BMIm][BF_4], le [BMIm][PF_6] et l'[EMIm][Tf_2N] ont une polarité de l'ordre d'un alcool faible (tableau 6) (Lee JM et Prausnitz JM, 2010; Weingärtner H, 2008; Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Malgré leur charge, les LIs ne sont pas nécessairement polaires; ils restent moins polaires que le méthanol. Les LIs contenant l'anion Tf_2N ou PF_6 sont chargés, polaires et non miscibles à l'eau, tandis que le DMSO est moins polaire et miscible à l'eau.

La polarité peut également être mesurée par l'observation de l'équilibre céto-énol, connu pour varier en fonction de la polarité du milieu (Earle MJ *et al.*, 2004), ou par la détermination de la constante diélectrique du milieu par l'intermédiaire de la spectroscopie diélectrique dans le domaine des micro-ondes (mégahertz, gigahertz) (Wakai C *et al.*, 2005).

Il est important de noter que les LIs sont composés d'un anion et d'un cation interagissant l'un avec l'autre et sont capables de former de nanodomaines en présence d'eau (Lopes JNAC et

Padua AAH, 2006). Ainsi, les caractéristiques d'un LI, telle que sa miscibilité à l'eau, sont plus le fait de l'interaction cation/anion que de sa polarité elle-même. Les différentes combinaisons cation/anion possibles supposent une multitude de LIs aux propriétés variées et difficiles à prévoir.

I. 3. 2. C. Avantages et inconvénients des liquides ioniques

En plus des avantages que possèdent les milieux organiques, les liquides ioniques ont pour avantage :

- d'être stable thermiquement
- d'avoir une pression de vapeur quasi nulle
- de posséder une large fenêtre électrochimique; c'est-à-dire qu'ils ne sont pas sujets à l'oxydation ou à la réduction sur une large gamme de potentiels (entre 2 et 4,5 V)
- certains liquides ioniques augmentent le temps de demi-vie des biocatalyseurs
- des propriétés de solubilisation importante de composés organiques ou inorganiques
- d'avoir des propriétés modulables en fonction de l'application souhaitée. Par exemple, par l'introduction de groupements fonctionnels, tels que les hydroxyles ou des polymères de PEG, ou par la substitution de chaînes alkyles de différentes tailles.

Les inconvénients des liquides ioniques sont :

- la difficulté de prévoir les propriétés physico-chimiques d'un liquide ionique donné
- l'effet dénaturant et inactivateur des biocatalyseurs dans les LIs miscibles à l'eau; à l'instar des solvants organiques polaires.
- leur synthèse qui ne répond pas toujours aux critères de la chimie verte

I. 3. 2. D. Les Liquides Ioniques : des solvants verts ?

Les liquides ioniques ont au départ été décrits comme "vert" du fait de leur faible pression de vapeur comme le titre ces articles de 2000 et de 2005 : "*Ionic liquids. Green solvents for the future*" (Earle MJ et Seddon KR, 2000) ou "*Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis*" (Yang Z et Pan WB, 2005). Cependant, l'analyse des effets des LIs sur différents organismes montre que ces milieux ne sont pas aussi verts et biocompatibles qu'ils peuvent le paraître (Thi PTP *et al.*, 2010).

Solvant	EC50 (µM)		
	IPC-81	*V. fischeri*	MCF-7
[EMIm][BF_4]	2754,23[a]	n.d.	n.d.
[PrMIm][BF_4]	> 1000[a]	8709±1,15[a]	n.d.
[BMIm][BF_4]	1380±1,04[a]	3548,13±1,09[a]	n.d.
[HMIm][BF_4]	891±1,2[a]	1513,56±1,07[a]	n.d.
[OMIm][BF_4]	54,95±1,05[a]	25,7±1,17[a]	n.d.
[DMIm][BF_4]	5,88±1,2[a]	0,65±1,15[a]	n.d.
[PrMIm][PF_6]	> 1000[a]	n.d.	n.d.
[BMIm][PF_6]	> 1000[a]	n.d.	n.d.
[HMIm][PF_6]	> 1000[a]	n.d.	n.d.
[OMIm][PF_6]	91,2±1,17[a]	n.d.	n.d.
[DMIm][PF_6]	31,6±1,09[a]	n.d.	n.d.
[Pyr_{14}][BF_4]	794,3[b]	n.d.	n.d.
[Pyr_{18}][BF_4]	66,07[b]	n.d.	n.d.
[Pyr_{14}][Br]	n.d.	n.d.	14,3.10[e]3[c]
[Pyr_{18}][Br]	n.d.	n.d.	80[c]
[Py4-4Me][BF_4]	>1000[b]	n.d.	n.d.
[Py8-4Me][BF_4]	30,09[b]	n.d.	n.d.
[N4444][Br]	178[b]	n.d.	n.d.
[P4444][Br]	1,66[b]	n.d.	n.d.
[Pip_{14}][Br]	n.d.	n.d.	12,5.10[e]3 [c]
[Pip_{18}][Br]	n.d.	n.d.	600 [c]
Méthanol	1585.10[e]3[a]	10000.10[e]3[a]	n.d.
Acétone	> 6310.10[e]3[a]	295.10[e]3[a]	n.d.
Acétonitrile	3162.10[e]3[a]	588.10[e]3[a]	n.d.

Tableau 7 : Toxicité des LIs sur trois types cellulaires. Les cellules IPC-81 sont issues d'une lignée de leucémie promyélocytaire de rats, Vibrio fischeri est une bactérie bioluminescente et les MCF-7 sont dérivées d'une lignée cellulaire de cancer du poumon chez l'Homme. La toxicité est reportée en EC50 ("half maximal Effective Concentration"). Ce terme correspond à la concentration efficace de solvant pour 50% de léthalité.

Références : [a]Ranke J et al., 2004; [b]Ranke J et al., 2007 et [c]Salminen J et al., 2007.

L'analyse des effets des LIs sur l'environnement démontre que les LIs à base d'imidazolium inhibent la croissance de l'algue *Cyclotella meneghiniana* (Latala A *et al.*, 2005). Les LIs à base d'imidazolium sont également cytotoxiques pour les bactéries luminescentes *Vibrio fischeri* et les IPC-81 (un lignée cellulaire issue de leucémie promyélocytaire chez le rat) (Ranke J *et al.*, 2004). Les LIs à base d'imidazolium, de pyridinium, de phosphonium et d'ammonium sont également cytotoxiques pour les ICP-81 (Ranke J *et al.*, 2007). Les cellules MCF-7, dérivées d'une lignée cellulaire de cancer du poumon chez l'Homme, sont également sensibles à la présence de LIs à base de piperidinium ou pyrrolidinium (Salminen J *et al.*, 2007). Les LIs sont environ 1000 fois plus toxiques que les solvants organiques pour les cellules ICP-81 (tableau 7). Le LI le moins toxique pour les ICP-81 à savoir le [BMIm][BF_4], possède une EC50 de 1,38 mM tandis que dans les mêmes conditions, l'EC50 du méthanol est de 1,585 M (tableau 7) (Ranke J *et al.*, 2004). Les LIs sont d'autant plus toxiques que le cation est de grande taille (Latala A *et al.*, 2005; Ranke J *et al.*, 2007). Par exemple l'EC50 du [BMIm][BF_4] sur les ICP-81 est de 1380 µM alors que celle de l'[OMIm][BF_4] est de 55 µM (tableau 7). Les cations substitués par de grandes chaînes alkyles se comportent comme des molécules amphiphiles et ont par conséquent des propriétés lipophyles supposées être à l'origine de la toxicité des LIs.

Dernièrement, une batterie de tests (eco)toxicologiques a été mise en place afin de pouvoir réellement tester l'aspect "vert" d'un LI donné (Thi PTP *et al.*, 2010). La toxicité ou compatibilité des LIs est testée à différents niveaux ; sur des enzymes, des bactéries marines, des algues marines, des cellules de mammifères, des crustacés d'eau douce et sur le poisson zèbre (schéma 24). La toxicité des LIs ainsi que l'effet de la taille du cation sont confirmés. Néanmoins, l'introduction de fonctions hydroxyles au niveau du cation réduit la toxicité ouvrant ainsi la voie pour la synthèse de LIs pas ou peu toxiques (Thi PTP *et al.*, 2010).

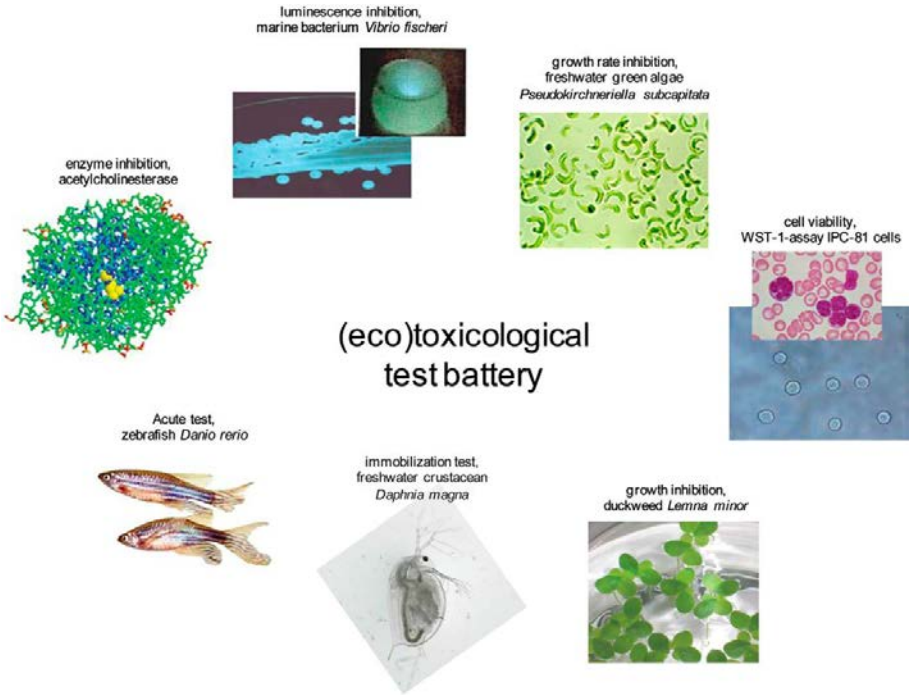


Schéma 24 : Test (eco)toxicologique mise en place par Thi PTP et al., 2010. Le test considère les compartiments terrestres et aquatiques. La toxicité est contrôlée à différents niveaux : les enzymes, les bactéries et algues marines, les cellules de mammifères, les crustacés d'eau douce et le poisson zèbre.

I. 3. 2. E. Applications des LIs en biocatalyse

Depuis les années 2000, les exemples de réactions biocatalysées en LI se sont multipliés. Proposés pour le remplacement des solvants organiques, les réactions en LIs sont essentiellement biocatalysées par des enzymes préalablement utilisées en milieu organique, les lipases étant les plus représentées (vanRantwijk F et Sheldon RA, 2007; van Rantwijk F *et al.*, 2003).

I. 3. 2. E. 1. Réactions catalysées par les lipases en LI

A l'instar des réactions biocatalysées par les lipases en milieux organiques non polaires, les lipases sont le plus souvent utilisées en présence de liquides ioniques non miscibles à l'eau tels que le [BMIm][PF_6] ou le [BMIm][Tf_2N]. La première étude fut la démonstration que la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est capable de catalyser des réactions de transesterification (alcoolyse, d'ammoniolyse et de perhydrolyse) dans le [BMIm][BF_4] (schéma 3) (Lau RM *et al.*, 2000). Lozano P. *et al.*, montrent que la CALB catalyse la synthèse de butylbutyrate à partir

de vinyl butyrate et de butanol dans 98% (v/v) d'[EMIm][BF_4], d'[EMIm][Tf_2N], de [BMIm][PF_6], ou de [BMIm][Tf_2N] à 50°C. Dans ces conditions, le biocatalyseur est 1,5 à 2 fois plus actif que dans le butanol seul utilisé comme solvant et 3 à 4 fois fois plus actif que dans l'hexane. Les LIs améliorent la demi-vie de la CALB d'un facteur de 2000, lorsque cette dernière est incubée en présence de son substrat (le butanol); cet effet stabilisant n'est pas reporté pour l'hexane ou le 1-butanol (Lozano P *et al.*, 2001).

Les LIs ont également l'avantage de pouvoir dissoudre des espèces polaires, telles que les hydrates de carbone, en plus grande quantité que les solvants organiques (Liu Q *et al.*, 2004). Par exemple, la solubilité du β-D-glucose est de 4,4 $g.L^{-1}$ dans le 1-methoxyethyl-3-methylimidazolium ([MOEMIM])[BF_4] tandis que dans le tert-Butyl alcool la solubilité est de 0,3 $g.L^{-1}$ (Liu Q *et al.*, 2004). La capacité des LIs à solubiliser les carbohydrates est utilisée afin de biocatalyser des réactions faisant intervenir ce type de substrats. Par exemple, l'acétylation du glucose catalysée par la CALB en LI conduit à la formation régiosélective du 6-O-acétyle glucose avec un rendement (99%) et une sélectivité (93%) supérieurs à ceux observés en milieu organique (schéma 25b) (Park S et Kazlauskas RJ, 2001). L'acétylation du glucose en milieu organique conduit à la formation d'un produit secondaire, le 3,6-O-diacétyle-D-glucose, difficile à séparer (Park S et Kazlauskas RJ, 2001). Par conséquent, en plus de leur capacité à solubiliser les carbohydrates, les LIs, tels que le [BMIm][BF_4], améliorent la régiosélectivité de la CALB d'un facteur 4 à 6 comparés aux solvants organiques classiques. En milieu organique, le rapport mol : mol de carbohydrate monoacétylé : diacétylé est de 2-3 : 1 tandis qu'en présence de LIs ce rapport est de 13-50 : 1.

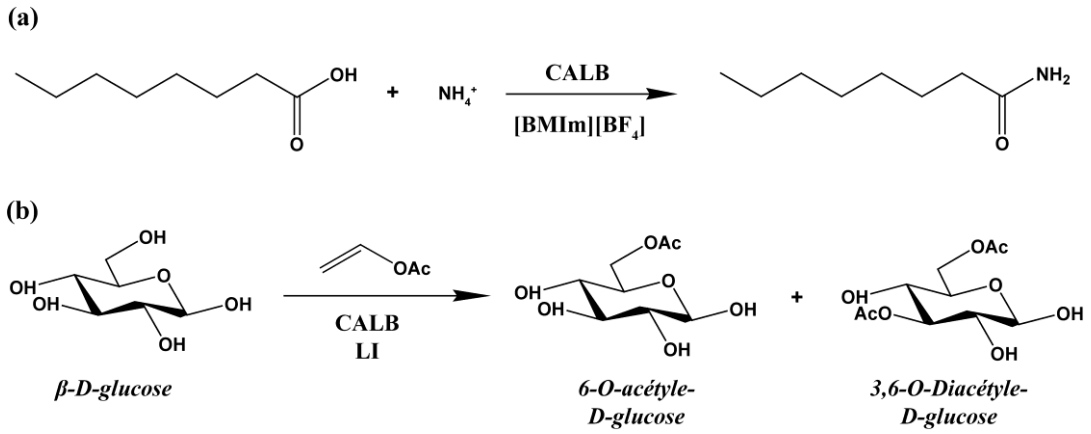


Schéma 25 : Exemples de réactions catalysées par les lipases en LIs. La réaction d'ammoniolyse de l'acide octanoïque en 1-amino octanone est représentée en (a) et l'acétylation régiosélective du glucose est représentée en (b).

I. 3. 2. E. 2. Réactions catalysées par les peptidases en LI

A l'image des réactions biocatalysées en milieu organique, les LIs sont utilisés dans le but de déplacer des équilibres réactionnels et de modifier la spécificité de substrat de réactions catalysées par les peptidases. La première étude fut la synthèse du dipeptide de Z–aspartame catalysée par la thermolysine dans du [BMIm][PF_6] (schéma 7). Le taux de conversion est similaire à celui obtenu en milieu organique; cependant la stabilité de l'enzyme est accrue (Erbeldinger M *et al.*, 2000). L'α-chymotrypsine a également été utilisée en présence de LIs non miscibles à l'eau tels que l'[OMIm][PF_6] ou le [BMIm][PF_6] afin de catalyser des réactions de transesterifications. L'activité du biocatalyseur en LI est du même ordre de grandeur qu'en présence d'acétonitrile ou d'hexane (Laszlo JA et Compton DL, 2001). Cependant, lorsque l'a_w est faible, l'α-chymotrypsine est plus active dans le [BMIm][Tf_2N] que dans l'acétate d'éthyle. L'enzyme est 2,6 fois plus active dans le [BMIm][Tf_2N], par comparaison avec l'acétate d'éthyle, lorsque l'activité de l'eau est de 0,33; et lorsque l'a_w est de 0,11, l'α-chymotrypsine est toujours active dans le LI tandis qu'elle est inactive dans le solvant organique (Eckstein M *et al.*, 2002).

I. 3. 2. E. 3. Réactions catalysées par les oxydoréductases en LI

Les oxydases ont été plus largement étudiées en liquides ioniques du fait de leur intérêt industriel pour la synthèse de molécules énantiopures. Les premières études ont consisté à utiliser la laccase de *Trametes sp.*, la peroxydase de Raifort et la peroxydase de soja en présence d'un LI miscible à l'eau, le [Pyr_{14}][BF_4], et d'un LI non miscible à l'eau, le [BMIm][PF_6]. L'activité des biocatalyseurs diminue lorsque la concentration de [Pyr_{14}][BF_4] augmente. Par exemple, la laccase présente 11% d'activité résiduelle en présence de 20% (v/v) de [Pyr_{14}][BF_4] et elle est totalement inactive à 75% (v/v) de ce même LI. En présence de [BMIm][PF_6] saturé en eau, les enzymes sont toujours actives, cependant l'activité spécifique de l'enzyme est faible (< 1% de l'activité des enzymes en milieu tamponné). En présence de 20% (v/v) de *tert*-butanol, la laccase présente 82% de son activité initiale mesurée en absence de solvant. Cette étude démontre qu'il est donc possible de biocatalyser des réactions d'oxydo-réduction en présence de LIs; malgré le fait que les biocatalyseurs soient faiblement actifs dans ces milieux (Hinckley G *et al.*, 2002).

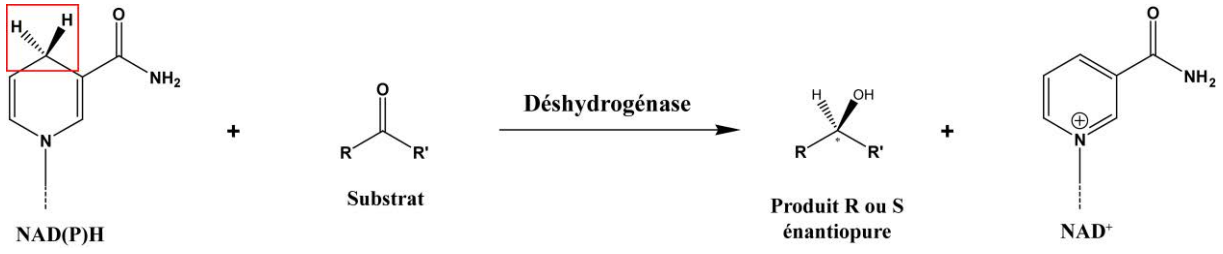


Schéma 26 : Réduction régio- et stéréo-sélective de cétone par les déshydrogénases. Seul le groupement nicotinamide du NAD(P) est représenté.

Les LIs composés d'un cation de petite taille, tel que le [MMIm], ont un effet inhibiteur moins important. En présence de 75% (v/v) de [MMIm][$MeSO_4$], l'activité de la FDH de *Candida boidinii* est préservée; elle présente 98% de son activité initiale mesurée en absence de LI (Kaftzik N *et al.*, 2002). Ce LI permet également d'augmenter la solubilité de cétones utilisée dans la synthèse de produits énantiopures (schéma 26). Ainsi, la solubilité de l'acétophénone est de 200 mM en présence de 40% (v/v) de [MMIm][$MeSO_4$] au lieu de 20 mM en solution aqueuse (Kaftzik N *et al.*, 2002).

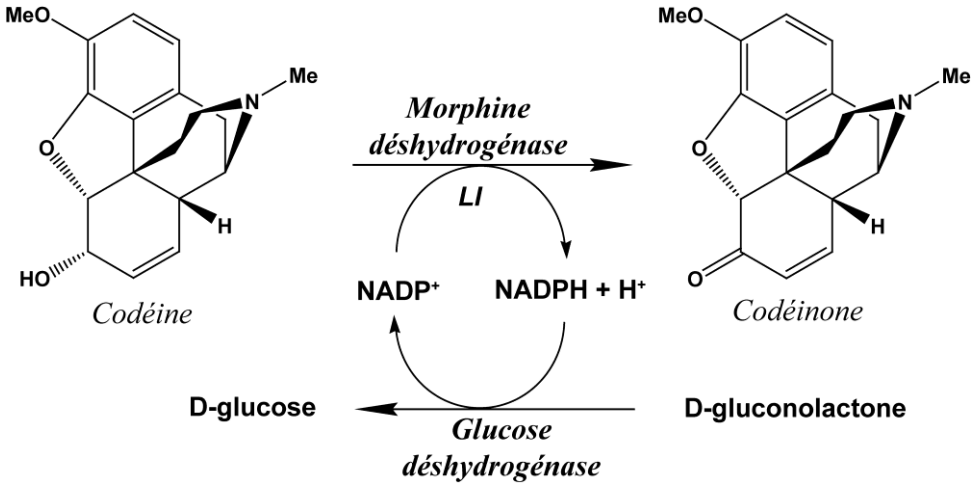


Schéma 27 : Oxydation de la codéine par la morphine déshydrogénase en LI.

L'hydroxylation du cation permet également de réduire l'effet inibiteur des LIs. Le [HO-PrMIm] (1-hydroxypropyl-3-methylimidazolium) glycolate est utilisé comme milieu pour l'oxydation la codéine en codéinone par la morphine déshydrogénase (MDH) de *Pseudomonas putida* M10 (schéma 27) (Walker AJ et Bruce NC, 2004). Le $NADP^+$ est régénéré par l'action de la glucose déshydrogénase (GDH) de *Cryptococcus uniguttulatus* (schéma 27) (Walker AJ et Bruce NC, 2004). Dans ce LI visqueux, les deux déshydrogénases sont toujours actives en présence de faibles quantités d'eau (< 100 ppm). Les vitesses de réaction sont néanmoins diminuées; la quantité de codéinone produit au bout de 24h est 1,56 fois moindre en comparaison de la réaction catalysée dans l'eau (Walker AJ et Bruce NC, 2004). La diminution de la vitesse de réaction est très probablement liée à des contraintes de diffusion des espèces du fait de la viscosité du milieu. Les LIs composés d'un cation contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène sous différentes formes (alcool, éther, carboxyle…) améliorent dans certains cas le temps de demi-vie du biocatalyseur. Par exemple, en présence de 10% (v/v) d'AmmoEng™ 102 (schéma 28), le temps de demi-vie de la glucose déshydrogénase est augmentée de plus de 2,4 fois par comparaison à son temps de demi-vie en absence de LI (Hussain W *et al.*, 2008). Ce type de cation hydroxylé est moins hydrophobe et peut établir des liaisons de faible énergie avec le biocatalyseur et son cofacteur augmentant ainsi leur solubilité.

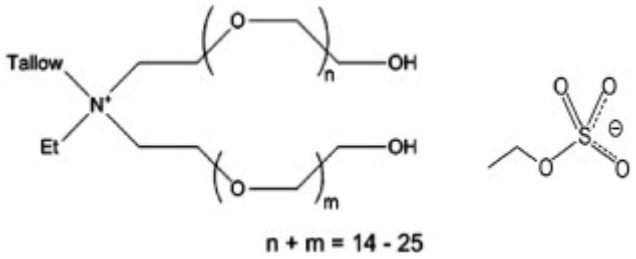


Schéma 28 : Représentation du tetraalkyl ammonium ethylsulfate ("AmmoEng™ 102"). "Tallow" correspond à une chaîne alkyle à 18 carbones.

I. 3. 2. F. Effets des liquides ioniques sur la structure des protéines

A l'instar des solvants organiques, les LIs non miscibles à l'eau tendent à stabiliser les protéines en entrainant leur rigidification, tandis que les LIs miscibles à l'eau ont un effet dénaturant sur les protéines. L'effet précis des LIs miscibles à l'eau sur la structure des protéines est encore aujourd'hui en cours d'étude.

I. 3. 2. F. 1. Les notions de kosmotropie et de chaotropie d'une espèce ionique

Un ion est défini comme étant kosmotrope ou chaotrope en fonction de sa capacité à interagir avec les molécules d'eau. Du grec ancien "kosmos" qui signifie "l'ordre", les ions kosmotropes interagissent et structurent le réseau d'eau ce qui se traduit par une augmentation de la viscosité de la solution contenant ce type d'ions. Du grec ancien "chaos" qui signifie "le désordre" ou "la confusion", les ions chaotropes n'interagissent pas ou peu avec les molécules d'eau et ils déstructurent le réseau semi-crystallin de l'eau.

La viscosité de la solution contenant l'espèce ionique (cation ou anion) est directement liée à sa kosmotropie/chaotropie. La contribution de l'espèce ionique à la viscosité de la solution est définie par l'équation 6 de Jones-Dole (Marcus Y, 1994; Jones D et Dole M, 1929):

$$\eta/\eta_0 = 1 + Ac^{1/2} + Bc + Dc^2 + \ldots \qquad (6)$$

Où c est la concentration de l'espèce ionique, η la viscosité de la solution d'électrolyte, η_0 la viscosité de l'eau pure, A, B et D des coefficients de viscosités spécifiques de l'ion étudié. Le coefficient A est lié aux interactions électrostatiques de longue portée et n'est à considérer que lorsque les solutions sont fortement diluées. Inversement, le terme D n'intervient qu'en présence de solutions fortement concentrées. Le coefficient de viscosité B de Jones-Dole (ou coefficient B) est lié à l'interaction de l'ion avec les molécules d'eau, il est utilisé pour caractériser la kosmotropie/chaotropie d'une espèce donnée. Les ions kosmotropes ont un coefficient B positif tandis que les ions chaotropes ont un coefficient B négatif (Collins KD, 1997; Zhao H, 2006d).

Le coefficient B, et par conséquent la kosmotropie/chaotropie, est liée à la taille de l'ion. Plus l'ion est petit, plus le rapport charge/taille est important et plus il structurera le réseau d'eau (schéma 29) (Collins KD, 1997; Marcus Y, 1994; Hribar B *et al.*, 2002). Par exemple, l'ion fluorure (F^-) est kosmotrope : son rayon est de 133 pm et son coefficient B est de 0,155 $dm^3.mol^{-1}$ tandis que l'ion iodure (I^-) est chaotrope : son rayon est de 220 pm et son coefficient B est de -0,097 $dm^3.mol^{-1}$ (tableau 8) (Marcus Y, 1994; Zaho H, 2006d, Yang Z, 2009).

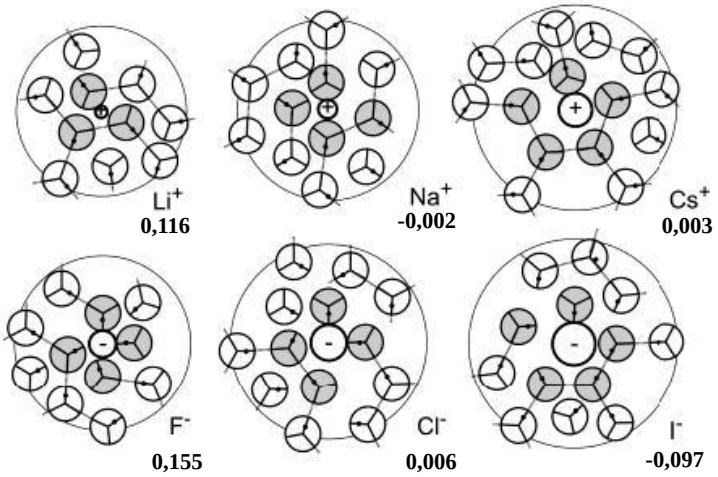


Schéma 29 : Distribution des molécules d'eau autour d'ions de différentes tailles calculée par des simulations mathématiques (de type Monte Carlo). Les molécules d'eau sont représentées par des disques où les liaisons hydrogènes possibles sont représentées par des traits et le moment dipolaire par une flèche (image extraite de Hribar B et al., 2002). Les cofficients B de viscosité en $dm^3.mol^{-1}$ reportés sont extraits de Zhao H, 2006d.

I. 3. 2. F. 2. La série de Hofmeister

I.3.2.F.2.a La série de Hofmeister appliquée aux ions inorganiques

La série de Hofmeister est une classification des ions inorganiques en fonction de leur effet stabilisant ou dénaturant sur les structures protéiques en solution. La notion de kosmotropicité/chaotropicité est liée à la taille et la charge de l'espèce ionique (cation ou anion) (Zhao H, 2006d). Plus l'ion est petit et par conséquent chargé (si l'on considère le rapport charge/taille entre deux molécules de charge égale) plus il sera kosmotrope (son coefficient B sera plus grand). Par exemple, l'anion HPO_4^{2-} est kosmotrope (B = 0,179 $dm^3.mol^{-1}$) tandis que l'anion $H_2PO_4^-$ est à la limite kosmotrope/chaotrope (B = - 0,058 $dm^3.mol^{-1}$) alors que ces deux ions ont la même taille (Marcus Y, 1994; Zaho H, 2006d ; Yang Z, 2009).

I.3.2.F.2.a.1 Effets des anions inorganiques sur les structures protéiques

Selon Hofmeister, plus l'**anion** inorganique est kosmotrope, c'est-à-dire petit, et plus il aura tendance à stabiliser les structures protéiques et inversement (tableau 8) (Marcus Y, 1994 : Collins KD, 1997).

L'hypothèse est que les anions kosmotropes réduisent la solubilité des espèces hydrophobes. Ceci est communément appelé le phénomène de "salting out". Au niveau structural, le phénomène de "salting out" augmenterait les interactions hydrophobes au sein des protéines, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter l'énergie libre de dépliement (Baldwin RL, 1996). Les enzymes nécessitent un niveau d'hydratation minimum afin d'être structurées et actives. La couche d'hydratation essentielle d'une protéine correspond aux molécules d'eau entourant cette dernière et nécessaire à sa structuration. En conditions non naturelles, telles qu'en présence de solvants organiques, les anions kosmotropes pourraient jouer un rôle dans la structuration et le maintient de la couche d'hydratation essentielle des protéines (Yang Z, 2009 ; Baldwin RL, 1996). Les ions chaotropes augmentent la solubilité des espèces non polaires et réduisent les interactions hydrophobes au sein et entre les protéines. Les ions chaotropes intéragissent préférentiellement avec la forme dénaturée des enzymes, c'est le phénomène de "salting in" (Baldwin RL, 1996).

Anions inorganiques	Coefficient B $dm^3.mol^{-1}$	Rayon de l'ion pm	**K**osmotrope **C**haotrope
F^-	0,155	133	K
Cl^-	0,006	181	K/C
NO_3^-	0,009	179	C
Br^-	-0,036	196	C
I^-	-0,097	220	C

Tableau 8 : Série de Hofmeister pour quelques anions inorganiques. Les données sont extraites de la publication de Zhao H, 2006d. La kosmotropie/chaotropie est estimée en fonction du coefficient B et de données expérimentales (Zhao H et al., 2006a). L'effet stabilisant sur les structures protéiques est indiqué par une flèche.

I.3.2.F.2.a.2 Effets des cations inorganiques sur les structures protéiques

Plus le **cation** inorganique est petit et plus il est kosmotrope (tableau 9, schéma 29 et 30). Les cations inorganiques ont un effet nuancé sur les structures protéiques et le lien kosmotropie/stabilisation structurale ne s'applique pas dans tous les cas. La paire cation/anion joue un rôle important dans l'explication des phénomènes observés (Collins KD, 1997). Les cations kosmotropes inorganiques ont un rôle dual; ils vont d'une part stabiliser les protéines en interagissant avec les molécules d'eau ("salting out") mais également les déstabiliser en interagissant avec leurs régions polaires (Yang Z, 2009). Les cations kosmotropes interagissent également avec les anions kosmotropes, réduisant ainsi l'effet stabilisant de ces derniers sur les protéines (Collins KD, 1997). L'effet stabilisant des cations chaotropes est expliqué par le fait qu'ils pourraient réduire l'effet déstabilisant des anions chaotropes (déstabilisants) en solution (Yang Z, 2009; Collins KD, 1997). La tendance générale semble aller dans le sens où le cation chaotrope est plus stabilisant que le cation kosmotrope (schéma 30).

Cations inorganiques	Coefficient B $dm^3.mol^{-1}$	Rayon de l'ion pm	**K**osmotrope **C**haotrope
Li^+	0,116	69	K
Na^+	-0,002	102	K/C
K^+	-0,033	138	C
NH_4^+	-0,027	148	C

Tableau 9 : Série de Hofmeister pour quelques cations inorganiques. Les données sont extraites de la publication de Zhao H, 2006d. La kosmotropie/chaotropie est estimée en fonction du coefficient B et de données expérimentales (Zhao H et al., 2006a). L'effet stabilisant sur les structures protéiques est indiqué par une flèche.

I.3.2.F.2.b La série d'Hofmeister appliquées aux LIs

En conditions physiologiques, la plupart des anions sont kosmotropes (phosphates et carboxylates) et la plupart des cations sont chaotropes (potassium, chaînes latérales de arginine, histidines et lysines…) (Schéma 30). Ces paires ioniques permettent de stabiliser le contenu protéique cellulaire et de le maintenir sous forme soluble (Collins KD, 1997).

Les LIs ne sont rien d'autre qu'une classe particulière de sel et sont composés d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. L'étude des liquides ioniques nécessite la considération de la paire cation/anion. Zhao a défini une échelle de coefficient B sur la base d'équations empiriques qui permettraient de déterminer le caractère d'un ion en phase avec les expérimentations (Zhao H, 2006d).

L'analyse de l'effet du cation ou de l'anion sur la structure/activité de la protéase Amano P6 d'*Aspergillus melleus* (Zhao H *et al.*, 2006a; Zhao *et al.*, 2006b) montre qu'à l'instar des systèmes biologiques (Collins KD, 1997), les liquides ioniques stabilisant sont composés d'un anion kosmotrope associé à un cation légèrement chaotrope (schéma 30) (Zhao H, 2006d).

La relation entre la taille/charge de l'ion et sa kosmotropicité/chaotropicité est différente selon la composition de l'ion. En ce qui concerne les anions, trois catégories d'ions se distinguent. Premièrement, les halogènes (F^-, Cl^- et Br^-) dont la kosmotropicité augmente lorsque l'anion est petit (Schéma 30, tableau 8). En deuxième lieu, les anions oxygénés dont la kosmotropie augmente parallèlement à leur taille (Schéma 30). Enfin, les anions BF_4^- et PF_6^-, particulièrement chaotropes et déstructurant du fait de leur caractère hydrophobe, malgré une taille médiane (Schéma 30).

Les cations organiques des LI ont un coefficient B positif et sont donc considérés comme kosmotropes. La kosmotropicité du cation organique augmente parallèlement à sa taille, un phénomène à l'opposé des cations inorganiques dont la kosmotropicité augmente lorsque la taille diminue (Schéma 30). Or les cations stabilisant sont chaotropes (Baldwin RL, 96; Zhao H, 06d); par conséquent, plus le cation organique est de petite taille et plus il sera chaotrope et stabilisant (Schéma 30). Ainsi, l'activité de la Amano P6 d'*Aspergillus melleus* est moins affecté par le cation [EMIm], dont le coefficient B est de 0,491 $dm^3.mol^{-1}$ et le rayon est de 305 pm, que par le cation [BMIm] dont le coefficient B est de 0,610 $dm^3.mol^{-1}$ et le rayon est de 331 pm (schéma 30) (Zhao H *et al.*, 2006a). Les LIs stabilisants sont donc composés d'un grand anion kosmotrope comportant un ou des atomes d'oxygène et d'un petit cation organique légèrement chaotrope.

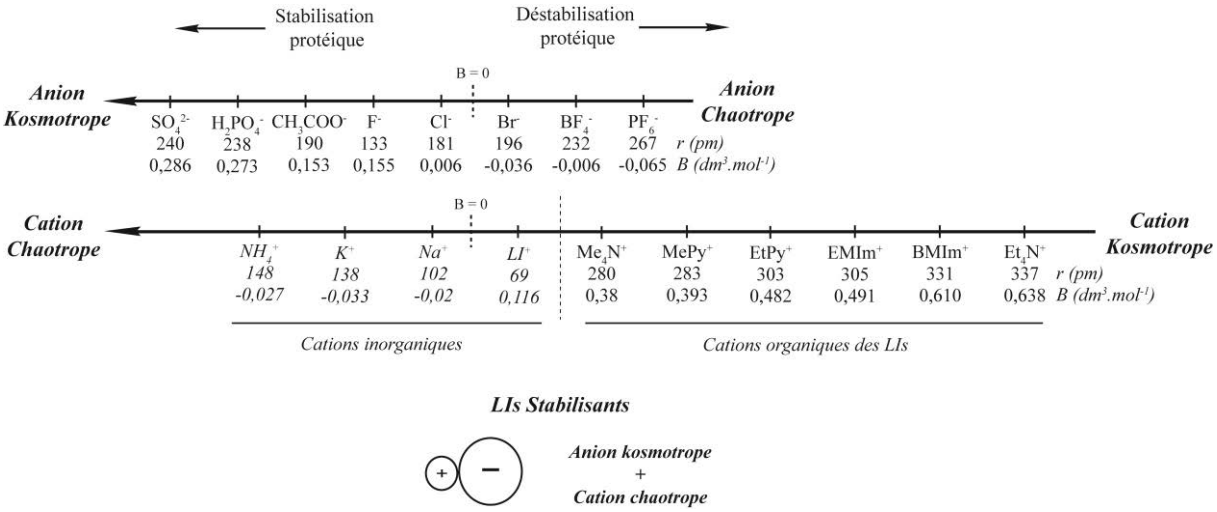


Schéma 30 : Schéma résumant les propriétés de kosmotropie et de chaotropie des ions composant les LIs en relation avec leurs effets stabilisants. L'effet stabilisateur des ions est indiqué par le sens des flèches. Les différents ions sont classés en fonction de leur effet stabilisant. Les coefficients B ainsi que les rayons des ions sont reportés de la revue de Zhao H (Zhao H, 2006d). Les cations inorganiques, ne composant pas les LIs et conduisant à des sels solides, sont inclus pour illustration.

La série d'Hofmeister et les notions de kosmotropie et chaotropie expliquent en partie pourquoi un LI donné est plus stabilisant qu'un autre, mais ne nous donne aucune information en ce qui concerne les raisons de l'inactivation des enzymes en LI. Les données empiriques décrites ci-dessus ne permettent pas de prévoir le comportement d'une enzyme donnée dans un LI précis. De plus, le lien entre kosmotropie/chaotropie et stabilisation structurale est discutable (Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007) parce que le coefficient B n'est valable que pour des solutions moyennement diluées et pas pour des LIs concentrés ou purs. Les mesures par calorimétrie de kosmotropie/chaotropie d'espèces ioniques montrent que ce caractère n'est pas nécessairement lié à un effet stabilisateur (Batchelor JD *et al.*, 2004; Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Par conséquent, il est important d'étudier le comportement des enzymes en liquides ionique afin de pouvoir comprendre les phénomènes responsables de l'inactivation et ceci dans le but d'obtenir des biocatalyseurs actifs dans ces milieux.

I. 3. 3. Analyse structurale en LI

I. 3. 3. A. Problèmes liés à l'analyse structurale en LI

La relation structure/activité d'un biocatalyseur laisse supposer une dénaturation du biocatalyseur en LI. L'analyse structurale en LI se heurte à des contraintes liées aux propriétés optiques de ces milieux. La structure ou la conformation des protéines en milieux aqueux est couramment évaluée à l'aide de techniques optiques telles que le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge ou de la fluorescence. Les structures secondaires sont à l'origine de signaux caractéristiques en infrarouge ou dans l'UV lointain (dichroïsme circulaire). La structure tertiaire ou la conformation globale d'une protéine peut être évaluée dans le proche UV (dichroïsme ou fluorescence). Il est important de noter qu'à concentration équivalente de protéine, les méthodes optiques donnent un signal dont l'intensité est directement proportionnelle au taux de structuration; la dénaturation est caractérisée par la diminution (voir la perte totale) de ce signal.

La difficulté de l'étude des structures protéiques en LI résulte donc d'une part du fait que les liquides ioniques absorbent dans l'UV-visible, et d'autre part du fait qu'il ne soit pas possible d'obtenir un signal optique suffisamment intense correspondant à une structure secondaire ou tertiaire ou à une structure dénaturée ("coil") en présence de fortes concentrations de LI. Toutefois, différents travaux ont cherché à étudier la structure de protéines en LI par l'intermédiaire de différentes méthodes spectroscopiques usuelles.

I. 3. 3. B. Spectroscopie Infrarouge en LI

I. 3. 3. B. 1. Principe de la spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge fait intervenir les niveaux énergétiques vibrationnels des molécules. La transition entre deux niveaux d'énergie de vibration est permise lorsque la molécule est irradiée par une onde électromagnétique dont la longueur d'onde est dans le domaine de l'infrarouge ($0{,}78\ \mu m < \lambda < 1000\ \mu m$). Les liaisons interatomiques dont le moment dipolaire est non nul, telles que -CO, -OH, -NH, absorbent dans le domaine de l'infrarouge. Deux modes de vibrations sont essentiellement utilisés pour l'analyse des spectres infrarouges; les vibrations

d'élongation dans le sens de la liaison covalente (notées υ) et les vibrations de déformations (notées δ).

Concernant les protéines, neuf bandes caractéristiques de la liaison peptidique sont visibles en infrarouge. Parmi celles-ci les bandes amides A, B, I et II sont principalement utilisées lors des analyses structurales (tableau 10) (Kong J et Yu S, 2007). Les bandes amides A et B sont dues à la vibration de la liaison chimique du groupement -NH, la bande amide I est essentiellement due à la vibration de la liaison chimique du groupement -CO et la bande amide II à la vibration de déformation du groupement -NH et à la vibration de la liaison chimique -CN.

désignation	**Fréquence (cm^{-1})**	**Description**
Amide A	3300	υNH
Amide B	3100	υNH
Amide I	1600-1690	υCO
Amide II	1480-1575	υCN, δNH
Amide III	1229-1301	υCN, δNH
Amide IV	625-767	δOCN
Amide V	640-800	δNH hors du plan
Amide VI	537-606	δCO hors du plan
Amide VII	200	Torsion du squelette

Tableau 10 : Bandes infrarouges caractéristiques de la liaison peptidique (Kong J et Yu S, 2007).

Au niveau protéique, les structures secondaires induisent la formation de liaisons hydrogènes et par conséquent entraînent une variation des énergies de vibration. La bande amide I est principalement utilisée pour déterminer les structures secondaires des protéines. En fonction de la structure secondaire dans laquelle la liaison peptidique est impliquée (hélice α, apériodique, feuillet plissé β), la bande amide I a un nombre d'onde caractéristique (cf. tableau 10).

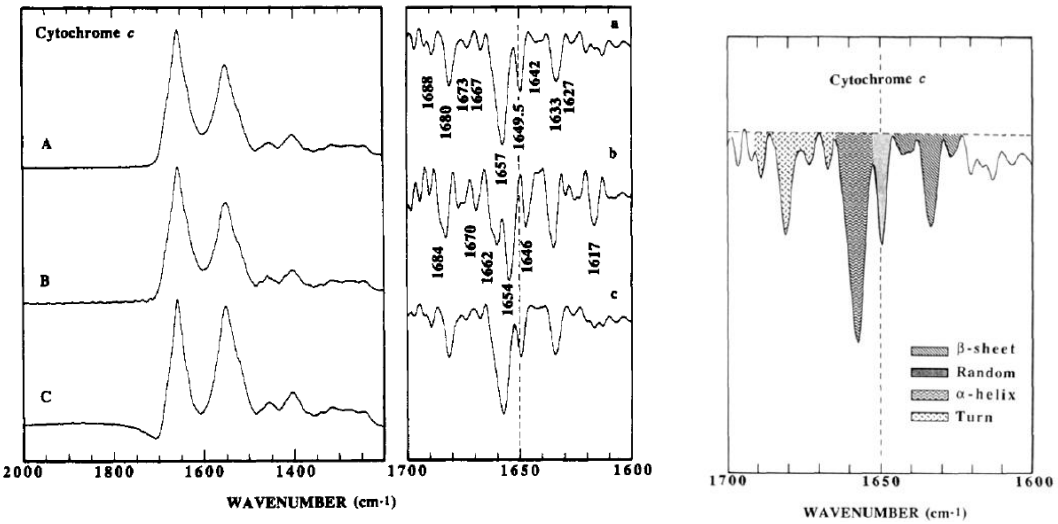


Figure 2 : Spectres infrarouges du cytochrome c de cœur de cheval en solution aqueuse à 1% de NaCl corrigé selon différents critères. Le spectre A est corrigé de l'apport de la vapeur d'eau (critère I de correction) et de sorte que la ligne de base soit droite (critère II) (a et A). Le spectre B ne satisfait que le critère II et le spectre C ne satisfait que le critère I. La dérivée seconde (a, b et c) des différents spectres est reportée sur la droite des spectres bruts. La contribution des éléments de structures secondaires à la dérivée seconde de la bande amide I est reportée à droite. Les images sont extraites de Dong A et al., 1990.

Le spectre brut de la bande amide I (1700-1600 cm^{-1}) correspond à la somme des contributions des différents éléments de structures secondaires. Des méthodes mathématiques, telles que l'utilisation des dérivés secondes ou la transformée de Fourrier ("FTIR : Fourrier Transformed Infrared Spectroscopy"), permettent d'augmenter la résolution et de distinguer la contribution des éléments de structure secondaire (figure 2). La bande amide I déconvoluée est résolue en plusieurs bandes en fonction de la nature de la structure secondaire (figure 2, tableau 11) (Kong J et Yu S, 2007; Dong A *et al.*, 1990). Les bandes aux alentours de 1658-1650 cm^{-1} sont attribuées aux hélices α, les bandes vers 1663 cm^{-1} sont attribuées aux hélices 3_{10}. Les feuillets plissés β produisent des bandes aux alentours de 1640-1620 et 1695-1675 cm^{-1}. Les coudes β sont à l'origine de signaux aux alentours de 1670, 1683, 1688 et 1694 cm^{-1} (tableau 11) (Kong J et Yu S, 2007).

H_2O Fréquences moyennes (cm^{-1})	Structure secondaire	D_2O Fréquences moyennes (cm^{-1})	Structures secondaires
1624±1,0	feuillet-β	1624±4,0	feuillet-β
1627±2,0	feuillet-β		
1633±2,0	feuillet-β	1631±3,0	feuillet-β
1638±2,0	feuillet-β	1637±3,0	feuillet-β
1642±1,0	feuillet-β	1641±2,0	hélice 3_{10}
1648±2,0	désordonné	1645±4,0	désordonné
1656±2,0	hélice-α	1653±4,0	hélice-α
1663±3,0	hélice 3_{10}	1663±4,0	coude-β
1667±1,0	coude-β	1671±3,0	coude-β
1675±1,0	coude-β	1675±5,0	feuillet-β
1680±2,0	coude-β	1683±2,0	coude-β
1685±2,0	coude-β	1689±2,0	coude-β
1691±2,0	feuillet-β	1694±2,0	coude-β
1696±2,0	feuillet-β		

Tableau 11 : Bandes assignées aux structures secondaires des protéines dans l'H_2O ou le D_2O issues de la déconvolution de la bande amide I, les valeurs sont extraites des spectres de dérivés secondaires (Kong J et Yu S, 2007; Dong A *et al.*, 1990*).*

La déconvolution des spectres infrarouges permet d'amplifier les variations spectrales; cependant les différences spectrales, tel que la soustraction du solvant, peuvent conduire à des interprétations erronées (figure 2) (Dong A *et al.*, 1990). Par exemple, la pertinence du spectre infrarouge nécessite que la ligne de base soit stable entre 2000 et 1700 cm^{-1} et que le spectre soit corrigé par la contribution de l'eau et de la vapeur d'eau (figure 2). Le contenu en hélice α varie selon les corrections appliquées et est par conséquent difficile à interpréter. La deuxième difficulté de la spectroscopie infrarouge est due à la grande quantité d'enzyme nécessaire pour l'obtention d'un spectre. Par exemple, Dong A *et al.*, utilisent une solution de cytochrome c à

une concentration de 50 mg.mL^{-1}; une concentration difficilement applicable aux biocatalyseurs précieux (Dong A *et al.*, 1990).

I. 3. 3. B. 2. Exemples d'analyses structurales par FTIR en LI

La structure du cythochrome c, en présence de LIs dont le cation n'est pas de type imidazolium, a été analysée par FTIR (Fujita K *et al.*, 2005 et 2006). Les spectres IR du cytochrome c de cœur de cheval ont été mesurés en solution aqueuse ou en présence de [Pyr$_{14}$][dca] (dca : dicyanamide) ou de [Pyr$_{14}$][dhp] (dhp : dihydrogène phosphate) entre 0 et 130 °C (Fujita K *et al.*, 2005). L'apparition d'une bande entre 1626 cm^{-1} sur le spectre brut et sur la dérivée seconde en solution aqueuse à 80°C est attribuée à une forme désordonnée du cytochrome (Fujita K *et al.*, 2005). A 80°C, cette bande n'est pas retrouvée en présence de [Pyr$_{14}$][dca] ou de [Pyr$_{14}$][dhp]. Les auteurs concluent alors l'amélioration de stabilité thermique du cytochrome c en LI (Fujita K *et al.*, 2005). L'augmentation de la demi-vie du cytochrome c en présence de [Pyr$_{14}$][dca] ou de [Pyr$_{14}$][dhp] est également démontrée selon la même méthode (Fujita K *et al.*, 2006). Il est important de noter que l'attribution de cette bande est de fait expérimentale et que la région de 1640-1620 cm^{-1} correspond en théorie aux feuillets β (Dong A *et al.*, 1990). La correction du spectre et la contribution de la vapeur d'eau joue probablement un rôle dans les phénomènes observés.

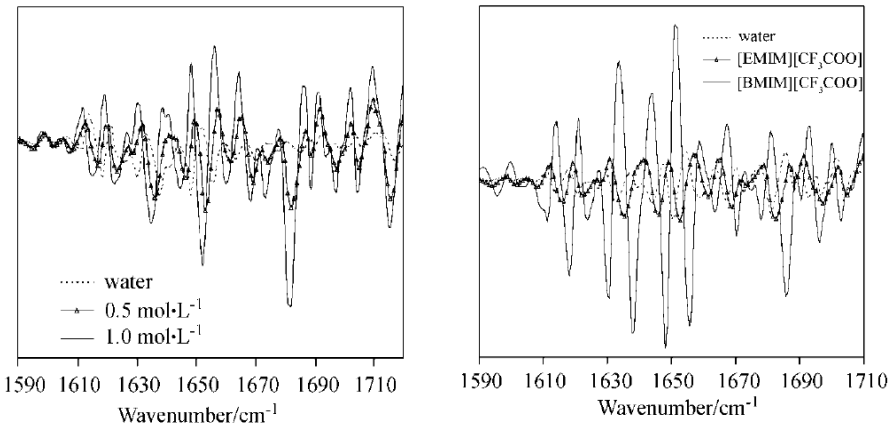


Figure 3 : Spectres de dérivées secondes de la protéase P6 en présence de différentes concentrations de [EMIm][CF$_3$COO] ou de 0,5 M [EMIm][CF$_3$COO] ou de [BMIm][CF$_3$COO]. Les figures sont extraites de la publication de Zhao H et al. (Zhao H et al., 2006b).

La structure de la protéase P6 dans des LIs à base d'imidazoliums a également été étudiée par FTIR (Zhao H *et al.*, 2006b). En présence de concentrations croissantes de LIs, les spectres d'allure sinusoïdale ont une amplitude plus importante ce qui est interprété comme de la dénaturation. Des spectres similaires ont été utilisés afin de démontrer l'amélioration de la stabilité thermique et de la demi-vie de la CALB en présence de LIs à base de [BMIm] associés à des anions fonctionnalisés par des groupements éther-oxyde ou carboxylate (Zhao H *et al.*, 2009). Les dérivées secondes des spectres ont une allure atypique difficilement interprétable (figure 3). En théorie, la dérivée seconde conduit à l'observation d'un pic entre 1660 et 1655 cm^{-1} caractéristique des hélices α (figure 2 à droite). L'allure sinusoïdale des spectres, associée à la difficulté intrinsèque de la technique d'infrarouge d'estimer les structures secondaires en raison des problèmes de correction, suggère l'impossibilité d'extraire des informations d'ordre structural à partir de ces données (figure 3).

L'étude de structures protéiques par infrarouge nécessite donc une attention particulière pour l'analyse des résultats; la contribution du milieu ainsi que la vapeur d'eau conduit souvent à des résultats artéfactuels.

I. 3. 3. C. Dichroïsme circulaire en LI

I. 3. 3. C. 1. Principe du dichroïsme circulaire

Le phénomène de dichroïsme circulaire (DC) correspond à l'interaction d'une lumière polarisée plane (somme de deux lumières polarisées circulairement à droite et à gauche) avec des molécules possédant un centre chiral. Les molécules chirales absorbent de manière préférentielle une des composantes de la lumière polarisée (droite ou gauche) induisant ainsi le phénomène d'ellipticité de la lumière (schéma 31). La différence d'absorption (ΔA) est généralement exprimée en ellipticité (θ); la conversion de l'absorption en ellipticité se fait par un simple calcul numérique ($\theta = 32{,}98\ \Delta A$).

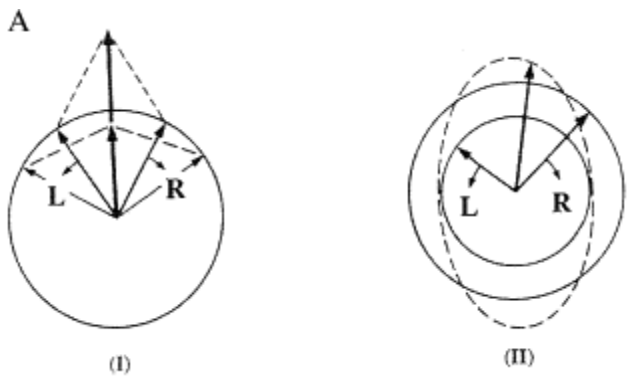


Schéma 31 : Représentation schématique du phénomène de dichroïsme circulaire. (I) Représentation d'une lumière polarisée plane, somme de deux lumières polarisées circulairement à gauche ("L : left") et à droite ("R : right") d'égale amplitude. (II) La lumière polarisée circulairement gauche est absorbée; l'onde résultante est polarisée elliptiquement. La figure est extraite de Kelly SM et al., 2005.

Dans la région du lointain UV, comprise entre 180 et 240 nm, l'absorption de la lumière par les protéines est principalement due à la liaison peptidique. Deux transitions sont principalement observées; une transition n – π* aux alentours de 220 nm et une transition π – π* plus intense aux alentours de 190 nm (Kelly SM *et al.*, 2005). En solution, les mesures d'ellipticité des protéines dans l'UV (entre 180 et 260 nm) fournissent des spectres caractéristiques de protéines structurées (figure 4). Les mesures d'ellipticité sont corrélées à l'état de structuration des protéines; notamment, l'ellipticité à 220 nm est couramment utilisée afin d'évaluer le taux d'hélices α (Kelly SM *et al.*, 2005).

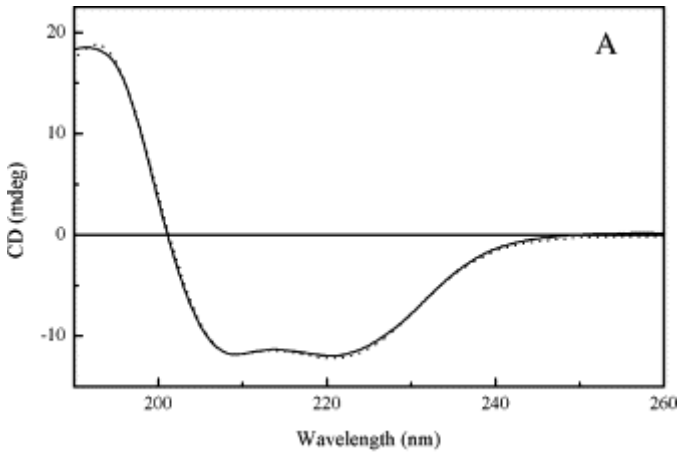


Figure 4 : Spectre de dichroïsme circulaire du cytochrome P450 de Bacillus megaterium. La figure est extraite de Kelly SM et al., 2005; une adaptation de Munro AW et al., 1994.

Le dichroïsme circulaire peut également être mesuré dans le proche UV entre 260 et 340 nm. Les spectres de dichroïsmes circulaires dans cette région spectrale sont une empreinte de la conformation globale de la protéine. Les acides aminés aromatiques sont à l'origine de ces spectres. Le signal correspondant aux résidus tryptophanes se situe entre 290 et 305 nm, celui des tyrosines entre 275 et 282 nm et celui de la phénylalanine entre 255 et 270 nm (Kelly SM *et al.*, 2005). Cette méthode est simple à mettre en œuvre, cependant les données obtenues sont assez sommaires. L'inconvénient est que le dichroïsme dans le proche UV nécessite des échantillons concentrés (> 5 $mg.mL^{-1}$) (Krell T *et al.*, 1996) ce qui conduit parfois à la formation d'agrégats rendant l'interprétation difficile. De plus, les acides nucléiques contaminants absorbent fortement aux alentours de 260 nm et interfèrent avec le signal propre à la protéine (Kelly SM *et al.*, 2005).

I. 3. 3. C. 2. Exemple d'analyse structurale par dichroïsme circulaire en LI

La demi-vie de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) à 50°C dans l'eau, l'héxane, l'[EMIm][Tf_2N] ou le [btma][Tf_2N] (btma : butyltrimethylammonium) en présence de 2% (v/v) d'eau est analysée par dichroïsme circulaire (De Diego T *et al.*, 2005). Les auteurs déterminent le taux de chaque élément de structure secondaire à partir de spectre de dichroïsme circulaire et concluent à une stabilisation structurale et à une augmentation de la présence de feuillet plissé β en présence de LIs. La même méthode a été utilisée afin d'évaluer la structure de l'α-chymotrypsine en présence d'[EMIm][Tf_2N] (De Diego T *et al.*, 2004). En plus du biais dû aux logiciels d'estimation de structure secondaire, dont la pertinence dépend de l'échantillonnage utilisé, les spectres de dichroïsme circulaire en présence de LIs ont une allure singulière sujette à discussion et notamment en présence de l'[EMIm][Tf_2N] (figure 5) (De Diego T *et al.*, 2004 et 2005). De plus, les intensités des spectres en présence de LI sont de l'ordre de 10^{-3} $deg.cm^2.cm^{-3}$ tandis que bien souvent, les valeurs d'ellipticité molaire sont de l'ordre de 10^3-10^4 $deg.cm^2.cm^{-3}$ (Kelly SM *et al.*, 2005; Munroe AW *et al.*, 1994).

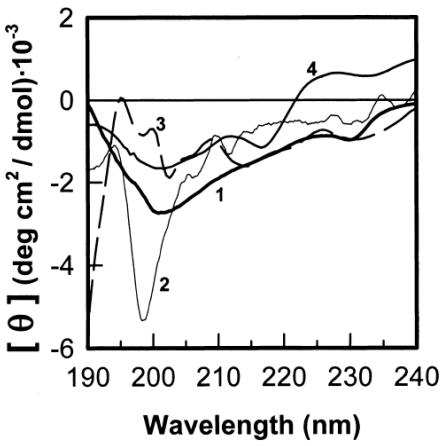


Figure 5 : Spectre de dichroïsme circulaire de l'α-chymotrypsine dans l'eau (1), en présence de 3 M de sorbitol (2), de 1-propanol (3) ou d'[EMIm][Tf_2N] (4). La figure est extraite de De Diego T et al., 2004.

Les LIs absorbant dans l'IR et l'UV-visible, les techniques telles que l'IR ou le DC sont difficiles à appliquer car elles résultent en un signal reliant les capacités d'absorption des protéines aux structures secondaires. Au cours de cette thèse, l'analyse structurale des enzymes en LI a plus particulièrement été étudiée selon la méthode de spectroscopie de fluorescence où le signal n'est pas seulement lié aux propritétés d'absorption des protéines.

I. 3. 3. D. Spectroscopie de fluorescence en LI

I. 3. 3. D. 1. Principe

Les mesures de spectres d'absorption sont réalisées en préambule de mesures de fluorescence. Le phénomène d'absorption correspond à l'interaction entre une onde électromagnétique et un chromophore. Les molécules ayant la capacité d'absorber des rayonnements électromagnétiques passent d'un état énergétique S_0 (état initial) à un état énergétique S_1 (état final ou excité) ce qui correspond à un gain d'énergie au niveau moléculaire. En d'autres termes le phénomène d'absorption correspond à un transfert d'énergie de la radiation électromagnétique à la molécule irradiée. La mesure de spectres d'absorption nous donne des informations quant à la présence de chromophore au sein d'une solution.

La fluorescence correspond à un phénomène de luminescence particulier. Par définition, la luminescence consiste en l'émission de photons à partir de niveaux d'énergie excités. Les molécules ayant la capacité de fluorescer (fluorophores) émettent une onde électromagnétique après avoir absorbé une radiation électromagnétique de longueur d'onde inférieure. La

transition de l'état excité à l'état fondamental est rapide; le temps de décroissance de la fluorescence est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} s ce qui la distingue de la phosphorescence où le temps de déclin est de l'ordre de 1 à 10^{-3} s.

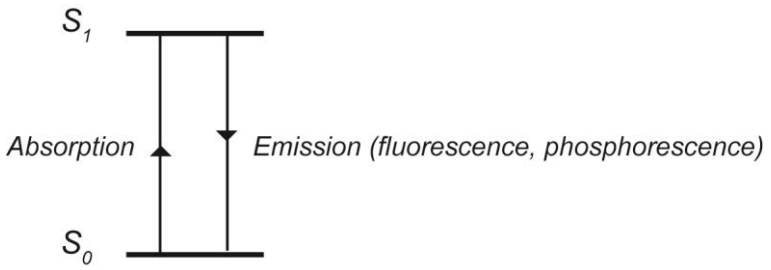


Schéma 32 : Schéma représentant les transitions entre deux niveaux électroniques lors d'une absorption ou d'une émission. Le niveau fondamental est représenté par S_0 (état singulet) et le premier niveau excité est représenté par S_1.

Les fluorophores naturels des protéines sont les résidus de phénylalanine, de tyrosine et plus particulièrement de tryptophane.

La spectroscopie de fluorescence peut être utilisée de différentes manières : fluorescence intrinsèque, atténuation de fluorescence… Selon le mode d'utilisation, la fluorescence des protéines permet d'accéder à des informations d'ordre conformationnel plus ou moins précises mais également à des informations de type interactionnel (Eftink MR et Ghiron CA, 1981; Matyus L *et al.*, 2006).

I. 3. 3. D. 2. Fluorescence intrinsèque des protéines

Lorsqu'une protéine est irradiée par une onde électromagnétique de longueur d'onde (λ) de 280 nm, longueur d'onde maximale d'absorption des tryptophanes, un pic de fluorescence est observé avec une intensité de fluorescence maximale aux alentours de 340 nm. La fluorescence intrinsèque des protéines peut servir à étudier l'environnement de ces résidus. En effet, selon l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité du milieu, la longueur d'onde maximale d'émission sera décalée vers de plus grandes longueurs d'onde ("blue shift") ou vers de plus petite longueurs d'ondes ("red shift") respectivement.

La conformation globale d'une protéine peut être étudiée par l'intermédiaire de son spectre de fluorescence intrinsèque. Lorsque cette même protéine est moins structurée (voir dénaturée) son intensité de fluorescence se trouve diminuée (Cowgill RW, 1970). La diminution de l'intensité de fluorescence, d'une protéine du fait de sa dénaturation, est un phénomène connu et établi depuis un certain nombre d'années; cependant les phénomènes sous-jacents responsables de cette diminution de l'intensité de fluorescence sont toujours en cours d'étude. Une théorie explique ce phénomène par le fait qu'une fois dénaturés, les tryptophanes interagissent avec d'autres résidus de la protéine réduisant ainsi leur capacité à fluorescer (Reshetnyak YK, 2001). La fluorescence intrinsèque est donc une méthode facile à mettre en œuvre permettant d'obtenir une information quand à la conformation globale d'une protéine et cela de manière assez grossière.

I. 3. 3. D. 3. Atténuation de fluorescence

Littéralement, l'atténuation de fluorescence correspond à la diminution de l'intensité de fluorescence suite à l'ajout d'une molécule interagissant avec les fluorophores. Nous distinguerons par la suite l'atténuation de fluorescence interactionnelle de l'atténuation de fluorescence par des agents atténuateurs "classiques" permettant d'accéder à des informations d'ordre structurales.

I.3.3.D.3.a Atténuation de fluorescence due à la fixation de ligands

La fixation des substrats à proximité des fluorophores (tryptophanes) va induire une variation de l'intensité de fluorescence de la protéine (Labrou NE et Rigden DJ, 2001; Tishkov VI *et al.*, 1996). Ainsi la fixation de substrats à une enzyme peut être étudiée par le suivi de la diminution de fluorescence en présence de concentrations croissantes de substrats. Le report du pourcentage d'atténuation de fluorescence en fonction de la concentration de ligand conduit à la formation d'une courbe de type hyperbolique. Une constante de dissociation (K_D) peut alors être obtenue à partir de la relation 7 :

$$Q = \frac{Qm \times [Lig]}{K_D + [Lig]} \qquad (7)$$

Où Q est le pourcentage d'atténuation de fluorescence, Qm le pourcentage d'atténuation maximale, K_D la constante de dissociation et [Lig] la concentration de ligand. L'atténuation de la fluorescence par la fixation d'un ligand est une méthode facile à mettre en œuvre et permet d'obtenir des informations de type interactionnelles, telle que la fixation d'un ligand à une enzyme donnée.

I.3.3.D.3.b Atténuation de fluorescence par des agents atténuateurs

I.3.3.D.3.b.1 Définition, principe générale

Les agents atténuateurs agissent très souvent en entrant directement en contact avec la molécule fluorescente (que sont les tryptophanes dans notre cas). D'un point de vue théorique, deux mécanismes d'atténuation sont distingués : l'atténuation statique (schéma 33B) et l'atténuation dynamique (schéma 33C) (Eftink MR et Ghiron CA, 1981; Somogyi B et Lakos Z, 1993; Matyus L *et al.*, 2006).

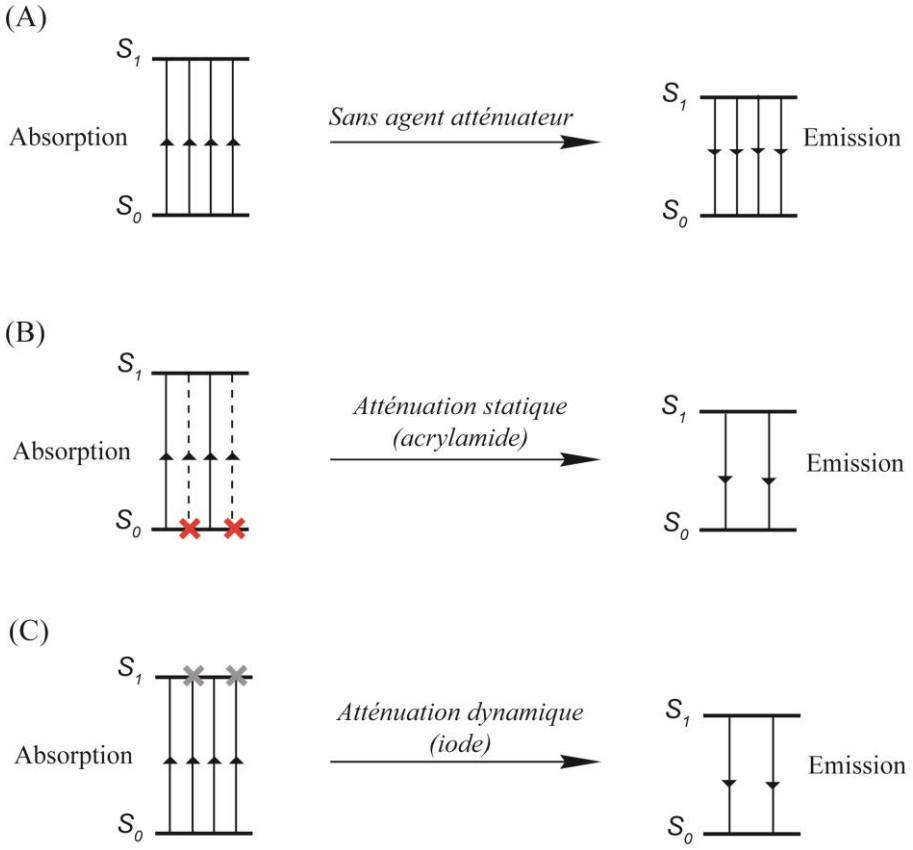


Schéma 33 : Représentations schématique des transitions électroniques lors des phénomènes d'atténuation de fluorescence. La fluorescence en absence d'agent atténuateur est schématisée en (A); les phénomènes d'atténuation statique et dynamique sont représentés en B et C respectivement. S_0 (état singulet) correspond au niveau fondamental du fluorophore et S_1 au premier niveau électronique excité. Les croix rouges représentent l'effet des

agents atténuateurs statiques empêchant les fluorophores d'être excités tandis que les croix grises représentent l'effet des agents atténuateurs dynamiques dissipant l'énergie des fluorophores excités.

L'atténuation statique correspond à la formation d'un complexe dit "noir". Dans ce cas de figure, l'agent atténuateur se fixe au fluorophore et l'empêche d'être excité (schéma 33B) (Lehrer SS, 1971). Les agents atténuateurs statiques sont des molécules neutres, tels que l'acrylamide ou l'oxygène, possèdant la capacité de pénétrer au sein des protéines et d'atténuer la fluorescence des fluorophores enfouis dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Lehrer SS, 1971; Matyus L *et al.*, 2006).

Deux modèles sont utilisés afin d'interpréter les résultats d'atténuation de fluorescence en présence de ce type d'agent atténuateur. Le premier modèle est un modèle à deux étapes contrôlé par la diffusion, la première étape étant l'atténuation des fluorophores localisés en surface et la deuxième étape consistant en l'atténuation des fluorophores enfouis dans la structure. Dans ce premier modèle l'atténuation de fluorescence observée est essentiellement due à l'atténuation des fluorophores localisés à la surface de la protéine comme c'est le cas pour les agents atténuateurs chargés (Eftink MR et Hagaman KA, 1986). La seconde interprétation est le modèle de pénétration où l'agent atténuateur ne serait finalement pas capable d'atténuer la fluorescence des fluorophores enfouis (Somogyi B et Lakos Z, 1993). Dans ce second modèle l'efficacité d'atténuation est associée à la capacité de l'agent atténuateur à pénétrer au sein des espacements ("holes") apparaissant au sein de la structure tridimensionnelle d'une protéine lorsque celle-ci est dénaturée.

Les agents atténuateurs dynamiques sont des molécules chargées tels que le cesium ou l'iode. Ce type de molécules atténue la fluorescence des fluorophores exposés au solvant (Lehrer S, 1971). L'atténuation de fluorescence est dite collisionnelle; l'énergie du fluorophore à l'état excité, suite à l'absorption de la radiation électromagnétique, est dissipée en raison de l'interaction de l'agent atténuateur avec le fluorophore (Lehrer S, 1971; Matyus L *et al.*, 2006).

Les agents atténuateurs statiques ou dynamiques conduisent à la même conclusion : l'atténuation de fluorescence est d'autant plus importante que la protéine est dénaturée (schéma 34) (Lehrer S, 1971; Matyus L *et al.*, 2006; Ruiz JL *et al.*, 2003).

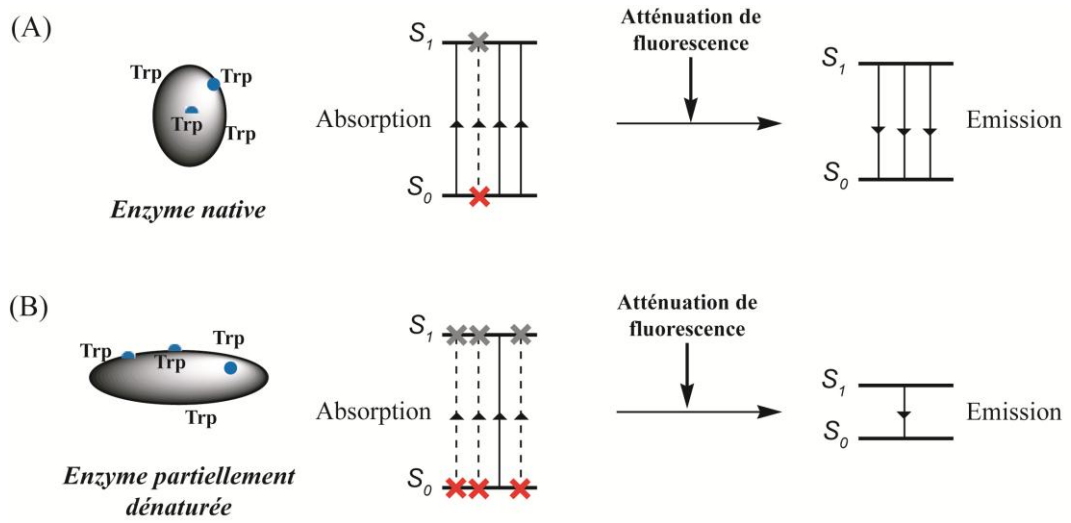


Schéma 34 : Représentation schématique des transitions électroniques lors du phénomène d'atténuation de fluorescence dynamique (croix grises) ou statique (croix rouges) avant (A) et après (B) dénaturation de l'enzyme.

I.3.3.D.3.b.2 Interprétation des résultats : modèles mathématiques

Les expériences d'atténuation de fluorescence sont interprétées différemment selon le degré d'exposition des fluorophores au sein de la protéine étudiée. Selon le modèle le plus simple, l'agent atténuateur affecte la fluorescence de tous les fluorophores de la protéine. Les résultats d'atténuation peuvent alors être analysés selon la relation 8 de Stern-Volmer ci-dessous (Lehrer S, 71) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \qquad (8)$$

Où F_0 est l'intensité de fluorescence en absence d'atténuateur, F est la fluorescence en présence d'une certaine concentration d'atténuateur, K_{SV} est la constante de Stern-Volmer et $[Q]$ la concentration d'atténuateur.

Lorsqu'une partie des fluorophores est enfouie au sein de la structure tridimentionnelle ou quaternaire de la protéine, l'agent atténuateur ne va affecter qu'une fraction de fluorophore et les expériences d'atténuations peuvent être interprétées selon l'équation 9 de Lehrer ci-dessous (Lehrer S, 1971; Matyus L *et al.*, 2006) :

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha \times K_{SV} \times [Q]} \qquad (9)$$

ou α est une valeure, supérieure à 0 et inférieure ou égale à 1, représentant la fraction de fluorophore affectée par l'agent atténuateur.

I.3.3.D.3.b.3 Exemples d'analyses structurales par spectroscopie de fluorescence

L'application de la spectroscopie de fluorescence à l'évaluation de l'état conformationnel d'une protéine en présence de LIs est controversée. Certains auteurs utilisent cette technique sans en souligner les limites (Dabirmanesh B *et al.*, 2011; De Diego T *et al.*, 2004) alors que d'autres auteurs considèrent que la spectroscopie de fluorescence n'est pas applicable en LI (Bose S *et al.*, 2010; Wehofsky N *et al.*, 2008). Cependant différents auteurs utilisent la spectroscopie de fluorescence dans le but de caractériser l'état structural de protéines en LI. Par exemple, l'inactivation de la cellulase en présence de [BMIm][Cl], un LI miscible à l'eau, est interprêtée comme la dénaturation structurale de l'enzyme en raison de la forte diminution de l'intensité de fluorescence intrinsèque en présence de plus de 20 % (v/v) de LI (Turner MB *et al.*, 2003). Le même raisonnement est appliqué à l'α-amylase dans le [BMIm][Cl] ou l'[HMIm][Cl] (Dabirmanesh B *et al.*, 2011). Inversement, les mesures de fluorescence intrinsèque d'enzymes conduites en présence de LIs non miscibles à l'eau ont été utilisées afin de démontrer la stabilité structurale de l'α-amylase en présence de 85 % (v/v) d'[EMIm][Tf_2N] (De Diego T *et al.*, 2004) et la stabilisation thermique de la lipase B de *Candida antarctica* en présence de 98 % (v/v) d') [EMIm][Tf_2N] ou de [btma][Tf_2N] (De Diego T *et al.*, 2005).

La spectroscopie de fluorescence n'a pas permis d'évaluer l'influence du [MMIm][Me_2PO_4] sur la structure de la chymotrypsine, la trypsine et la protéase V8 en raison d'interférences de ce LI à 50 % (v/v) ou plus (Wehofsky N *et al.*, 2008). Les ions composant les LIs sont supposés interagir avec les résidus de tryptophanes (Trp) causant ainsi la perte du signal de fluorescence (Zhao H *et al.*, 2009). Il a également été observé que le 1-methylimidazole atténue la fluorescence de molécules de tryptophane en solution ce qui à conduit les auteurs à conclure que la fluorescence des enzymes dans les LIs à base d'imidazolium n'est pas nécessairement la signature d'une dénaturation (Bose S *et al.*, 2010).

I. 3. 3. E. Autres techniques d'analyse structurale en LI

Les différentes techniques d'étude de la structure de protéines en LI, autres que les méthodes spectroscopiques classiques décrites ci-dessus, font appel à des méthodes telles que la diffraction des neutrons aux petits angles ("SANS : Small Angle Neutron Scattering"), la fluorescence résolue dans le temps ou la dynamique moléculaire. Ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre en routine dans la plupart des laboratoires.

I. 3. 3. E. 1. Diffusion des neutrons aux petits angles

La diffusion des neutrons aux petits angles correspond à la diffusion d'un faisceau de neutrons à travers un échantillon homogène de macromolécules. La diffusion du faisceau de neutrons ($\lambda \sim$ 5 nm) est due à l'interaction de ce dernier avec les noyaux des atomes (intéraction nucléaire) ou avec les électrons non appariés (interaction magnétique) (Zaccai G et Jacrot B, 1983). La mesure de l'intensité du faisceau de neutrons diffusé en fonction de l'angle de diffusion permet d'obtenir des informations de type conformationnel. La diffusion aux petits angles (~ 0,5-10°) permet d'obtenir des informations sur la taille et la forme avec une résolution de 2-3 nm (Svergun DI et Koch MHJ, 2002; Petoukhov MV et Svergun DI, 2007). L'inconvénient majeure de cette technique est la difficulté de mise en œuvre car elle nécessite une source de neutrons (de forte énergie), souvent issue de générateur de rayons X tel que le synchrotron (Zaccai G et Jacrot B, 1983). Cette méthode a été utilisée afin de montrer le dépliement du cytochrome c et de l'albumine de sérum humain ("HSA : Human Serum Albumin") dans le [BMIm][Cl] (Baker GA et Heller WT, 2009). Les données de SANS sont en accord avec le dépliement de l'amylase et de la cellulase observé par fluorescence en présence du même LI mais sont impossibles à utiliser en routine (Turner MB *et al.*, 2003; Dabirmanesh B *et al.*, 2011).

I. 3. 3. E. 2. Spectroscopie de fluorescence en temps résolu

La spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps permet de mesurer le temps de vie d'un fluorophore à l'état excité. Cette donnée est directement liée à l'environnement de ce fluorophore et par extension au fait que le milieu soit structuré ou non (Page TA *et al.*, 2009). Un fluorophore est lié de manière covalente à une protéine (ou enzyme), sa fluorescence variera en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve. L'analyse de la fluorescence du fluorophore par spectroscopie de fluorescence en temps résolu permet d'obtenir des informations sur la structure de la protéine sur lequel il est greffé. Par exemple, la structure de la

HSA a été étudiée par spectroscopie de fluorescence en temps résolu après greffage d'une sonde de type acrylodan (Page TA *et al.*, 2009). L'orientation de la sonde est déterminée puis directement reliée à l'état de structuration de la HSA. Les résultats montrent que l'albumine de sérum humain est dénaturée en présence de 98% (v/v) de [BMIm][Tf_2N], [BMIm][PF_6] ou [BMIm][BF_4]; lorsque le pourcentage d'eau augmente dans le milieu pour atteindre 30% (v/v), la HSA est renaturée. Les LIs non miscibles à l'eau agissent donc tels des agents hautement dénaturants à forte concentration et cet effet est réversible (Page TA *et al.*, 2009). La spectroscopie de fluorescence en temps résolu est donc une méthode valide pour l'évaluation de la structure protéique en LI. Cependant, cette technique est difficile à utiliser en routine car elle nécessite l'utilisation de lasers impulsionnels et le greffage de sondes fluorescentes sur des sites précis sur la protéine à étudier.

I. 3. 3. E. 3. Dynamique moléculaire

La méthode de simulations en dynamique moléculaire a été utilisée afin d'étudier la structure de la cutinase à sérine de *Fusarium solani pisi* en présence d'un LI miscible à l'eau, le [BMIm][NO_3] et d'un LI non miscible à l'eau le [BMIm][PF_6] (Micaelo NM et Soares CM, 2008). Les résultats montrent que le LI miscible à l'eau tend à retirer l'eau de la surface de l'enzyme et la dénature, tandis que le LI non miscible à l'eau a un effet moins important sur l'activité et la couche d'hydratation essentielle du biocatalyseur. La dynamique moléculaire permet donc d'obtenir des informations précieuses sur le mécanisme d'action des LIs et sur la conformation protéique. Cependant, cette méthode est difficile à mettre en œuvre en routine; de plus, elle nécessite une expertise particulière et reste un modèle théorique discutable par définition (Micaelo NM et Soares CM, 2008).

I. 3. 3. E. 4. Expériences de saut de solvant

L'effet des LIs miscibles à l'eau sur la structure protéique a également été étudié par des expériences de saut de solvant (Wehofsky N *et al.*, 2008). Ces expériences consistent à suivre un paramètre (absorbance, fluorescence …) avant et après une variation brutale de solvant d'où le nom de saut de solvant. Ainsi l'effet du [MMIm][Me_2PO_4] sur un peptide chromogénique à été étudié. L'absorption de ce peptide varie en fonction de sa conformation *cis/trans,* la conformation *trans* étant interprétée comme un modèle d'une forme dénaturée de protéine (Wehofsky N *et al.*, 2008). Les résultats montrent que le [MMIm][Me_2PO_4] stabilise la forme

trans, ce qui correspondrait au niveau protéique à un phénomène de dénaturation (Wehofsky N *et al.*, 2008). Par conséquent, les expériences de saut de solvant permettent d'obtenir indirectement des informations sur l'effet d'un LI sur une structure protéique mais ne donne pas directement d'information sur la structure d'une protéine en LI.

L'ensemble de ces travaux concernant la structure des enzymes en LIs est en accord et démontre que les LIs miscibles à l'eau composés d'un anion chaotrope induisent le dépliement des enzymes tandis que les liquides ioniques non miscibles à l'eau ont un effet moins important sur les structures secondaires et tertiaires (Zhao H, 2006d; Zhao H *et al.*, 2009; Fujita K *et al.*, 2006). De plus, les biocatalyseurs habituellement utilisés en milieu organique comme la lipase B de *Candida antarctica* sont moins sensibles aux effets déstructurants des LIs (Zhao H *et al.*, 2009; De Diego T *et al.*, 2005).

I. 3. 4. Préparation du biocatalyseur pour des réactions en LIs

Différentes approches ont été utilisées, s'inspirant plus ou moins des approches mises en oeuvre pour améliorer l'activité des enzymes en milieu organique, afin de réduire les effets des LIs sur la perte d'activité des biocatalyseurs.

I. 3. 4. A. Ingénierie des LIs : liquides ioniques fonctionnalisés par des hydroxyles

Les LIs stabilisants sont composés d'un anion kosmotrope et d'un cation légèrement chaotrope. La plupart des cations utilisés dans les LIs sont naturellement kosmotropes et leur kosmotropicité augmente parallèlement à la taille de(s) chaîne(s) alkyle(s) qui leur sont associée(s) (schéma 30) (Zhao H, 2006d). Afin de diminuer la kosmotropicité et l'hydrophobicité du cation, différents auteurs ont fonctionnalisé les cations par l'intermédiaire de chaînes de type hydroxyalkyles (Walker AJ et Bruce NC, 2004; de Gonzalo G *et al.*, 2007b). Les groupements hydroxyle sont introduits afin d'augmenter la capacité du cation à former des liaisons hydrogènes avec l'enzyme et les substrats. L'augmentation de la capacité à donner des liaisons hydrogènes d'un milieu permet d'en augmenter sa polarité (van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007) ce qui induirait la réduction des effets chaotropes supposés néfastes pour la structure des protéines (van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007).

L'hydroxylation de la chaîne alkyle des cations de type imidazolium (schéma 35) réduit l'effet délétère que ces LIs ont sur l'activité enzymatique. L'utilisation de l'[HOPrMIm] au lieu du [BMIm] associé à l'anion [PF_6] augmente de 10 fois l'oxydation de la codéine en codéinone catalysée par la morphine déshydrogénase en association avec la glucose déshydrogénase pour recycler le cofacteur $NADP^+$ (Walker AJ et Bruce NC, 2004). L'hydroxylation de cations de type ammonium (schéma 35B) permet également d'améliorer l'activité enzymatique. Par exemple, en présence de 90% (v/v) de [MTEOA][$MeSO_4$], l'alcool déshydrogéanse de *Rhodococcus ruber* catalyse la réduction du 2-octanone; le taux de conversion est de 63% après 24 heures tandis que dans les mêmes conditions l'enzyme est inactive en présence de LIs miscibles à l'eau à base de cations de type imidazolium tel que l'[EMIm][$MeSO_4$] (de Gonzalo G *et al.*, 2007).

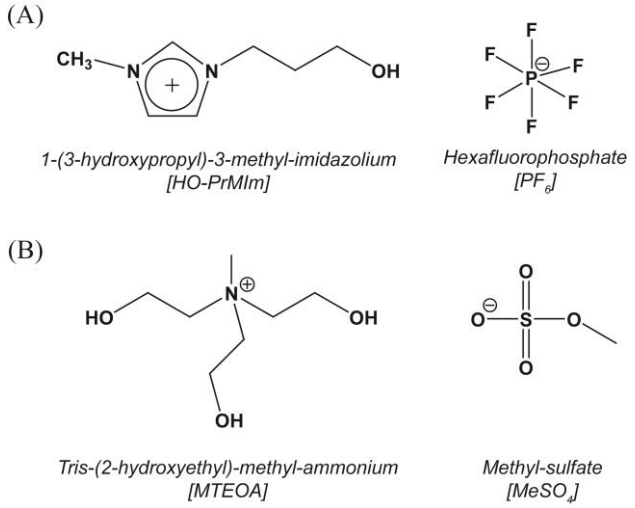


Schéma 35 : Exemples de LIs dont les cations sont hydroxylés. Le [HO-PrMIm][PF_6] et le [MTEOA][$MeSO_4$] sont représentés en (A) et en (B) respectivement.

I. 3. 4. B. Utilisation de tensio-actifs : ajout de tensio-actifs ou microémulsions en LI

L'utilisation de tensio-actifs afin de protéger la structure des enzymes en LIs s'inspire des travaux réalisés dans le domaine de la biocatalyse en milieu organique (cf section I. 2. 5. A. 4.).

Les microémulsions forment des microdomaines aqueux préservant l'enzyme des interactions non favorables avec le milieu environnant (Biswas R et Pal SK, 2004). La formation de microémulsion classique n'est pas adaptée aux LIs dans la mesure où la plupart des tensio-actifs conventionnels sont insolubles dans ces milieux, tel que le tensio-actif anionique AOT (sodium bis(2-éthyle-1-héxyle) sulfosuccinate) (Moniruzzaman M *et al.*, 2010). Les travaux ont donc consisté à utiliser des tensio-actifs non ioniques tels que le Tween 20 et le Triton X-100 (schéma 36B et C), ou le tensio-actif anionique AOT (schéma 36A) en présence de 1-hexanol comme co-tensio-actif (ou co-solvant). Les lipases de différents organismes sont actives dans des microémulsions d'eau dans du LI formées à partir de tensio-actifs non ioniques (Triton X-100 ou Tween 20) dans du [BMIm][PF_6]. Ces microémulsions d'eau en LI améliorent l'activité et la stabilité des lipases par rapport aux microémulsions d'eau en solvant organique classique tel que l'hexane (Pavlidis IV *et al.*, 2009).

Par exemple, l'activité de la lipase de *Thermomyces lanuginosa,* dans des microémulsions de Tween-20 dans le [BMIm][PF_6] en présence de 5% d'eau est augmentée d'un facteur 14 par rapport à son activité dans le même LI en présence de moins de 1% d'eau et d'un facteur de 4 en comparaison aux microémulsions de Tween-20/hexane (Pavlidis IV *et al.*, 2009). Les microémulsions de Tween-20/[BMIm][PF_6] améliorent le temps de demi-vie de l'enzyme à 50°C d'un facteur 6 en comparaison à sa stabilité dans le tampon et d'un facteur 4 en comparaison à sa stabilité en LI en absence de tensio-actif (Pavlidis IV *et al.*, 2009). L'utilisation de microémulsions a également été appliquée à la préservation d'activité de type oxydase en LI. Ainsi, la laccase de *Trametes versicolor* et la lignine peroxydase de *Phanerochaete chrysoporium* sont actives dans des microémulsions de Triton X-100 dans le [BMIm][PF_6] en présence de 8% (v/v) d'eau alors qu'en absence de tensio-actifs, ces deux oxydases fongiques sont inactives (Zhou GP *et al.*, 2008). Le tensio-actif anionique AOT a également été utilisé en LI, ce dernier n'est soluble en LI qu'en présence de 1-hexanol. Les microémulsions AOT/1-hexanol dans l'[OMIm][Tf_2N] améliorent l'activité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* ou de la HRP d'un facteur 5 par rapport aux mêmes microémulsions dans l'isooctane (Moniruzzaman M *et al.*, 2008 et 2009).

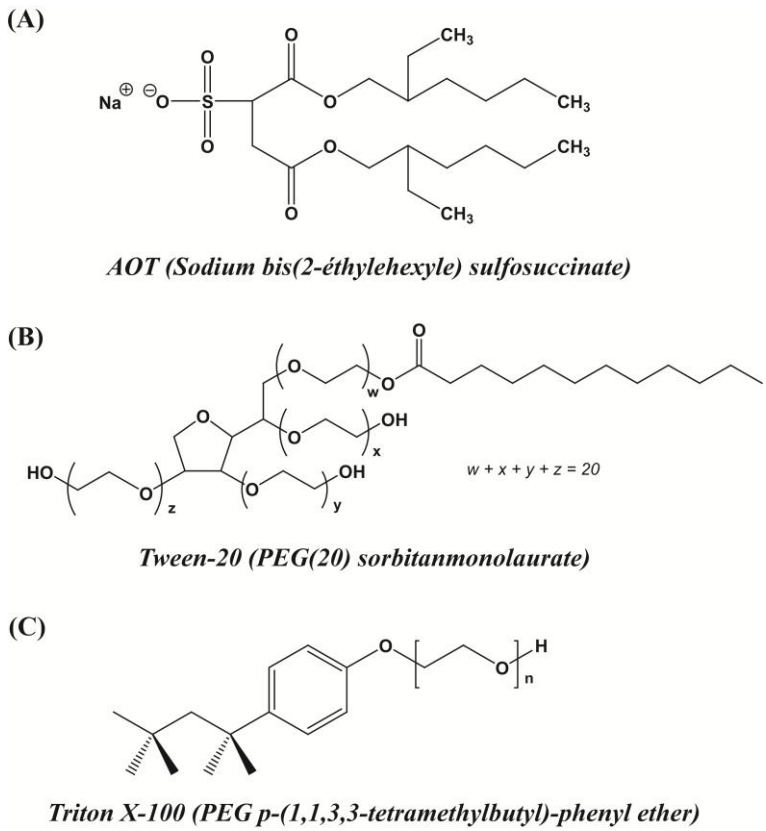


Schéma 36 : Tensio-actifs utilisés le plus couramment en présence de LIs. L'AOT, le Tween-20 ainsi que le PEG sont représentés en (A), (B) et (C) respectivement.

La formation de microémulsions en LIs, afin d'améliorer la structure/activité et la demi-vie d'enzymes, est donc une méthode simple à utiliser et qui s'applique à différentes classes d'enzymes (Moniruzzaman M *et al.*, 2008 et 2009; Zhou GP *et al.*, 2008; Pavlidis IV *et al.*, 2009). Cependant, il est important de noter que ces travaux démontrent le lien direct entre le rapport molaire eau/tensio-actif et l'amélioration de l'activité; celle-ci étant plus importante lorsque la quantité d'eau est plus importante (les rapports allant de 5 à 18) (Pavlidis IV *et al.*, 2009; Zhou GP *et al.*, 2008). De plus l'activité observée est directement liée à la diminution de viscosité du milieu qui est une des conséquences directes de l'ajout d'eau dans le LI (Zhou GP *et al.*, 2008). Par conséquent, il est possible que ces différents effets positifs, aussi bien sur l'activité que la stabilité du biocatalyseur, soient dues à la diminution des constantes diffusionnelles dans le milieu (Zhou GP *et al.*, 2008). Il est également probable qu'en présence de LI, les tensio-actifs forment des microémulsions inversées piégeant ainsi le LI et modifiant alors la microstructuration du milieu (Sieffert N et Wipff G, 2006).

Enfin, de par la nature amphiphile des tensio-actifs, la technique qui consiste à utiliser des microémulsions n'est efficace et réalisable qu'en présence de LIs hydrophobes; en aucun cas, cette méthode ne résoud les problèmes de dénaturation des enzymes en présence de LIs miscibles à l'eau.

I. 3. 4. C. Fonctionnalisation des enzymes : par association covalente ou non covalente ("coating")

Inspirée de méthodes utilisées en biocatalyse en milieu organique, la fonctionnalisation de biocatalyseur par des polymères a pour objectif d'améliorer la solubilité des enzymes en LI et de réduire l'effet inactivant et déstructurant des LIs (Hudson EP *et al.*, 2005). A l'image des études réalisées en milieu organique non polaires, les modifications (covalentes ou non) des enzymes concernent essentiellement des réactions catalysées en LI non miscibles à l'eau.

Le polymère le plus couramment utilisé est le PEG. Le PEG est déjà connu pour ses effets lyoprotectant et son efficacité pour améliorer l'activité d'enzymes en milieu organique non polaire (Vazquez-Duhalt R *et al.*, 1992). L'association du PEG à la lipase PS de *Pseudomonas cepacia* avant lyophilisation améliore son activité de type alcoolyse de 14 fois dans le LI non miscible à l'eau [OMIm][PF_6] (Maruyama T *et al.*, 2002). La subtilisine Carlsberg à été modifiée covalemment par un polymère de PEG ramifié (en forme de peigne) sur les résidus de lysine par l'intermédiaire de liaisons amides (schéma 37). L'enzyme ainsi modifiée catalyse la transesterification du *N*-acetyl-L-phenylalanine ethylester avec le 1-butanol dans l'[EMIm][Tf_2N]; le taux de conversion est de 60% au bout de 60 heures tandis que dans les mêmes conditions l'enzyme non modifiée est inactive (Nakashima K *et al.*, 2006a). Cette modification a également été appliquée à la lipase de *Candida rugosa* dans le même LI ce qui a conduit à des résultats similaires, à savoir, qu'une enzyme modifiée est active alors que l'enzyme non modifiée ne l'est pas (Nakashima K *et al.*, 2006b).

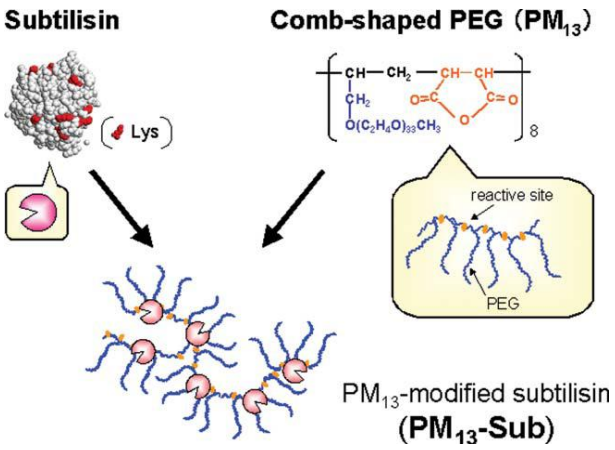


Schéma 37 : Représentation schématique de la modification de la subtilisine par les polymères de PEG ramifiés ("Comb-shaped PEG (PM13)"; PM_{13}-Sub). L'image est extraite de la publication de Nakashima K et al., 2006a.

La modification de l'enzyme par des polymères de PEG est donc une approche qui améliore son activité en présence de LIs non miscibles à l'eau et en présence de faible quantité d'eau. Cependant, à l'instar des microémulsions, les modifications par des polymères de PEG n'ont pas encore été utilisées en présence de LIs miscibles à l'eau et par conséquent cette méthode ne répond peut être pas aux difficultés liées à la dénaturation protéique en LI.

I. 3. 4. D. Immobilisation

Les LIs étant proposés à l'origine comme solvants de substitution aux solvants organiques, la majorité des travaux a donc été conduite en présence de lipases (Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Différentes études utilisent des lipases commerciales déjà immobilisées sur des supports solides afin de catalyser des réactions de transesterification en présence de LIs non miscibles à l'eau (Schmid A *et al.*, 2001; Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Les activités sont similaires à celles que l'on peut observer en milieu organique non polaire. L'enzyme la plus courante étant le biocatalyseur Novozym 435 qui n'est autre que la lipase de *Candida antarctica* immobilisée sur une résine polyacrylique (Kaar JL *et al.*, 2003; Van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007).

Différents supports solides ont également été utilisés afin d'immobiliser les biocatalyseurs dans le but d'améliorer leurs performances en présence de LIs non miscibles à l'eau. Parmi les supports existants nous trouvons la célite (Eckstein M *et al.*, 2002; Persson M et Bornscheuer UT, 2003), la mousse de polyuréthane (Kaar JL *et al.*, 2003) ou encore les nanotubes de

carbones (Shah S *et al.*, 2007). Ces différents supports améliorent la stabilité structurale des biocatalyseurs et augmentent l'énergie libre de dépliement. Là encore, l'essentiel des travaux d'immobilisation concernent des réactions de trans-estérifications en présence de LIs non miscibles à l'eau tel que le [BMIm][PF_6].

Inversement, les LIs peuvent également être utilisés comme support pour l'immobilisation. La HRP a ainsi été encapsulée dans des microparticules de LIs polymérisés à base de bromure de 1-vinyl-3-éthylimidazolium associé à l'agent réticulant N,N'-méthylènebis(acrylamide), préparées dans des microémulsions d'eau en solvant organique (schéma 38) (Retama JR *et al.*, 2003; Nakashima K *et al.*, 2009). La HRP incluse dans les microparticules de LIs est 2 fois plus active en solution aqueuse que lorsqu'elle est incluse dans des microparticules de polyacrylamide (Nakashima K *et al.*, 2009). Le LI est ici utilisé afin de réduire l'effet inhibiteur de la méthode d'immobilisation. Le LI agit probablement comme un espaceur augmentant le nombre et la taille des espaces libres dans le polymère. De plus l'EMIm est un cation de petite taille; sa chaotropicie influence probablement la stabilisation de l'enzyme lors de l'immobilisation de cette dernière.

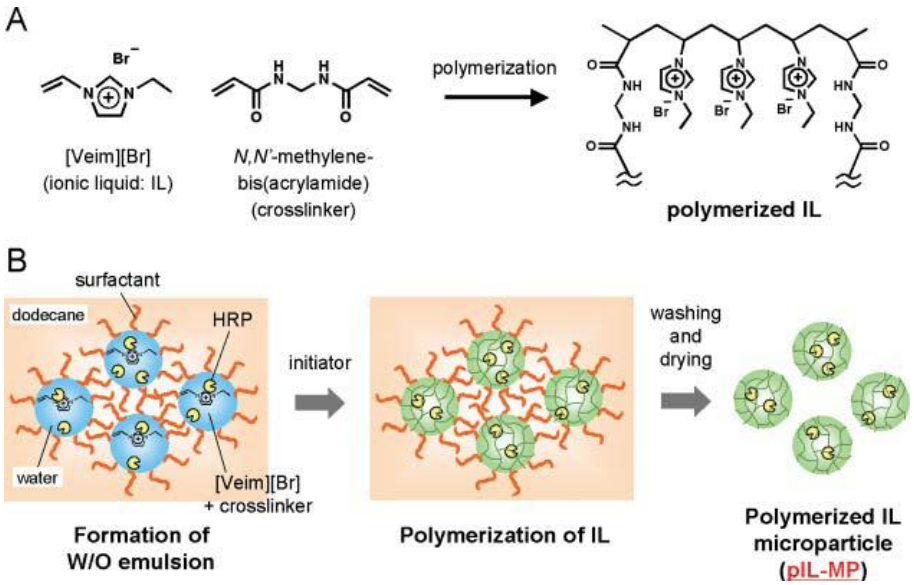


Schéma 38 : Représentation schématique de la reaction de polymérisation du LI en présence de N,N'-méthylènebis*(acrylamide) comme agent réticulant (A) et de la préparation de HRP immobilisée dans des microparticules de LIs polymérisés dans des microémulsions eau/solvant organique (B). Le solvant organique est le dodecane et le tensio-actif est le Span 80. L'image est extraite de la publication de Nakachima K et al., 2009.*

I. 4. But de la thèse

Cette thèse aura pour objectif; d'une part, d'analyser le comportement des biocatalyseurs et par extension des protéines en LI afin de pouvoir développer de nouvelles méthodes améliorant leurs performances dans ces milieux, et d'autre part, de modifier un biocatalyseur modèle afin qu'il soit mieux structuré et plus actif en présence de LIs miscibles à l'eau.

Dans un premier temps, les travaux ont consisté à rechercher une méthode rapide et simple à mettre en œuvre afin de réaliser l'analyse structurale de protéines en LI. Plus particulièrement, l'origine de la controverse concernant l'application de la spectroscopie de fluorescence à l'étude structurale en LI a été analysée; les limites de la méthode ainsi que les utilisations possibles seront mises en évidence.

Deux approches ont été développées afin d'améliorer l'activité enzymatique en LIs. La première approche, tout à fait innovante, consistera à modifier de manière covalente l'enzyme par des cations analogues aux cations des LIs. Une seconde approche, inspirée des travaux réalisés en biocatalyse en milieu organique, consistera à muter l'enzyme de manière aléatoire par évolution dirigée.

Outre l'application possible de ces méthodes à l'obtention d'un biocatalyseur actif et par conséquent exploitable dans le domaine de la biocatalyse en LI ou au niveau de domaines faisant intervenir des enzymes en LI tel que l'élaboration de biopiles ou de biocapteurs. Ces recherches ont également une importance fondamentale afin de mieux comprendre les phénomènes responsables de l'inactivation des enzymes en LI.

I. 5. Modèles d'études

I. 5. 1. Choix des Modèles

Le nombre de LIs possibles ou existants étant important nous avons choisi de travailler avec une enzyme modèle et un liquide ionique modèle.

Les LIs ioniques non miscibles à l'eau induisent la formation de phases rendant difficile l'interprétation des résultats du fait de l'augmentation du nombre de paramètres pouvant influencer la réaction biocatalysée. Nous avons donc choisi d'étudier le comportement enzymatique en présence de LIs miscibles à l'eau et plus particulièrement en présence du [MMIm][Me_2PO_4]. Ce LI a été choisi car les cations à base d'imidazoliums sont les plus couramment utilisés. De plus, considérant la série des imidazoliums, le [MMIm] est un cation de petite taille, plus chaotrope et par voie de conséquence plus stabilisant.

Le biocatalyseur modèle est une déshydrogénase. Les déshydrogénases sont une classe d'enzyme jouant un rôle important dans le domaine de la biocatalyse et des biotechnologies. Contrairement aux lipases naturellement plus stables en LI ou en milieu organique, les déshydrogénases fonctionnent naturellement en milieux aqueux et sont plus sensibles aux variations environnementales. A travers l'analyse du comportement des déshydrogénases en LI et l'amélioration de leur activité dans ces milieux, l'objectif à long terme est l'extrapolation des résultats aux différentes autres classes d'enzymes peu actives en présence de LI.

I. 5. 1. A. La formiate déshydrogénase de *Candida boidinii*

I. 5. 1. A. 1. Réaction catalysée

La formiate déshydrogénase (FDH, EC 1.2.1.2) de *Candida boidinii* est une enzyme de la famille des déshydrogénases spécifiques des acides hydroxylés de la série D ("D-specific 2-hydroxy acid dehydrogenases") (Vinals C *et al.*, 1993). La FDH utilise le cofacteur NAD^+ comme accepteur d'électrons. Elle intervient dans la dernière étape de la chaîne d'oxydation du méthanol des micro-organismes méthylotrophiques, capables d'utiliser le méthanol comme source de carbone et d'énergie (schéma 39).

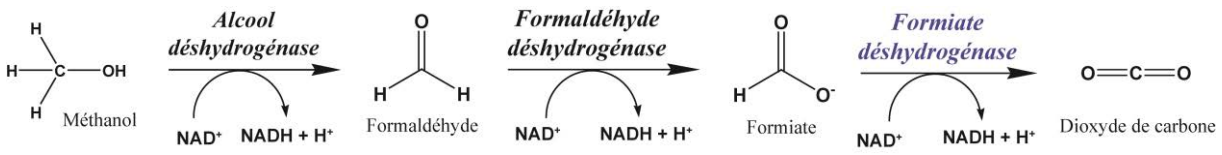


Schéma 39 : Chaîne d'oxydation du méthanol.

La FDH catalyse l'oxydation du formiate en dioxyde de carbone selon un mécanisme Bi Bi séquentiel ordonné et est associée au mécanisme de Théorell-Chance (Peacock D et Boulter D, 1970). Le NAD^+ se fixe en premier lieu au niveau du site actif, le formiate va alors se fixer puis être oxydé en CO_2 par transfert d'un ion hydrure au NAD^+ pour former le NADH qui sera libéré en dernier (schéma 40).

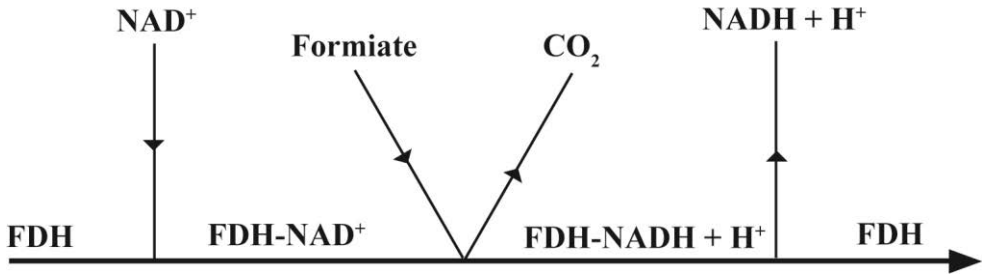


Schéma 40 : Représentation schématique du mécanisme de Theorell-Chance appliqué au cas de la FDH.

I. 5. 1. A. 2. Structure de la FDH

La forme active de la FDH est un homodimère de 74 kDa environ (Schutte H *et al.*, 1976). Chaque monomère est constitué d'un motif de fixation du NAD^+ et d'un motif catalytique (schéma 41). Les deux motifs sont séparés par deux hélices α, ménageant ainsi un espace où les substrats viennent se loger. Le domaine de fixation du NAD^+ est composé de 7 brins β et de 9 hélices α structurés selon un motif de type Rossmann ("Rossmann fold") (Schirwitz K *et al.*, 2007; Lamzin VS *et al.*, 1992). Le repliement de type Rossmann est composé de deux motifs beta-alpha-beta-alpha-beta formant 6 brins β parallèles flanqués par des hélices α; ce motif ancestral est communément retrouvé chez les déshydrogénases utilisant le NAD^+ (Lesk AM, 1995). Le domaine catalytique est composé de 6 brins β et de 6 hélices α, il contient la paire catalytique histidine/aspartate commune à la famille des déshydrogénases spécifiques des acides hydroxylés de la série D (Schirwitz K *et al.*, 2007; Vinals C *et al.*, 1993).

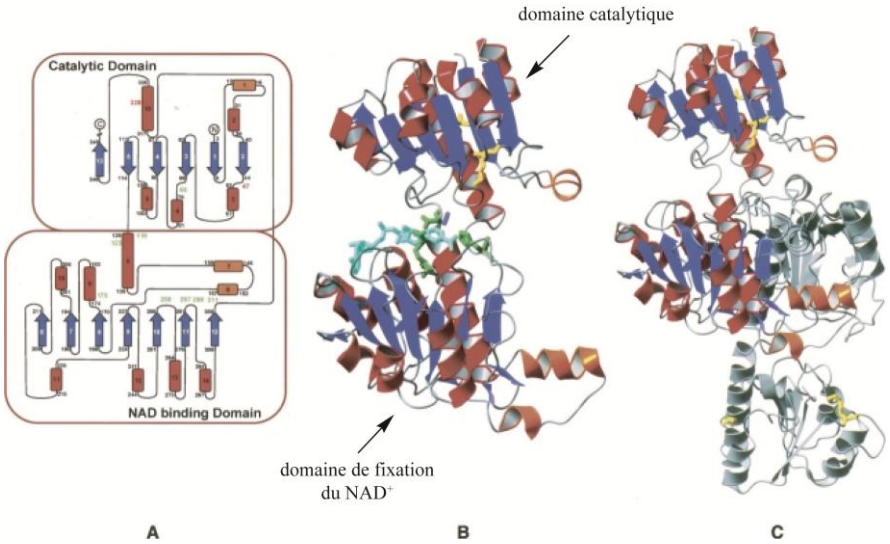


Schéma 41 : Représentation des structures secondaires et tertiaires de la FDH de Candida boidinii. La Figure est extraite de Schirwitz K et al., 2007. L'orientation de la structure tridimensionnelle du monomère (B) est similaire à celle des structures secondaires (A). Le domaine catalytique et le domaine de fixation du NAD$^+$ sont indiqués par des flèches (B). Les domaines de fixations du NAD$^+$ interagissent l'un avec l'autre afin de former le dimère (C).

I. 5. 1. A. 3. Site actif de la FDH et motifs conservés

Chaque monomère contient un site actif situé entre le domaine de fixation du NAD$^+$ et le domaine catalytique. Le NAD$^+$ se fixe à la base du repliement de type Rossmann en interagissant préférentiellement avec les boucles liant les brins β aux hélices α (Lesk AM, 1995; Schirwitz K *et al.*, 2007). Le cofacteur est lié par de nombreuses liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals. Parmi les différents résidus interagissant avec le NAD$^+$, se distinguent l'empreinte triple glycine GXGXXG (G171-G176 pour la FDH de *Candida boidinii*) où G est la glycine et X est n'importe quel autre acide aminé. Cette empreinte est caractéristique de la fixation du NAD$^+$ chez les déshydrogénases (Lesk AM, 1995; Schirwitz K *et al.*, 2007). Le NAD$^+$ se fixe dans un premier temps par l'intermédiaire de l'adénine, du ribose et des groupements phosphates; la fixation de la partie nicotinamide ne se fait que lorsque le formiate est fixé. En absence de formiate, le groupement nicotinamide subit une répulsion électrostatique due à la charge de l'arginine 258. La fixation du formiate compense la charge positive et facilite la fixation du cycle nicotinamide en une conformation réactive (schéma 42) (Schirwitz K *et al.*, 2007).

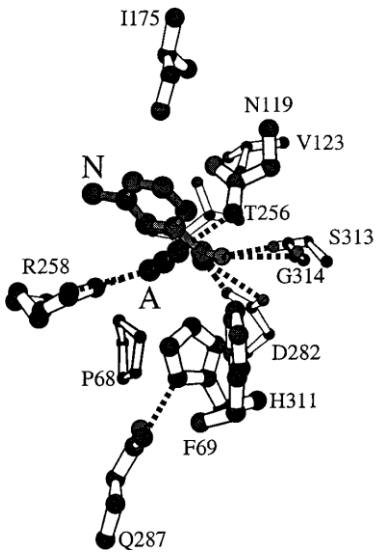


Schéma 42 : Représentation sous forme de cercles et de bâtons ("ball-and-stick") des interactions du noyau nicotinamide noté (N) et de l'azide (inhibiteur compétitif du formiate noté A) avec la FDH de Candida boidinii. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés. L'arginine participant à la fixation du formiate et de l'azide est représentée sur la gauche du schéma (R258). L'image est extraite de Labrou NE et Rigden DJ, 2001.

Le formiate se fixe à proximité du noyau nicotinamide du cofacteur par l'intermédiaire de l'Histidine 311. Cette histidine sert de base, stabilisant ainsi l'état de transition et le transfert d'hydrogène (Schirwitz K *et al.*, 2007). En absence de formiate, l'histidine est maintenue sous forme non protonée par l'interaction avec un résidu de glutamine conservé (Q287). A l'instar de la paire Q313/H332 présente chez la FDH de *pseudomonas sp.* 101, le maintient de la charge positive partielle de l'histidine par la liaison avec le résidu glutamine joue un rôle essentiel dans la fixation et l'orientation du formiate (schéma 43) (Tishkov VI *et al.*, 1996; Labrou NE et Rigden DJ, 2001).

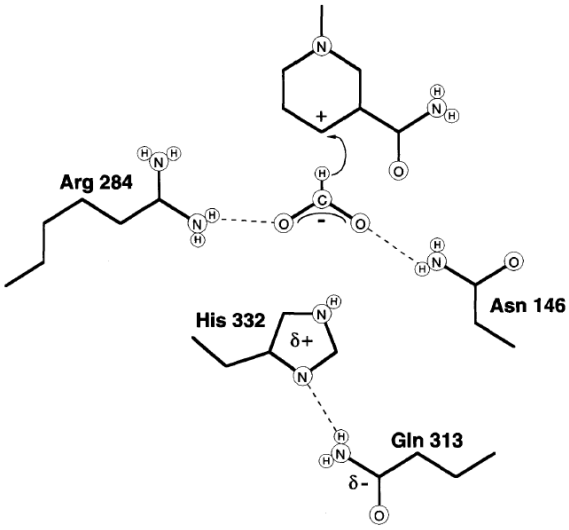


Schéma 43 : Représentation schématique du site actif de la formiate déshydrogénase de Pseudomonas sp. 101. Les chaînes latérales des acides aminés intervenant lors de la fixation du formiate et le groupement nicotinamide sont représentées. L'image est extraite de Tshkov VI et al., 1996.

I. 5. 1. A. 4. Application de la FDH à la biocatalyse

La FDH est un modèle pour l'étude des déshydrogénases en LI dans la mesure où elle est largement utilisée dans le domaine de la biocatalyse (Tishkov VI et Popov VO, 2004 et 2006). La synthèse de composés chiraux catalysée par des déshydrogénases nécessite la régénération du cofacteur. La glucose-(6-P)-déshydrogénase (GPDH), l'alcool déshydrogénase (ADH) ou la FDH sont le plus souvent utilisés en raison du faible coût de leurs substrats (van der Donk WA et Zhao H, 2003; Sealbach K *et al.*, 2006). La FDH est ainsi une enzyme appropriée à la régénération du NAD^+ (Seelbach K *et al.*, 2006). D'une part, la réaction catalysée par la FDH est irréversible ce qui permet de maintenir une pression thermodynamique lors de la synthèse du composé chiral. D'autre part, le produit de la réaction est le dioxyde de carbone facilement séparé du milieu réactionnel et n'interférant pas par des réactions parasites. De plus, la FDH est active sur une large gamme de pH (6 < pH optimal < 10) facilitant ainsi son utilisation en présence de différentes enzymes (Tishkov VI et Popov VO, 2006). La FDH est utilisée lors de la synthèse de composés chiraux jouant un rôle important dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire (Matsuda T *et al.*, 2009). Par exemple, la FDH est utilisée afin de régénérer le cofacteur NAD^+ lors de la synthèse de la (*S*)-*tert*-leucine catalysée par la leucine déshydrogénase à partir du triméthylpyruvate (schéma 44) (Bommarius AS *et al.*, 1995). La (*S*)-*tert*-leucine est un composé qui intervient dans la synthèse de différents médicaments anti-

tumoraux (Zeneca®, BB-2516), anti-viraux (Abbott, Biomega) ou anti-inflammatoires (RO-31-9790) (Hummel W et Kula MR 1989; Bommarius AS *et al.*, 1998).

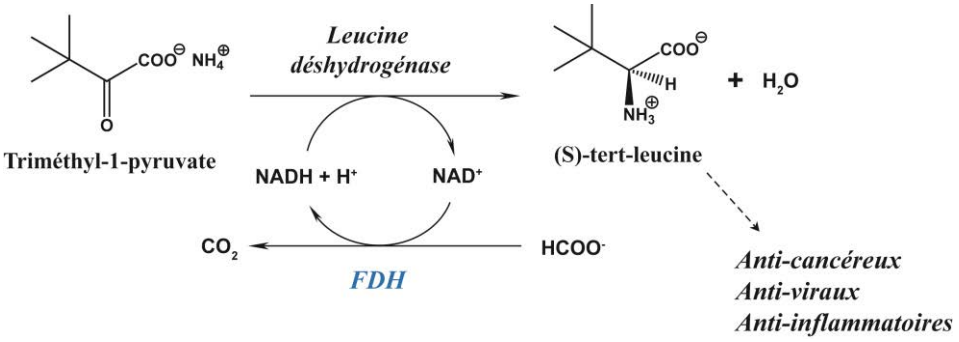


Schéma 44 : Schéma de synthèse de la S-tert-leucine faisant intervenire la FDH afin de régénérer le NADH.

I. 5. 1. A. 5. Application de la FDH à l'élaboration de biopiles

Les LIs ont une large fenêtre électrochimique, c'est-à-dire qu'ils ne seront pas oxydés/réduits sur une relativement large gamme de potentiel et n'interféreront donc pas avec les autres réactions s'y déroulant. Ces milieux étant plus stables d'un point de vue électrochimique que les solvants aqueux classiques, ils ont par conséquent été proposés comme électrolyte (Hapiot P et Lagrost C, 2008; Wei D et Ivaska A, 2008). L'effet stabilisant que les LIs peuvent avoir sur les enzymes associé à leur capacité à prévenir la croissance de micro-organisme, fait des LIs un milieu de choix pour l'élaboration de (bio)piles à base d'enzymes (Hapiot P et Lagrost C, 2008; van Rantwijk F et Sheldon RA, 2007). Les (bio)piles enzymatiques sont composées d'une anode et d'une cathode. Les électrons issus de l'oxydation enzymatique d'un substrat vont être récupérés à l'anode et seront à l'origine de l'énergie fournie par le système. A la cathode, les électrons serviront à la réduction enzymatique d'un second substrat (schéma 45) (Kim J *et al.*, 2006).

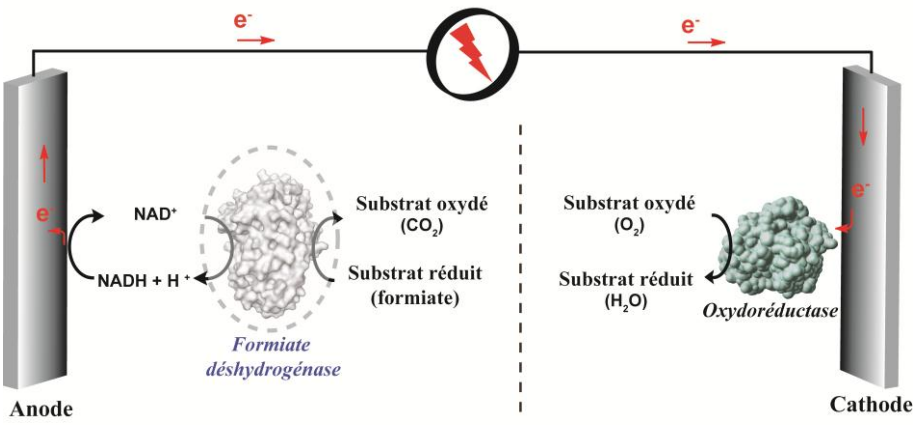


Schéma 45 : Représentation schématique d'une (bio)pile à base de FDH.

Le plus souvent des déshydrogénaes (ADH, FDH…) sont utilisées à l'anode et des oxydases à la cathode (laccase, bilirubine oxydase) (Bullen RA *et al.*, 2006). La FDH peut être utilisée dans un modèle de (bio)pile s'inspirant de la chaîne d'oxydation du méthanol des micro-organismes méthylotrophiques et permettant la récupération de 6 électrons suite à l'oxydation totale du méthanol à travers les réactions consécutives de l'alcool déshydrogénase, de la formaldéhyde déshydrogénase et de la FDH (schéma 46) (Palmore GTR *et al.*, 1998).

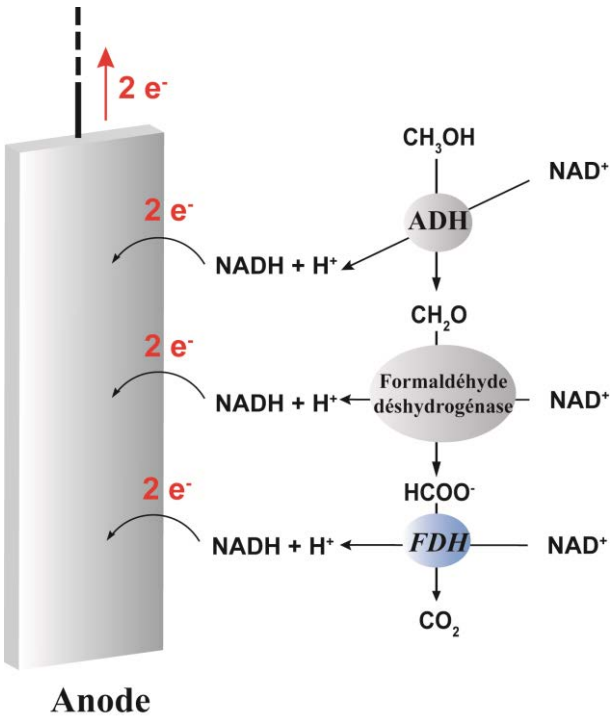


Schéma 46 : Représentation schématique d'une bioanode s'inspirant de la chaîne d'oxydation du méthanol.

II. Matériel et méthodes

II. 1. Matériels et instrumentations

II. 1. 1. Modifications covalentes et analyses structurales

La Formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* (FDH, E.C. 1.2.1.2, 70 $U.mL^{-1}$, lot no. Z70911.01) provient de Jülich Fine Chemicals (Jülich, Allemagne). Toutes les expériences ont été réalisées avec le même lot d'enzyme. La trypsine de pancréas porcin (E.C. 3.4.21.4, 1240 $U.mg^{-1}$, lot no. 032 K72551) ainsi que la chymotrypsine de pancréas bovin (E.C. 3.4.21.1, 40 $U.mg^{-1}$, lot no. 27H7010) proviennent de Sigma-Aldrich (St-Quentin-en-Fallavier, France). Le [MMIm][Me_2PO_4] ou **LI-1** provient de Iolitec GmBH (Denzlingen, Allemagne). Le [BMIm][CH_3COO] ou **LI-2** ainsi que le [MMIm][$CH_3HPO_2(OCH_3)$] ou **LI-3** proviennent de Solvionic (Toulouse, France). Le réactif de Bradford provient de Biorad (Marnes-la-Coquette, France). Le (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium dimethylphosphate et l'hydroxyethyl methylimidazolium chloride proviennent de Solvionic (Toulouse, France). Le 1-Methylimidazole, 1-Methylpyrrolidine, 3-Chloro-1-propanol, 4-Chloro-1-butanol et le 6-Chloro-1-hexanol proviennent de Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). Les microconcentrateurs, possédant des membranes dont le seuil d'exclusion est de 30 kDa, proviennent de Millipore (Ultracell YM-30, Molsheim, France). Les colonnes de dessalage Micro Bio-Spin 6 proviennent de Biorad (Marnes-la-Coquette, France). Les produits n'ayant pas été listés ci-dessus proviennent tous de Sigma-Aldrich (St-Quentin-en-Fallavier, France).

Les mesures d'absorption et de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque Tecan Infinite M200 (Salzburg, Autriche). Les expériences de spectroscopie infrarouge ont été réalisées sur le spectrophotomètre FT-IR iS10 de Thermo Scientific (Courtaboeuf, France).

Les spectres de masse ESI^+ ("ElectroSpray Ionisation") et les spectres RMN des cations synthétisés ont été réalisés respectivement par l'intermédiaire des services commun de spectrométrie de masse et de RMN de l'ICBMS. Les spectres RMN ont été réalisés sur l'appareil DRX 300 Bruker et les spectres ESI^+ sur l'appareil THERMO LCQ Advantage.

Les spectres ESI^+ et MALDI-ToF ("Matrix Assisted Laser Ionisation-Time of Flight") de la FDH ont été réalisés par l'intermédiaire du centre commun de spectrométrie de masse de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP, 69007 Lyon, France). Les spectres EST^+ ont été réalisés sur l'appareil API 165 Applied Biosystems electrospay (ESI) équipé d'un simple quadripole. Les spectres MALDI-ToF ont été réalisés sur l'appareil Voyager DE PRO Applied Biosystems (série 2002) équipé d'un mode d'ionisation et de détection de type MALDI-ToF.

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur la plateforme de production et d'analyse des protéines de l'IBCP sur le spectrophotomètre Chirascan (Applied Photophysics) équipé d'un support de cellule PCS.3 associé à un appareil de type effet Peltier : afin de contrôler la température.

II. 1. 2. Evolution dirigée de la FDH

Les expériences de biologie moléculaire ont été conduites au sein du laboratoire d'Organisation et Dynamique de Membranes Biologique (ODMB) de l'ICBMS. Le gène codant pour la FDH de *Candida boidinii*, (entrée EMBL ("European Molecular Biology Laboratory") : AJ245934 (1095 paires de bases)) a été synthétisé par la société GenScript (Piscataway, New Jersey, Etats-Unis). Les cellules de clonage chimio-compétentes *E. coli* DH10B (E. Cloni EXPRESS DH10B) et d'expression électro-compétentes *E. coli* BL21(DE3) (E. Cloni EXPRESS BL21(DE3)) proviennent de Lucigen (Middleton, Etats-Unis). L'ampicilline et la kanamycine proviennent d'Interchim (Montluçon, France). Les différents séquençages ont été réalisés par l'intermédiaire de l'entreprise Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). L'ADN est quantifié sur l'appareil "NanoDrop 2000" (Fisher Scientific, Illkirch, France). L'ADN plasmidique est purifié à l'aide des kits NucleoBond® Xtra Midi/Maxi/EF et Nucleospin® provenant de Macherey Nagel (Hoerdt, France). Le kit de dessalage de l'ADN QIAquick provient de Qiagen (Courtaboeuf, France). Les enzymes de restrictions BamHI (10 $U.\mu L^{-1}$) et XhoI (20 $U.\mu L^{-1}$) proviennent respectivement d'Euromedex (Souffelweyersheim, France) et d'Ozyme (Montigny-Le-Bretonneux, France). La Taq polymérase provient de Roche Diagnostics (Mannheim, Allemagne) et la T4 DNA ligase provient d'Invitrogen® (Cergy Pontoise, France)

II. 2. Méthodes

II. 2. 1. Modifications covalentes de la FDH

II. 2. 1. A. Synthèse des cations

II. 2. 1. A. 1. Synthèse de l'hydroxypropyl imidazolium chloride (cation 1b) :

Le 1-Methylimidazole (31,3 mmol, 2,6 g, 1 équivalent) est mélangé au 3-Chloropropanol (31,3 mmol, 2,89 g, 1 équivalent). Le milieu réactionnel est placé à 80 °C sous reflux et atmosphère d'argon durant 48 heures. Après lavage au diéthylether, le produit obtenu est un solide (5,34 g, Rendement 95%) utilisé tel quel par la suite. L'hydroxypropyl imidazolium synthétisé est caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse (ESI^+). RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 2.33 (2H, m), 3.84 (2H, t, J = 6.0 Hz), 4.12 (3H, s), 4.52 (2H, t, J = 7.02 Hz), 4.98 (2H, s), 7.67 (1H, s), 7.73 (1H, s). RMN-^{13}C : 32.039, 36.134, 46.838, 58.295, 122.661, 123.977 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+): m/z 141 (100%,).

II. 2. 1. A. 2. Synthèse de l'hydroxybutyl imidazolium chloride (cation 1c) :

Le 1-Methylimidazole (31 mmole, 2.58 g, 1 équivalent) est melangé au 4-Chloro-1-butanol (31 mmole, 3.36 g, 1 équivalent) sous atmosphère d'argon et la solution est placée à 80°C sous reflux durant 48 heures. Le produit obtenu est lavé au diéthylether, il forme un liquide visqueux jaunâtre (4.72g; Rendement 28%). L'hydroxybutyl imidazolium est caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse. RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 2.0 (2H, m), 2.37 (2H, m), 4.06 (2H, t, J = 6.4 Hz), 4.35 (3H, s), 4.68 (2H, t, J = 7.2 Hz), 5.25 (2H, s), 7.88 (1H, s), 7.96 (1H, s). RMN-^{13}C: 26.421, 28.407, 35.774, 36.140, 49.636, 123.268, 123.956 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+) : m/z 155 (100%).

II. 2. 1. A. 3. Synthèse de l'hydroxyhexyl imidazolium chloride (cation 1d) :

Le 1-Methylimidazole (35 mmole, 2.91 g, 1 équivalent) et le 6-Chloro-1-hexanol (35 mmole, 4.78 g, 1 équivalent) sont mélangés à 80°C sous reflux et atmosphère d'argon durant 48 heures. Le produit resultant est un liquide visqueux jaunâtre, il est lavé au diéthylether (6.87 g; Rendement 89%). L'hydroxyhexyl imidazolium est caractérisé par RMN et par spectrométrie

de masse. RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 1.56 (4H, m), 1.75 (2H, q, J = 6.7 Hz), 2.10 (2H, q, J = 7.0 Hz), 3.81 (2H, t, J = 6.4 Hz), 4.12 (3H, s), 4.42 (2H, t, J = 7.1 Hz), 4.98 (2H, s), 7.66 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.71 (1H, d, J= 1.8 Hz). RMN-^{13}C : 24.657, 25.316, 29.362, 31.264, 35.879, 49.648, 61.774, 122.375, 123.681 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+) : m/z 183.2 (100%).

II. 2. 1. A. 4. Synthèse de l'hydroxypropyl pyrrolidinium chloride (cation 2b) :

Le 1-Methylpyrrolidine (25 mmole, 2,13 g, 1 équivalent) et le 3-Chloro-1-propanol (25 mmole, 2,36 g, 1 équivalent) sont mélangés durant 48 heures à 70°C sous reflux et sous atmosphère d'argon. Le produit obtenu, un solide jaunâtre, est lavé au diéthylether (3.27 g; Rendement 70%). L'hydroxypropyl pyrrolidinium est caractérisé par RMN et spectrométrie de masse. RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 2.21 (2H, m), 2.40 (2H, m), 3.24 (3H, s), 3.61 (2H, m), 3.71 (4H, m), 3.87 (2H, m). RMN-^{13}C : 23.000, 27.806, 35.769, 43.653, 49.845, 60.037, 63.284, 66.133 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+): m/z 144.2 (100%).

II. 2. 1. A. 5. Synthèse de l'hydroxybutyl pyrrolidinium chloride (cation 2c) :

Le 1-Methylpyrrolidine (17 mmole, 1,85 g, 1 équivalent) et le 4-Chloro-1-butanol (17 mmole, 1,45 g, 1 équivalent) sont mélangés à 70°C sous reflux et sous atmosphère d'argon durant 48 heures. Le produit obtenu est un liquide visqueux marron lavé au diéthylether (2,59 g; Rendement 45%). L'hydroxybutyl pyrrolidinium est caractérisé par RMN et spectrométrie de masse. RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 1.82 (2H, m), 2.07 (2H, m), 2.40 (4H, m), 3.24 (3H, s), 3.56 (2H, m), 3.70 (4H, m), 3.83 (2H, m). RMN-^{13}C : 24.069, 25.459, 27.033, 29.189, 32.644, 49.541, 59.935, 64.931, 68.448 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+): m/z 158 (100%).

II. 2. 1. A. 6. Synthèse de l'hydroxyhexyl pyrrolidinium chloride (cation 2d) :

Le 1-Methylpyrrolidine (25 mmole, 3,41 g, 1 équivalent) et le 6-chloro-1-hexanol (25 mmole, 2,13 g, 1 équivalent) sont mélangés à 70°C sous reflux et atmosphère d'argon durant 48 heures. Le produit obtenu, un liquide visqueux marron, est lavé au diéthylether (4,15 g; Rendement 81%). L'hydroxyhexyl pyrrolidinium est caractérisé par RMN et spectrométrie de masse. RMN-^{1}H (300 MHz, D_2O) : δ = 1.60 (4H, m), 1.76 (2H, m), 2.01 (2H, m), 2.40 (4H, m), 3.24 (3H, s), 3.53 (2H, m), 3.71 (4H, m), 3.80 (2H, m). RMN-^{13}C : 21.703, 23.420, 24.976, 25.846,

31.399, 32.251, 46.193, 48.442, 61.959, 64.591 ppm. Spectrométrie de masse (ESI^+): m/z 186.2 (100%).

II. 2. 1. A. 7. Le (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium dimethylphosphate (cations 3) et l'hydroxyethyl methylimidazolium chloride (cation 1a)

Le (2-hydroxyhethyl)trimethylammonium dimethylphosphate (cation **3**) et l'hydroxyethyl methylimidazolium chloride (cation **1a**) sont d'origine commerciale et ont été utilises tels quels lors de la modification covalente de la FDH.

II. 2. 1. B. Modification chimique de la formiate déshydrogénase

Les cations hydroxylés (250 µl, 1,36 M) et le carbonyl-diimidazole (CDI; 250µl, 1,36 M) sont mélangés dans des proportions 1/1 (mol/mol) dans du DMSO anhydre sous atmosphère contrôlée (argon). Le milieu réactionnel est incubé deux heures à température ambiante, puis un aliquot de 100 µl de la solution de cation activé est ajouté à 1ml d'une solution de FDH (0,4 $U.mL^{-1}$, 1,5 µM dans du tampon carbonate 25 mM, pH 9,7). Le milieu réactionnel est homogénéisé au vortex et la réaction est conduite pendant 24 heures à température ambiante. Afin d'éliminer les substances n'ayant pas réagi et de changer le tampon, les échantillons sont passés sur une colonne de dessalage (microbiospin) après les avoir concentré sur des microconcentrateurs dont la limite d'exclusion est de 30 kDa. Selon l'expérience, l'enzyme est reprise soit dans 1 mL de tampon carbonate 25 mM pH 9,7, soit dans 1 mL de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2 (NaCl 8 $g.L^{-1}$, KCl 0,2 $g.L^{-1}$, Na_2HPO_4 1,44 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 0,24 $g.L^{-1}$). La concentration en protéine des échantillons est mesurée selon la méthode de Bradford (Bradford MM, 1976).

II. 2. 1. C. Mesure des activités enzymatiques

La fomiate déshydrogénase (FDH) oxyde le formiate en dioxyde de carbone avec la réduction concomitante du NAD^+ en NADH. Le NADH peut être réoxydé chimiquement en NAD^+ en présence de PES ("Phenazine Ethosulfate"). Ce dernier est oxydé à son tour en présence de NBT ("Nitroblue Tetrazolium") conduisant ainsi à la formation de formazan qui forme un précipité bleu/violet absorbant à 560 nm (schéma 47). L'activité enzymatique de la FDH est

mesurée soit par le suivi de l'apparition du NADH à 340 nm ($\varepsilon_M^{340\ nm}$ = 6,22 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$) soit par la mesure de l'apparition du formazan à 560 nm (schéma 47).

Le milieu réactionnel est composé de 10 µL de solution de FDH (0,4 $U.mL^{-1}$), 10 µL d'une solution de NAD^+ (50 mM), 10 µL de formiate (3 M) et de 0-70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] dans du tampon carbonate (pH 9,7, 25 mM) ou dans du tampon PBS (pH 7,2). Pour le suivi de l'activité à 560 nm, le milieu est composé de 10 µL de solution enzymatique (0,4 $U.mL^{-1}$), 5 µl de NAD^+ (50 mM), 5 µL de formiate (3M), 5 µL de PES (0,24 mM), 5 µL de NBT (2 mM) et de 0-70% (v/v) de **LI-1**. Dans chaque puit le trajet optique est déterminé par la mesure de l'absorbance de l'eau à 975 nm ($\varepsilon_M^{975\ nm}$ = 3,05 10^{-3} $M^{-1}.cm^{-1}$). Les activités sont des moyennes de 3 mesures et les activités spécifiques sont exprimées en $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$.

Les paramètres cinétiques des différentes enzymes pour le NAD^+ sont déterminés en présence d'une concentration de formiate saturante (300 mM dans l'essai) et de concentrations croissantes de NAD^+ (de 25 µM à 3,2 mM). Les paramètres cinétiques sont extraits de la représentation de Hanes-Woolf.

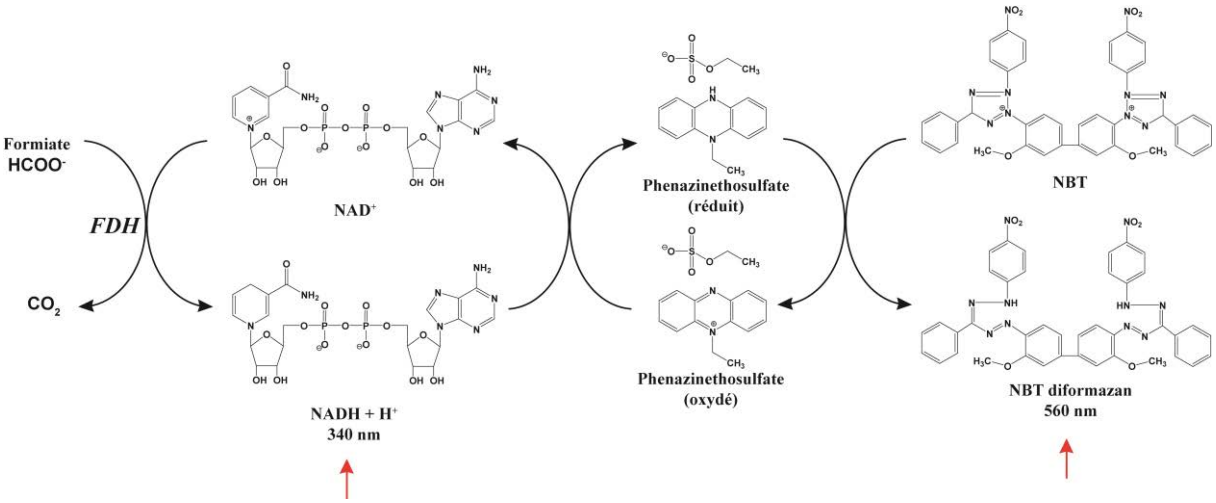


Schéma 47 : Schéma de la réaction catalysée par la FDH où figure l'oxydation chimique du NADH par le couple PES/NBT. Les flèches rouges indiquent les produits de la réaction pouvant être suivis par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

II. 2. 1. D. Mesure des temps de demi-vie de la FDH modifiée de manière covalente

Les temps de demi-vie de la FDH sauvage commerciale et de la FDH modifiée par les cations **1a**, **1b** ou **3** ont été déterminés en présence ou en absence de 37,5 % (v/v) de

[MMIm][Me_2PO_4]. Les enzymes (0,05 U.mL^{-1}) ont été incubées dans une plaque (de microtitration) 96 puits à température ambiante dans du tampon carbonate (pH 9,7, 25 mM) en présence ou en absence de 37,5 % (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] pour un volume final de 80 µL. Les activités ont été mesurées en triplicat toutes les 24 h par le suivi de l'absorbance à 340 nm, après avoir ajouté les substrats : 10 µL de NAD^+ 50 mM et 10 µL de formiate 3 M. Les temps de demi-vie ($t_{1/2}$, équation 11) sont obtenus à partir d'une courbe de décroissance exponentielle suivant l'activité en fonction du temps, en considérant que l'inactivation de l'enzyme suit une cinétique de premier ordre (équation 10):

$$[A_t] = [A_0] \cdot e^{-k_{1/2} \cdot t} \qquad (10)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{1/2}} \qquad (11)$$

$[A_t]$ et $[A_0]$ sont respectivement les activités de l'enzyme à un temps t (en jours) et au temps 0 de l'expérience. Le temps de demi-vie de l'enzyme est calculé à partir de la constante d'inactivation ($k_{1/2}$).

II. 2. 1. E. Analyses par spectrométrie de masse

II. 2. 1. E. 1. Analyse par spectrométrie de masse ESI$^+$

La solution d'enzyme (1 mL à 0,4 U.mL^{-1} soit 1,5 µM) est concentrée sur une membrane de 30 kDa de seuil de coupure et dessalée sur une colonne "micro biospin 6" préalablement équilibrée avec de l'eau déionisée. Les protéines sont diluées dans un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v), acide formique 0,1% (v/v) avant injection dans l'appareil à 5 µL.min^{-1}.

II. 2. 1. E. 2. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

II.2.1.E.2.a Immobilisation des enzymes protéolytiques sur billes de sepharose

Les enzymes protéolytiques, trypsine ou chymotrypsine, sont greffées par covalence sur des billes de sepharose activées au bromure de cyanogène afin de pouvoir facilement les séparer des produits de digestion. Les billes activées au CNBr (300 mg) sont mises en suspension dans 5

mL d'HCl 1 mM et incubées 30 minutes à température ambiante. Le gel est ensuite lavé avec 10 mL d'HCl 1 mM et 3 mL de tampon carbonate (50 mM, pH 8,2). Parallèlement des solutions de trypsine (2,5 mL, 3 $mg.mL^{-1}$ soit 3720 $U.mL^{-1}$) et de chymotrypsine (2,5 mL, 6 $mg.mL^{-1}$ soit 240 $U.mL^{-1}$) sont préparées dans du tampon carbonate (50 mM, pH 8,2). Les enzymes protéolytiques sont ajoutées aux billes de sepharose et incubées 3 heures à température ambiante sous agitation. Les fonctions CNBr n'ayant pas réagies sont bloquées par l'ajout d'une solution d'éthanolamine 1 M (2,5 mL) durant 3 heures. Le gel est finalement lavé par le passage répété de 3 mL d'une solution d'acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4,0 et de 3 mL de tampon carbonate 50 mM pH 8,2 et cela est répété 3 fois.

II.2.1.E.2.b Digestion trypsique et chymotrypsique

Avant de procéder à la digestion, les fonctions thiols des enzymes sont réduites et alkylées afin que tous les sites de coupures possibles soient accessibles aux enzymes protéolytiques dans le but d'obtenir des empreintes de masse comparables. La FDH sauvage ainsi que les enzymes modifiées par les cations **1a**, **1b** et **3** sont réduites par l'ajout de Di-thiothreitol à 1 $mg.mL^{-1}$ (concentration finale de 6,5 mM) durant 10 minutes dans du tampon carbonate (50 mM, pH 8,2). Les enzymes sont ensuite alkylées par l'ajout d'acide iodoacétique (concentration finale de 15 mM) durant 1 heure à temperature ambiante. Les enzymes sont concentrées et desalées sur une membrane de 30 kDa puis resuspendues dans du tampon carbonate 50 mM pH 8,2.
La digestion est initiée par l'ajout de 100 mg de protéase immobilisée sur les billes de sepharose dans 1 mL de FDH 0,4 $U.mL^{-1}$ préalablement réduite et alkylée. Les milieux réactionnels sont incubés 4 heures à 37°C sous agitation.

II.2.1.E.2.c Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Un aliquot de produit de digestion est déposé à la surface d'un support métallique et est séché à l'air avant d'ajouter la matrice MALDI (α-cyano-4-hydroxycinnamique à 5$mg.mL^{-1}$ dans un mélange acétonitrile : eau : acide trifluoroacétique; 50 : 50 : 0,1).

Les peptides obtenus après digestion trypsique et chymotrypsique de la FDH sauvage sont identifiés à l'aide d'un logiciel de prédiction des empreintes massiques de digestion PeptidMass (http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html). En ce qui concerne les enzymes modifiées, les empreintes massiques obtenues sont comparées à la masse théorique calculée des peptides

contenant 0-5 modifications en considérant les masses isotopiques des adduits (152.0586, 166.0748 et 129.0790 Da pour **1a**, **1b** et **3** respectivement).

Afin de calculer les fréquences de modification, pour chaque peptide contenant une ou plusieurs lysines, un coefficient de 0 à 1 est attribué à chaque lysine en fonction de sa probabilité d'être modifiée. Le coefficient est calculé en considérant le nombre total de lysines présentes au sein du peptide. Par exemple, le peptide 20-35 de la FDH modifiée par le cation **3** contient une lysine modifiée sur les deux présentes (LYGCTEN**K**LGIANWL**K**). Un coefficient de 0,5 est attribué à chaque lysine.
La fréquence calculée est décrite selon l'équation 12:

$$f = \frac{\sum \textbf{coefficients}}{\textbf{nombre de fois où la lysine est observée}} \qquad (12)$$

II. 2. 2. Analyses structurales par des méthodes spectroscopiques

II. 2. 2. A. Spectroscopie d'absorption dans l'UV-visible

Les spectres UV-vis de la FDH, dans le tampon PBS pH 7,2 ou en présence de 0-70% (v/v) de LI, ont été mesurés entre 230 nm et 600 nm. Les caractéristiques spectrales de la FDH ont été analysées en présence de 3 liquides ioniques miscibles à l'eau; le [MMIm][Me_2PO_4] (**LI-1**), le [BMIm][CH_3COO] (**LI-2**) et le [MMIm][$CH_3HPO_2(OCH_3)$] (**LI-3**). La concentration finale de FDH est fixée à 0,32 $U.mL^{-1}$ (2,61 µM).

II. 2. 2. B. Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges de la BSA (10 $mg.mL^{-1}$) ou du [MMIm][Me_2PO_4] à 30; 50 et 70 % (v/v) dans du D_2O sont réalisés sur le spectrophotomètre FT-IR iS10 de Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). Un aliquot d'échantillon est disposé entres deux cellules de CaF_2 séparés par un espaceur de 0,2 mm. Le blanc est réalisé sur l'air et la contribution du milieu (D_2O) est soustraite manuellement.

II. 2. 2. C. Dichroïsme circulaire

Les mesures d'ellipticité de la FDH (0,4 $U.mL^{-1}$, 1,5 µM dans du tampon carbonate 25 mM, pH 9,7) sont réalisées entre 180 et 260 nm. Le temps d'acquisition est de 1 seconde par point, les pas de 0,2 nm et la bande passante de 0,5 nm. Les résultats sont exprimés en ellipticité moyenne par résidu (EMR) ("ou MRE : Mean Residual Ellipticity") ou $[\theta]_{Mr}$ en ($deg.cm^2.dmol^{-1}$) selon l'expression 13 ci-dessous :

$$[\Theta]_{Mr} = EMR = \frac{Mr \times [\Theta]}{10 \times d \times c} \qquad (13)$$

$$M_r = \frac{M}{\text{nombre d'acides aminés}} \qquad (14)$$

M_r est la masse moléculaire résiduelle (équation 14), M la masse molaire de l'enzyme en Da, $[\theta]$ l'ellipticité observée (en degré), d la distance parcourue par le trajet optique et c la concentration de l'échantillon (en $g.mL^{-1}$) (Kelly SM *et al.*, 2005).

II. 2. 2. D. Spectroscopie de fluorescence

II. 2. 2. D. 1. Fluorescence intrinsèque de la FDH

La FDH (commerciale) est diluée dans du tampon PBS pH 7,2 et la concentration finale est fixée à 2,61 µM (0,32 $U.mL^{-1}$) dans toutes les expériences. Les échantillons sont excités à 280 nm (bande passante = 5 nm) et l'émission est enregistrée entre 310 et 750 nm (bande passante = 20 nm) en présence de 0-70% (v/v) de LIs ou de 0-359 mM d'imidazole dans du tampon PBS pH 7,2 (pour indication, le rapport imidazolium/imidazole est de 40/60 à pH 7,2). Les spectres de fluorescence des tryptophanes en solution (concentration finale de 50 µM final dans du PBS pH 7,2) en présence des différents LIs ou d'imidazole, ont été enregistrés dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

II. 2. 2. D. 2. Atténuation de fluorescence

II.2.2.D.2.a Atténuation de fluorescence due à la fixation de ligands

Les expériences d'atténuation de fluorescence par les ligands, NAD^+ et/ou azide (N_3^-), ont été réalisées en irradiant les échantillons avec une onde électromagnétique de longueur d'onde de 300 nm (bande passante = 9 nm) et en enregistrant l'émission à 343 nm (bande passante = 20 nm). L'intensité de fluorescence est mesurée soit en présence de 0 à 700 µM de NAD^+ soit en présence de 0 à 5 µM de N_3^- en présence d'une concentration fixe de NAD^+ (500 µM).

II.2.2.D.2.b Atténuation de fluorescence par des agents atténuateurs

Les expériences d'atténuation de fluorescence par l'iode ou l'acrylamide ont été réalisées en présence de 0 à 200 mM de NaI ou de 0 à 350 mM d'acrylamide, soit en présence de 0-60% (v/v) de **LI-1**, **2** ou **3**; soit en présence de 0 à 5 M d'urée dans du tampon PBS pH 7,2. La FDH (commerciale) est diluée dans du tampon PBS pH 7,2 et la concentration finale a été fixée à 2,61 µM (0,32 $U.ml^{-1}$) dans toutes les expériences. Les échantillons sont excités à 280 nm (bande passante = 5 nm) et l'émission est enregistrée entre 310 et 750 nm (bande passante = 20 nm). Les spectres de fluorescence sont une moyenne de 3 mesures indépendantes et la fluorescence du milieu sans enzyme est soustraite.

En ce qui concerne les enzymes modifiées de manière covalente par des cations analogues aux liquides ioniques, l'atténuation de fluorescence est réalisée en présence d'iodure de sodium (NaI). Les échantillons sont excites à 280 nm (bande passante = 5 nm) et l'émission est enregistrée entre 310 et 600 nm (bande passante = 20 nm), en présence de 0 à 200 mM d'iode et en présence de 0 à 40 % (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Les expériences sont réalisées en triple et l'influence du milieu sans enzyme a été soustraite.

II. 2. 3. Evolution dirigée de la FDH

II. 2. 3. A. Stratégie de clonage du gène de la FDH

La FDH a été clonée et exprimée en système bactérien. Dans un premier temps, le gène codant pour la FDH (entrée EMBL : AJ245934; 1095 paires de bases) a été synthétisé (GenScript, Piscataway, New Jersey, Etats-Unis) comprenant les séquences supplémentaires 5'-ggatccataaaaggagatatacc-3' et 5'-ctcgagtctaga-3' respectivement en amont et en aval du gène (schéma 48, annexes I et II). La séquence introduite en amont correspond à l'introduction du site de restriction de BamHI (G/GATCC), d'un codon stop, de la séquence de Shine et Dalgarno (SD) servant à la fixation du facteur σ du facteur de transcription bactérien et de sept nucléotides espaçant la séquence SD de la phase ouverte de lecture. Un nucléotide est introduit entre le site de restriction de BamHI et le codon stop afin que ce dernier soit dans la phase ouverte de lecture du vecteur pET28-b, utilisé pour l'expression de la FDH. La séquence introduite en aval du gène correspond à l'introduction des sites de restriction de XhoI (C/TCGAG) et de XbaI (TCTAGA).

Les sites de restrictions BamHI/XbaI ont été introduits afin de pouvoir cloner la FDH dans le site multiple de clonage du vecteur pUC57, un vecteur servant par défaut à la livraison des séquences synthétisée (GenScript) et qui a essentiellement servi de support pour le matériel génétique durant les différentes expériences. Le clonage de la FDH dans le vecteur pET-28b, utilisé pour l'expression de la FDH, se fait par l'intermédiaire des sites de restriction de BamHI/XhoI. Le choix de deux enzymes de restrictions différentes possédant chacune un site unique de clivage, aussi bien au niveau de la séquence synthétisé que du vecteur pET-28b, nous a permis le clonage directionnel de la FDH dans le vecteur d'expression.

Schéma 48 : Représentation de la construction génomique codant pour la FDH. Les flèches noires et les flèches rouges indiquent respectivement les sites de restrictions utilisés afin de cloner de manière directionnelle la séquence de la FDH dans le vecteur pUC57 et pET-28b.

II. 2. 3. A. 1. Les vecteurs utilisés

II.2.3.A.1.a Les Le vecteur de clonage : pUC57

Le vecteur pUC57 a essentiellement servi de support pour le gène de la FDH, il a été utilisé dans certains cas pour l'amplification du gène ou comme support lors de PCR. Il est composé de 2710 pb comprenant : une origine de réplication bactérienne (pMB1 Ori.), un site multiple de clonage (MCS) inséré dans le gène (lacZ) codant pour la β-galactosidase qui permet le criblage bleu/blanc (non utilisé lors nos travaux) et un gène de résistance à l'ampicilline (bla) (schéma 49). Une fois introduit dans les bactéries, ce vecteur exprime la FDH de manière constitutive et à un faible taux. La FDH exprimée est en réalité une protéine de fusion de 381 acides aminés (aa.) qui correspondrait à la FDH sauvage (364 aa.) associée à 17 acides aminés en position N-terminale. Le vecteur pUC57 n'a pas été utilisé pour l'expression de la FDH.

II.2.3.A.1.b Le vecteur d'expression : pET-28b

Le vecteur pET-28b a été utilisé comme vecteur d'expression. Ce vecteur de 5368 pb a pour composantes importantes : une origine de réplication bactérienne (pBR322), un gène dénommé lacI codant pour le répresseur de l'ARN polymérase du phage T7, un gène de résistance à la kanamycine (Kan^R), une origine de réplication de type phagique (f1 Ori), un site multiple de clonage (MCS) précédé d'un promoteur fort du phage T7 et qui se termine par la séquence de terminaison de ce même phage (schéma 49). Une fois transformée dans les bactéries *E. coli* BL21, la FDH n'est pas exprimée. L'expression de la FDH est induite par l'ajout d'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu. Ce dernier va inhiber lac I, le répresseur de l'ARN polymérase du phage T7, ce qui permettra à l'ARN polymérase du phage T7, exprimée constitutivement par les bactéries *E. coli* BL21, de réaliser la transcription du gène de la FDH.

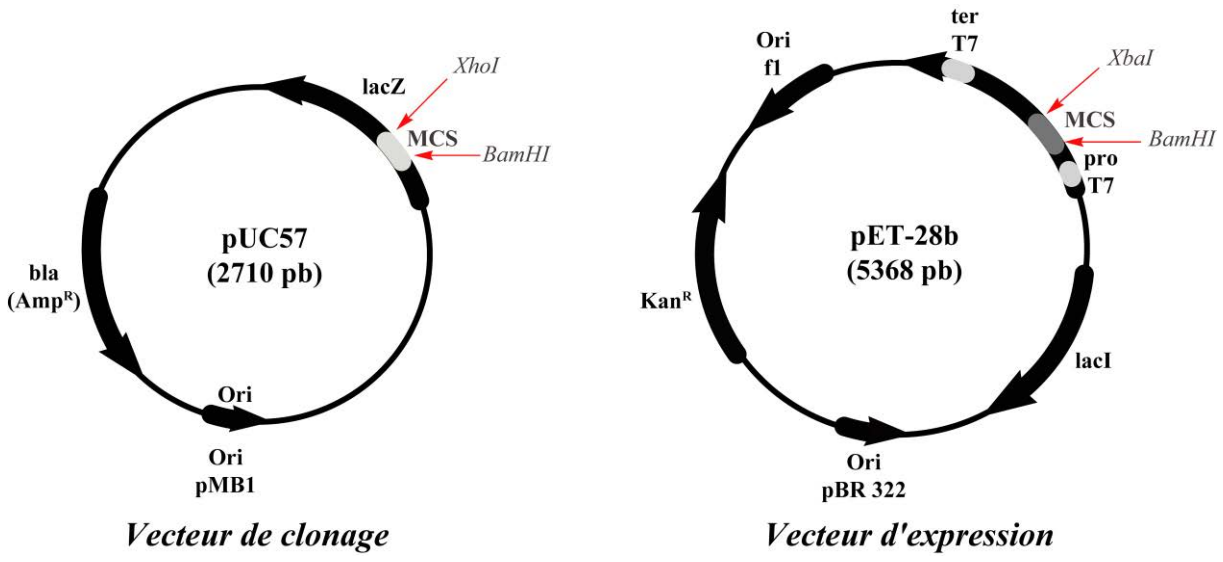


Schéma 49 : Représentation schématique résumant les composantes essentielles des vecteurs pUC57 (gauche) et pET-28b (droite).

II. 2. 3. B. Production de la FDH en système bactérien

II. 2. 3. B. 1. Amplification du gène de la FDH

Le vecteur pUC57 contenant la FDH (pUC57-FDH) a été transformé dans des bactéries *E. coli* DH10B par choc thermique selon un protocole conventionnel. Les cellules sont décongelées dans de la glace puis introduites dans un tube de culture (10 mL). L'ADN plasmidique (1 µL; 200 ng) est ajouté aux cellules et l'ensemble est soigneusement mélangé et incubé 30 minutes à 4°C. Le choc thermique est réalisé pendant 45 s à 42°C, un temps au cours duquel les membranes des cellules sont perturbées et ménageront des pores à travers lesquels l'ADN pénétrera. Les cellules sont ensuite immédiatement mises dans la glace afin que les pores se referment piégeant ainsi l'ADN à l'intérieur des cellules. Les cellules sont ensuite incubées au moins de 2 minutes dans la glace avant d'ajouter 960 µL de milieu LB (Tryptone 10 $g.L^{-1}$, NaCl 10 $g.L^{-1}$, extrait de levure 5 $g.L^{-1}$) et incubées 1 heure à 37°C, sous agitation (250 rpm). Les cellules ayant été transformées par le vecteur recombinant sont sélectionnées sur un milieu LB-Agar-Ampicilline 100 $\mu g.mL^{-1}$. Une colonie est remise en culture dans 100 mL de LB-Ampicilline 100 $\mu g.mL^{-1}$ pendant une nuit à 37°C et sous agitation à 250 rpm. L'ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline des cellules et purifiée sur une colonne échangeuse d'anion (kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi/EF). L'ADN est récupéré dans 300 µL d'eau et la

concentration d'ADN est estimée par la mesure de l'absorbance à 230 nm à l'aide de l'appareil "NanoDrop 2000". La séquence de l'insert est vérifiée par séquençage.

II. 2. 3. B. 2. Clonage de la FDH dans le vecteur pET-28b

II.2.3.B.2.a Double digestion BamHI/XhoI

Le vecteur pUC57 contenant l'insert (pUC57-FDH) ainsi que le vecteur pET-28b sont digérés par les enzymes de restrictions BamHI et XhoI afin de pouvoir cloner la FDH dans son vecteur d'expression et cela de manière directionnelle. Les vecteurs pUC57-FDH (2,5 µg) ou pET-28b (1 µg) sont incubés en présence de 20 Unités (une unité U, étant la quantité d'enzyme nécessaire à la digestion de 1 µg d'ADN en 1 heure, à 37°C, dans un volume réactionnel de 50 µL) de BamHI (10 $U.\mu L^{-1}$) et de 20 U de XhoI (20 $U.\mu L^{-1}$) dans un volume total de 300 µL. La digestion est réalisée dans du tampon NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,9) en présence de $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM et de SAB ("Sérum d'Albumine Bovin") 100 $\mu g.mL^{-1}$. L'ensemble est mélangé et incubé 1 heure à 37°C. Les témoins, sans enzymes ou avec une seule enzyme de restriction, sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions, dans un volume réactionnel de 30 µL.

La double digestion est vérifiée sur gel d'agarose 0,7% (m/v). Un aliquot de 20 µL de milieu de digestion est déposé sur gel après avoir ajouté 4 µL de tampon de charge concentré 6 fois (Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), bleu de bromophénol 0,03%, Xylène cyanol FF 0,03%, glycérol 60%, EDTA 60 mM). L'ADN plasmidique migre durant 15 minutes à 100 Volts. L'ADN est coloré au bromure d'éthidium (0,01 % (v/v)) et révélé sous UV.

II.2.3.B.2.b Ligation de l'insert dans le vecteur pET-28b

L'insert codant pour la FDH est isolé à partir du gel d'agarose à l'aide du kit d'extraction d'ADN plasmidique ("QIAquick Gel Extraction Kit"). L'insert (la FDH) ainsi que le vecteur d'expression (pET-28b), préalablement digérés par les enzymes de restriction BamHI/XhoI, sont desalés (kit QIAquick) afin de changer de tampon et de séparer l'ADN des enzymes de restriction. Le vecteur pET-28b (5328 pb) et l'insert (1118 pb) sont incubés, dans un volume final de 20 µL durant 1 heure 30 minutes et à température ambiante, dans des rapports 1/1 (85 ng/18 ng) ou 1/3 (85ng/54 ng; mol/mol; vecteur/insert) en présence d'une unité de T4 DNA ligase dans du tampon (Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), $MgCl_2$ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM, et

polyethylene glycol-8000 5% (w/v)). Le témoin est constitué de la ligation du vecteur pET-28b sans l'insert; qui, en théorie, ne devrait pas se liguer dans la mesure où il a été digéré préalablement par deux enzymes de restriction différentes. Ce témoin permet d'observer le taux de vecteurs non digérés par les deux enzymes. Un aliquot de 2 µL de milieu de ligation est utilisé afin de transformer les cellules *E. coli* BL21 par choc thermique selon le protocole décrit précédemment (II. 2. *3*-B. 1.). Les cellules contenant le vecteur recombinant sont sélectionnées sur milieux LB-Agar-Kanamycine 100 $\mu g.mL^{-1}$. Cinq colonies sont observées sur la boîte correspondant au témoin, 300 colonies sont observées pour la ligation dans un raport 1/1 et une centaine de colonies est observée sur la boîte correspondant au rapport 1/3. Trois colonies sont repiquées à partir des boîtes correspondant aux ligations 1/1 et 1/3 et remises en culture dans 3 ml de milieu LB-Kanamycine 100 $\mu g.mL^{-1}$ pour la nuit à 37°C sous agitation à 250 rpm.

La présence de l'insert est contrôlée par la double digestion BamHI/XhoI de l'ADN plasmidique (100 ng) des 6 clones extrait à l'aide du kit Nucleospin®. Un clone est sélectionné et est séquencé par l'intermédiaire de l'entreprise Eurofins MWG Operon.

II. 2. 3. B. 3. Production de la FDH dans *Escherichia coli*

Le vecteur d'expression est transformé dans des cellules *E. coli* BL21 par choc thermique. Les cellules contenant le vecteur recombinant sont sélectionnées sur LB-Agar-Kanamycine 100 $\mu g.mL^{-1}$ puis mises en culture à 37°C, sous agitation durant la nuit dans 100 mL de milieu LB-Kanamycine 100 $\mu g.mL^{-1}$. La production de FDH est induite par l'ajout d'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 1 mM final) dans le milieu et les cellules sont remises en culture à 30°C. Après 5 heures d'induction, 1,5 mL de milieu sont extraits et centrifugés 2 minutes à 1000 g. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans 500 µL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 (K_2HPO_4 80 mM et KH_2PO_4 20 mM), Triton X-100 0,1 % (v/v), EDTA 200 mM; mélangées au vortex 1 minute et centrifugées 2 minutes à 1000 g. Le surnageant récupéré constitue l'extrait cellulaire brut. En parallèle, la même expérience est réalisée en présence de cellules *E. coli* BL21 transformée par le vecteur pET-28b non recombinant (ne codant pas pour la FDH). Ce test est réalisé afin de contrôler que l'activité mesurée soit bien dûe à la production de la FDH et non pas à la présence de formiate déshydrogénases endogènes à *E. coli* bien que cet organisme ne soit pas méthylotrophique. L'activité enzymatique est mesurée sur 10 µL d'extrait cellulaire brut, par le suivi de l'absorbance à 340 nm tel que décrit précédemment (section II. 2. 1. C.).

II. 2. 3. B. 4. Estimation du meilleur temps d'induction

Les cellules transformées soit par le vecteur vide, soit par le vecteur recombinant, sont mises en culture sur la nuit dans 100 mL de LB-Kanamycine 100 µg.mL^{-1}. Au temps 0, 100 µL d'IPTG (1M) sont ajoutés puis 1,5 mL de milieu sont aliquotés et mis à 4°C toutes les heures afin d'estimer quel est le meilleur temps d'induction. Les cellules sont centrifugées 2 minutes à 1000 g puis mises en suspension dans 500 µL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4, Triton X-100 0,1 % (v/v) et EDTA 200 mM. L'extrait cellulaire brut est obtenu après centrifugation. L'activité enzymatique est mesurée avec 30 µL d'extrait cellulaire brut, par le suivi de l'absorbance à 340 nm en présence de 5 mM de NAD^+ et de 300 mM de formiate (section II. 2. 1-C.).

II. 2. 3. C. PCR de basse fidélité

Les PCRs de basses fidélités ont été réalisées, soit sur le vecteur pUC57-FDH en présence des amorces 5'-ggcccgggatccataa-3' et 5'-atgcatctagactcgagct-3', soit sur le vecteur pET-28b-FDH en présence du couple d'amorce 5'-ttaatacgactcactatagg-3' et 5'-ccaaggggttatgctag-3' (annexe II). Les amorces ont été synthétisées par la société Eurofinsdna MWG Operon. Les amorces s'hybrident soit sur les séquences promotrices et de terminaison du phage T7 situées sur le vecteur pET-28b(-FDH) soit sur les sites de restriction de BamHI et de XhoI sur le vecteur pUC57(-FDH). Le programme de PCR utilisé lors de toutes les expériences est le suivant : 5 minutes à 98°C pour séparer les deux brins d'ADN, 35 cycles de; 45 secondes à 98°C, 45 secondes d'hybridation à 40°C et 2 minutes d'élongation à 72°C. Le programme se termine par 5 minutes à 72°C et une conservation des échantillons à 4°C.

II. 2. 3. C. 1. PCR en présence de concentrations biaisées de désoxynucléotides

La PCR a été réalisée en présence de deux fois plus de bases puriques (Adénine et Guanine) (schéma 50). Le milieu réactionnel est composé de 2,5 µL de Taq polymérase (1 U.µL^{-1}), 2,5 µL de dATP (2,5 mM, Invitrogen), 2,5 µL de dGTP (2,5 mM, Invitrogen), 1,25 µL de dTTP (2,5 mM, Invitrogen), 1,25 µL de dCTP (2,5 µM, Invitrogen), 5 µL de chacune des amorces (1

pmol.µL^{-1}) et de 3 µL de vecteur pUC57-FDH (0,267 ng.µL^{-1}) dans du tampon Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, pH 8,3.

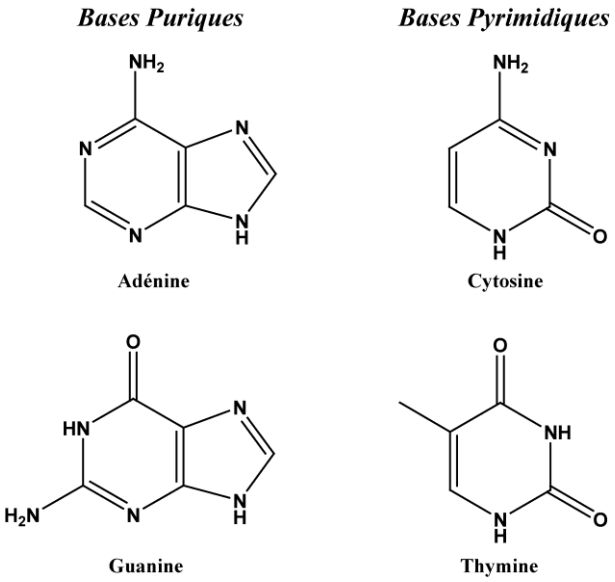


Schéma 50 : Représentation des bases nucléiques.

II. 2. 3. C. 2. PCR en présence de manganèse

La seconde condition de PCR correspond à l'ajout de Mn^{2+} (250 µM final) dans le milieu réactionnel. Dans ce cas-ci, 5µL d'un mélange de désoxynucléotide (dNTP, 2,5 mM) est utilisé dans un volume réactionnel de 50 µL.
Le témoin positif correspondant à la PCR en absence de Mn^{2+} est réalisé en parallèle.

Les produits de PCR sont ensuite dessalés (kit de purification QIAquick) puis digérés par les enzymes de restrictions BamHI/XhoI tel que décrit précédemment. Les produits de digestions sont de nouveau dessalés puis ligués dans le vecteur pET-28b.
Trois échantillons correspondant à chacune des conditions de PCR sont séquencés à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques des séquences promotrices et de terminaison du phage T7 (T7 Pro. et T7 ter. respectivement) (annexes I et II).

II. 2. 3. D. Criblage de la librairie de mutants

II. 2. 3. D. 1. Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en milieu solide

Le criblage de l'activité FDH en milieu solide est réalisé selon le protocole établit par Ansorge-Schumacher MB *et al.*, 06. Dans un premier temps, les cellules sont sélectionnées sur du milieu LB-Agar-Kanamycine (100 µg.mL^{-1}). Un réplica est réalisé sur des boîtes LB-Agar-Kanamycine (100µg.mL^{-1}) contenant de l'IPTG 1 mM, à l'aide de disques de papier préalablement coupés aux dimensions des boîtes de pétri. Les boîtes sont incubées sur la nuit à 37°C. Les cellules induites sont fixées par le dépôt d'une couche d'agar 1,6% (w/v) dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4; Triton X-100 0,2% (v/v), EDTA 10 mM; coulée à une température inférieure de 70°C afin de ne pas endommager les protéines. Les cellules sont ensuites perméabilisées par le passage de 5 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4, Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 200 mM. Cette étape est répétée 3 fois sous agitation douce, chaque passage dure 10 à 15 minutes environ. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par le passage de 5 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. Les substrats sont ajoutés par le dépôt de 3,5 mL d'une solution de formiate de sodium 1,25 M et de NAD^+ 5 mM dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. La boîte est incubée 5 minutes sous agitation. La solution de révélation PES (120 µL à 60 mM) et NBT (200 µL à 6 mM) est ajoutée et la boîte est placée à l'obscurité sous agitation durant 20 à 30 minutes. Les cellules sont finalement lavées à l'eau, distillée plusieurs fois et les spots colorés en gris/noir sont observés à l'œil nu.

II. 2. 3. D. 2. Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en milieu liquide

Les cellules présentant une activité formiate déshydrogénase en milieu solide sont repiquées dans 1 ml de milieu LB-Kanamycine 100 µg.mL^{-1} à partir des boîtes mères. Les cellules sont rassemblées dans des plaques de culture de 96 puits (2 mL/puit). Après culture sur la nuit à 37°C sous agitation, la plaque 96 puits est dupliquée afin de constituer une banque de cellule stock. Les cellules sont induites à l'IPTG (1 mM final) durant 5 heures. Les cellules sont récupérées par centrifugation 15 minutes à 2000 g à 4°C et mises en suspension dans 500 µL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4; Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 200 mM. Les plaques de cultures sont centrifugées de nouveau 15 minutes à 2000 g et à 4°C, le surnageant (l'extrait cellulaire brut) est récupéré.

Le criblage de l'activité est réalisé par la mesure de l'absorbance à 560 nm (en point final) au bout de 5 minutes, soit dans du tampon PBS pH 7,2, soit en présence de 60% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Le milieu réactionnel est composé de 10 µL d'extrait brut cellulaire, 10 µl d'une solution de NAD^+ 25 mM, formiate 1,5 M, 10 µL d'un solution de PES 140 µM, NBT 1 mM en présence ou en absence de 60% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] dans du tampon PBS pH 7,2 dans un volume total de 100 µL.

II. 2. 3. E. Purification de la FDH

II. 2. 3. E. 1. Purification par séparation en deux phases aqueuses ("ATPS: Aqueous Two-Phase Separation")

Les cellules *E. coli* BL21(DE3) transformées par le vecteur pET-28b sont cultivées dans du milieu LB-Kanamycine 100 µg.mL^{-1} sur la nuit à 37°C sous agitation dans un volume de 100 mL. L'expression est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM) dans le milieu et les cellules sont incubées 5 heures sous agitation à 30°C. Les cellules sont récupérées par centrifugation 15 minutes à 10 000 g à 4°C et reprises dans 50 % (m/v) de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. Du polyéthylène glycol (PEG) 400 (30% (v/v)) est ajouté dans le milieu qui est vortexé pour obtenir une solution homogène et incubé 2 heures à 37°C. L'extrait cellulaire obtenu est refroidi à température ambiante durant 5 à 10 minutes puis 5 % (m/m) de K_2HPO_4 et 21 % (m/m) de H_2O sont ajoutés au milieu. Après dissolution complète du K_2HPO_4 par agitation au vortex, 7 % (m/m) de PEG 1550 et 6 % (m/m) de NaCl sont ajoutés. Le milieu est mélangé jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Le mélange se sépare en deux phases au bout de 2 heures. La séparation est améliorée par centrifugation 5 minutes à 10 000 g. La phase supérieure correspondant à l'extrait cellulaire est récupérée puis mélangée avec 20 % (m/m) de PEG 6000 et 10 % (m/m) d'eau distillée. La FDH précipite à partir de cette solution après 2 à 3 heures d'incubation à température ambiante. L'enzyme est finalement récupérée par centrifugation 10 minutes à 10 000 g et est dissoute dans du tampon PBS pH 7,2.

II. 2. 3. E. 2. Purification sur hydroxylapatite

L'hydroxylapatite (3g) est mise en suspension et équilibrée dans du tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,4 (20 mL). La FDH, préalablement purifiée par séparation de phase, est

lavée trois fois avec du tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,4, sur des microconcentrateurs possédant des membranes dont la taille d'exclusion est de 30 kDa. L'enzyme en solution dans du tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,4 est déposée sur le gel. La colonne est ensuite lavée avec 15 mL de tampon d'équilibration (phosphate de potassium 5 mM pH 7,4). La protéine est éluée par l'augmentation de la concentration en phosphate de potassium dans la colonne de 10 à 60 mM par palier de 10 mM. Trois fractions de 3 ml sont récupérées par palier. La colonne est finalement lavée avec du tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,4. La FDH est éluée à partir de 30 mM d'ion phosphate, le pic d'activité est observé à 60 mM d'ion phosphate.

Un aliquot de 30 µL de chaque fraction est utilisé afin de mesurer l'activité formiate déshydrogénase par le suivi de l'absorption à 340 nm selon les conditions décrites précédemment (section II. 2. 1. C.). Afin d'avoir une estimation de la quantité de protéines dans les fractions, l'absorbance à 280 nm est mesurée; les valeurs sont corrigées par l'absorbance à 280 nm du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4.

II. 2. 3. F. Contrôle des purifications par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante : SDS-PAGE

Les échantillons issus des purifications sont dosés par la méthode de Bradford et concentrés sur des micro-concentrateurs (30 kDa). Un aliquot de chaque fraction, correspondant à 5 µg de protéines, est déposé sur gel de polyacylamide de 10% (m/v). Un volume de tampon Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; glycérol 25 %, SDS 2 % et bleu de bromophénol 0,01 %) et 1 mM de DTT sont ajoutés à l'échantillon protéique puis l'ensemble est mis à ébullition 5 minutes à 100 °C avant le dépôt sur le gel.

III. Résultats et discussion

Communément, l'inactivation des biocatalyseurs en présence de liquides ioniques (LIs) est associée à leur dénaturation. Cependant, peu d'études ont cherché à étudier les structures protéiques dans ces milieux. Dans le domaine de la biocatalyse en LI et plus précisément en LI miscible à l'eau, il est nécéssaire de disposer d'une méthode simple permettant l'évaluation de la structure protéique en LI. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude structurale des protéines en présence de LI par des méthodes spectroscopiques car elles restent à ce jour les méthodes les plus simples et faciles à mettre en œuvre.

III. 1. Méthodes d'analyse structurale en LI

III. 1. 1. Analyse de la structure protéique en LI par spectroscopie infrarouge

Afin d'étudier la faisabilité de la méthode de spectroscopie infrarouge (IR) pour l'évaluation de la structure protéique en LI, l'albumine issue de sérum bovin (SAB) a été utilisée comme modèle d'étude en raison de son faible coût et des fortes concentrations de protéines nécessaires pour l'analyse en infrarouge.

Les spectres IR de la SAB ou du [MMIm][Me_2PO_4], à différentes concentrations, ont été mesurés entre 1350 et 2000 cm^{-1}. Le spectre IR de la SAB (10 $mg.mL^{-1}$), seule dans du D_2O, décrit deux pics correspondant aux bandes amides I et II (voir section I. 3. 3. B. 1., tableau 10) typiques des liaisons peptidiques (encart de la figure 6).

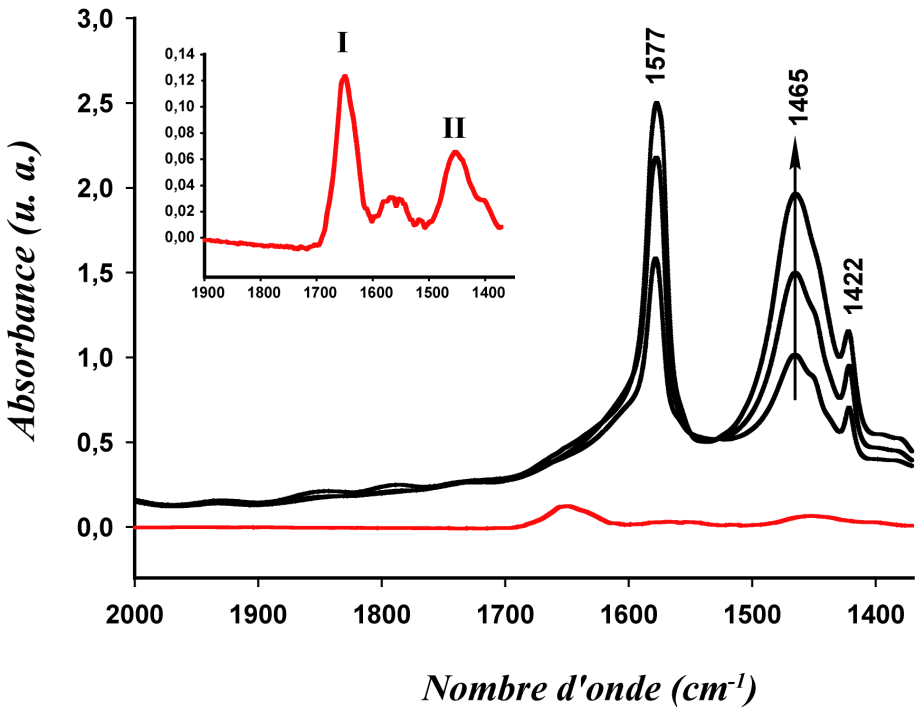


Figure 6 : Spectres infrarouges de la SAB à 10 mg.mL^{-1} (rouge) et du [MMIm][Me$_2$PO$_4$] (noir) à 30, 50 et 70 % (v/v) dans du D$_2$O mesurés entre 1350 et 200 cm^{-1}. La flèche indique l'augmentation de la concentration de LI. Un agrandissement du spectre infrarouge de la SAB est inséré dans la figure.

Le [MMIm][Me$_2$PO$_4$] absorbe fortement les radiations infrarouges. Le spectre du LI seul forme trois pics à 1422; 1465 et 1577 cm-1 (figure 6). Les deux bandes à 1465 et 1577 cm^{-1} sont également retrouvées par d'autres équipes à 1462 et 1575 cm^{-1} (Vitz J *et al.*, 09). La bande aux alentours à 1465 cm^{-1} pourrait être due aux vibrations de déformation des doubles liaisons carbone/carbone (1400-1600 cm^{-1}) du noyau imidazolium et le pic observé à 1422 cm^{-1} pourrait être due aux vibrations de déformations des groupements méthyles (1430-1470 cm^{-1}) du dimethylimidazolium et du diméthylphosphate. Le pic situé à 1577 cm^{-1} est probablement lié à l'absorption du noyau imidazolium et plus précisément aux vibrations de déformations des doubles liaisons carbone/carbone (1400-1600 cm^{-1}) et des liaisons carbone/azote (1590-1690 cm^{-1}). Cependant, la superposition des différentes bandes caractéristiques ne permet pas de précisément attribuer les bandes à un groupement précis.

L'analyse structurale en LIs par spectroscopie IR se heurte à plusieurs difficultés. Premièrement, les échantillons protéiques doivent être fortement concentrés (> 5 mg.mL^{-1}), il est par conséquent difficile de mettre en œuvre cette technique pour des échantillons d'enzymes parfois précieuses ou en raison de phénomènes de précipitation venant interférer avec les mesures. De plus, malgré l'utilisation d'un échantillon concentré, les signaux correspondant aux

LIs sont largement supérieurs aux signaux propres à la SAB et cela induit des difficultés de soustractions de la contribution du LI s'ajoutant aux problèmes de soustractions inhérents à la méthode de spectroscopie infrarouge (voir section I. 3. 3. B. 1; Dong A *et al.*, 1990). Les LIs seuls présentent une ligne de base croissante entre 1700 et 2000 cm^{-1}, qui peut être due à une mauvaise soustraction de la contribution du milieu, à savoir le D_2O. Les LIs peuvent éventuellement interagir avec l'eau (ou le D_2O) et former de microstructures ou nanodomaines (Lopes JNAC et Padua AAH, 2006), rendant d'autant plus compliqué la soustraction de la contribution du milieu. Au cours de ces travaux, aucun spectre de protéine en présence de LI n'a put être correctement soustrait de la contribution du LI en raison de leur forte absorption.

En présence de [MMIm][Me_2PO_4], la méthode de spectroscopie infrarouge n'est donc pas adaptée pour l'évaluation de la structure protéique en raison de l'impossibilité de soustraire la contribution du LI et par conséquent d'obtenir des spectres exploitables. L'analyse structurale en LI a donc été réalisée par d'autres méthodes spectroscopiques.

III. 1. 2. Analyse de la structure protéique en LI par dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire de la FDH ont été mesurés en présence ou en absence de différentes concentrations de [MMIm][Me_2PO_4] (figure 7). En absence de LI, le spectre de la FDH est caractéristique d'une protéine structurée. La présence de 10% (v/v) de LI dans la solution suffit pour complètement abolir le signal (figure 7a). La dénaturation d'une protéine conduit également à la perte de son signal en dichroïsme circulaire et une interprétation hâtive pourrait laisser croire que c'est ici le cas. Cependant, les courbes de saturation du détecteur montrent qu'en présence de 10% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4], le détecteur est saturé entre 180 et 250 nm (figure 7b). Lorsque la valeur de HT ("High Tension") est supérieure à 600 volts, le détecteur est considéré comme saturé et les spectres ne sont plus interprétables, ce qui est le cas dans ces expériences (Kelly SM *et al.*, 2005). La saturation du détecteur est très probablement liée au noyau imidazolium. Il a par ailleurs été démontré que la présence de 150 mM d'imidazole dans un tampon ou un solvant est inappropiée aux mesures de dichroïsme circulaire et conduit à l'obtention de spectres inexploitables (Kelly SM *et al.*, 2005). Or, en présence de 10 % (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4], la concentration d'imidazolium est de 567 mM.

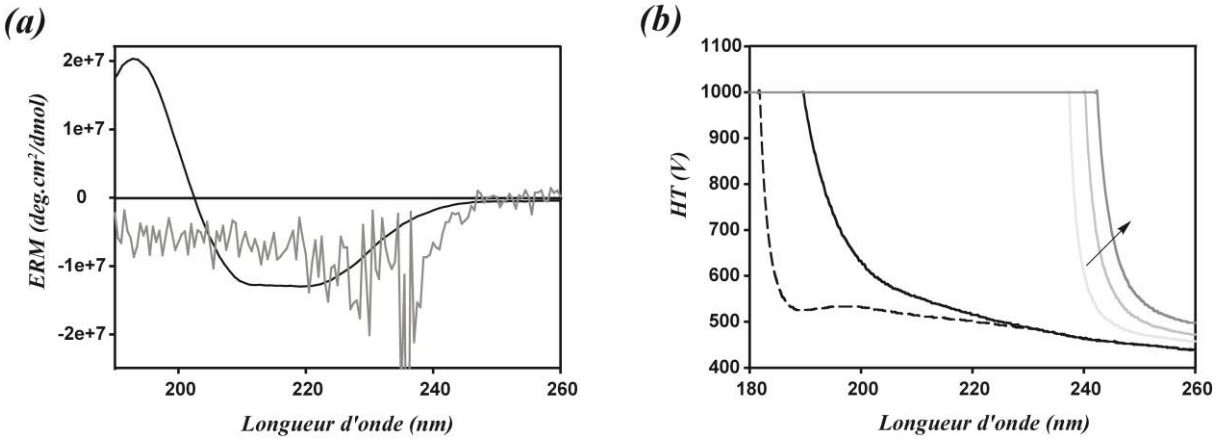


Figure 7 : Spectres de dichroïsme circulaire de la FDH en présence de [MMIm][Me_2PO_4] entre 180 et 260 nm. (a) Le spectre DC de la FDH (1,5 µM) a été mesuré dans le tampon carbonate 25 mM pH 9,7 (noir) ou en présence de 10% (v/v) de LI (gris). (b) Les courbes de tension du détecteur ("HT : High Tension Voltage") sont reportées pour l'eau (pointillé), pour le tampon carbonate 25 mM pH 9,7 (noir) ou pour 10, 20 ou 30% (v/v) de LI (de gris clair à gris foncé). Une flèche indique la variation du spectre de tension lorsque la concentration de LI est augmentée.

Le dichroïsme circulaire n'est donc pas une méthode adaptée à l'étude de la structure protéique en présence de LIs à base de noyaux imidazolium. La possibilité d'utiliser la spectroscopie de fluorescence afin d'analyser la structure protéique en LI à donc été envisagée.

III. 1. 3. Analyse de la structure de la FDH en LI par spectroscopie de fluorescence

L'état structural de la FDH en présence de trois LIs différents à base d'imidazolium a été analysé par spectroscopie de fluorescence afin de déterminer dans quelle mesure cette méthode peut être utilisée et quelles en sont les limites. Les trois LIs sont : le [MMIm][Me_2PO_4] (ou **LI-1**), le [BMIm][CH_3COO] (ou **LI-2**) et le [MMIm][$CH_3HPO_2(OCH_3)$] (ou **LI-3**) (schéma 51).

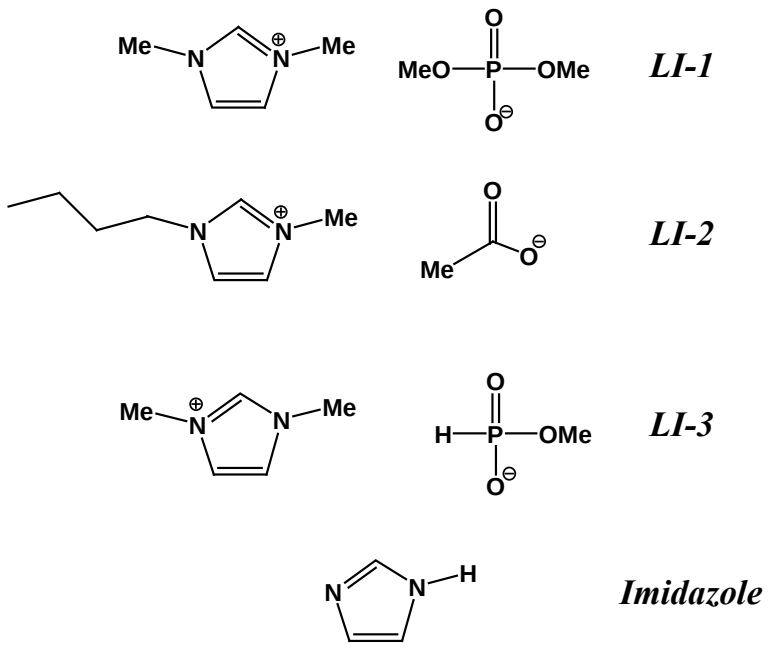


*Schéma 51 : Structure des LIs étudiés. [MMIm][Me_2PO_4] (**LI-1**), [BMIm][CH_3COO] (**LI-2**) et [MMIm][$CH_3HPO_2(OCH_3)$] (**LI-3**)*

III. 1. 3. A. Théorie et considérations générales

Lorsqu'une protéine est irradiée par un faisceau lumineux de longueur d'onde de 280 nm elle réémet une lumière entre 300 et 350 nm. La dénaturation d'une protéine (même partielle) augmente l'accessibilité des fluorophores au solvant et par conséquent l'interaction des résidus tryptophanes avec le milieu. De plus, le dépliement de la structure protéique conduit le noyau indole à interagir avec les chaînes latérales des autres acides aminés de la protéine (Reshetnyak YK *et al.*, 2001; Cowgill RW, 1970). Les deux phénomènes induisent la diminution de l'intensité de la fluorescence de la protéine, parfois accompagnée d'un décalage du pic d'émission vers le rouge. Ces variations du spectre de fluorescence sont la signature de la dénaturation protéique.

En présence de LIs, différents paramètres peuvent intervenir et conduire à la diminution de l'intensité de fluorescence observée pour un résidu de tryptophane seul ou au sein d'une protéine (schéma 52).

Dans le cas le plus simple (schéma 52, voie a), la diminution de l'intensité de fluorescence en présence de LIs peut être due à l'absorption de la radiation d'excitation et de la lumière émise

(effet de filtre interne) par le LI. L'atténuation ou la diminution de l'intensité de la lumière émise peut alors être décrite selon la loi de Beer-Lambert en considérant l'absorption de la radiation d'excitation (équation 15) et de la radiation émise (équation 16) par les LIs et cela en fonction de l'émission de fluorescence de la protéine elle-même (équation 17) (Heinemann M *et al.*, 2002).

$$I_{ex,f} = I^0_{ex} \cdot e^{-l \cdot \varepsilon_{280nm}} \qquad (15)$$

$$F_{em,f} = F^0_{em} \cdot e^{-l \cdot \varepsilon_{335nm}} \qquad (16)$$

$$\log (F_{em,f}/I^0_{ex}) = - C_{LI} \cdot l \cdot (\varepsilon_{280nm} + \varepsilon_{335nm}) \qquad (17)$$

Où I^0_{ex} est l'intensité de la radiation incidente d'origine, $I_{ex,f}$ l'intensité de la radiation incidente filtrée par le LI et participant à l'excitation du fluorophore, F^0_{em} est l'intensité d'origine de la radiation émise par le fluorophore, $F^0_{em,f}$ est l'intensité de fluorescence observée (filtrée), l est la longueur du trajet optique (cm), ε est le coefficient d'extinction molaire du LI aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($M^{-1}.cm^{-1}$) et C_{LI} est la concentration du LI (M). Une relation linéaire entre log ($F_{em,f}/I_{ex}^0$) et C_{LI} signifie que la diminution de fluorescence est seulement dûe à l'absorption de la lumière par le LI et non à un phénomène de dénaturation protéique.

A concentration de LI constante, l'effet de filtre interne est constant autorisant l'étude par spectroscopie de fluorescence de l'état structural d'une protéine (native ou dépliée) par d'autres agents physiques (tels que la température).

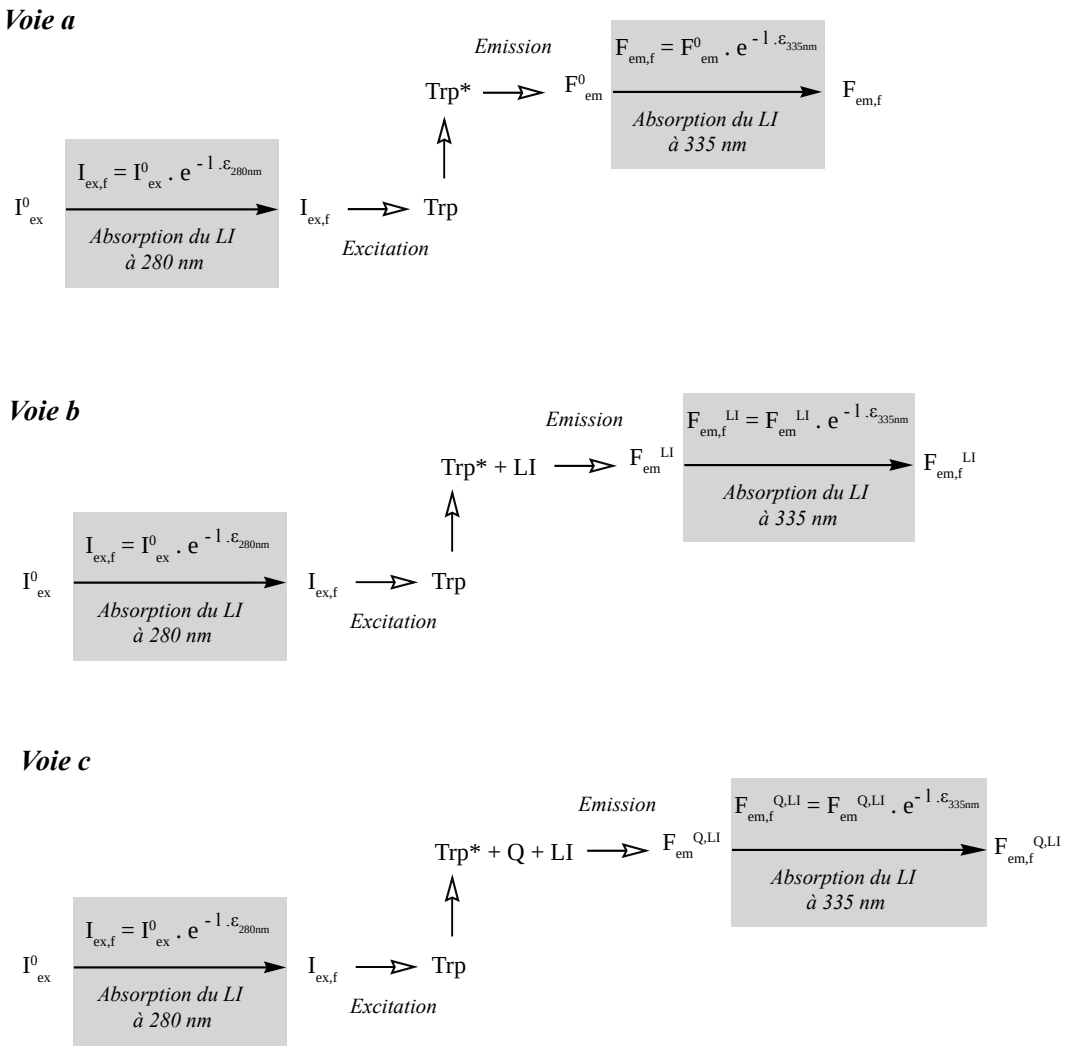


Schéma 52 : Représentation des différentes voies possiblement empruntées par les radiations incidentes et émises lors de l'étude de la fluorescence des tryptophanes (en solution ou en milieu structuré) en présence de LIs et/ou d'agents atténuateurs. I^0_{ex} est l'intensité de la lumière incidente de départ et $I_{ex,f}$ est l'intensité de la lumière incidente après absorption du LI, elle correspond a l'intensité de la radiation électromagnétique perçue par le fluorophore tryptophane (Trp). Trp est le tryptophane à l'état excité et Q est l'agent atténuateur (iode ou acrylamide). F^0_{em} est la fluorescence immédiate du fluorophore et $F_{em,f}$ est la fluorescence observée après absorption du LI d'une partie de la fluorescence immédiate (F^0_{em}). F_{em}^{LI} est la fluorescence immédiate du tryptophane en présence de LI fonctionnant tel que des agents atténuateurs et $F_{em,f}^{LI}$ est la fluorescence du tryptophane en présence de LI et après absorption du LI d'une partie de la fluorescence immédiate (F_{em}^{LI}). $F_{em}^{Q,LI}$ est la fluorescence immédiate du tryptophane en présence d'un agent atténuateur classique (Q) tel que l'acrylamide ou l'iode et $F_{em,f}^{Q,LI}$ est la fluorescence immédiate ($F_{em}^{Q,LI}$) après absorption du LI.*

L'interprétation des expériences d'atténuation de fluorescence est différente selon l'exposition des fluorophores de la protéine au solvant (voir section I. 3. 3. D. 3. a. 2.). D'après le modèle le plus simple, les agents atténuateurs (Q) affectent la fluorescence de tous les fluorophores de la protéine. Par conséquent, les résultats peuvent être traités par la relation de Stern-Volmer

(équation 8) qui, selon la nomenclature utilisée ci-dessus et considérant les effets de filtre interne, peut s'écrire (schéma 52, équation 18) :

$$\frac{F^{0}_{em,f}{}^{Q}}{F_{em,f}{}^{Q}} = 1 + K_{SV}{}^{Q}\,[Q] \qquad (18)$$

Où $F^{0}_{em,f}{}^{Q}$ est l'intensité de fluorescence filtrée en absence d'agent atténuateur (équivalente à $F_{em,f}$, schéma 52, voie a), $F_{em,f}{}^{Q}$ est l'intensité de fluorescence en présence d'agent atténuateur, $K_{SV}{}^{Q}$ est la constante de Stern-Volmer et [Q] la concentration d'agent atténuateur.

Lorsque les agents atténuateurs n'affectent qu'une fraction des fluorophores, l'autre fraction étant enfouie au sein de la structure protéique, les expériences d'atténuation de fluorescence peuvent être analysées par l'intermédiaire de la relation de Lehrer (équation 19) (Lehrer SS, 1971). Où α est la fraction de fluorophore sensible à l'agent atténuateur, supérieure à 0 et inférieure ou égale à 1.

$$\frac{F^{0}_{em,f}{}^{Q}}{(F^{0}_{em,f}{}^{Q} + F_{em,f}{}^{Q})} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha \,.\, K_{SV} \,.\, [Q]} \qquad (19)$$

Les LIs peuvent agir comme des agents atténuateurs collisionnels (schéma 52, voie b) réduisant ainsi la fluoresence de la protéine en interagissant avec les résidus de tryptophane excités. Il est par conséquent important de distinguer la constante de Stern-Volmer ($K_{SV}{}^{Q}$) décrivant l'atténuation de fluorescence par un agent atténuateur classique (tel que l'iode ou l'acrylamide) de la constante de Stern-Volmer ($K_{SV}{}^{LI}$) décrivant l'atténuation de fluorescence par un LI. Ainsi, l'atténuation de la fluorescence d'une protéine en présence de concentrations croissantes de LIs pourraient ne pas être directement reliée à la dénaturation de cette dernière mais simplement à un phénomène d'atténuation collisionel. Le $K_{SV}{}^{LI}$ seul ne permet pas de déterminer si une enzyme est dénaturée ou non en présence d'un LI donné. Dans ce cas, l'étude de la conformation d'une enzyme en présence de LIs ne peut donc pas être simplement liée à l'observation de sa fluorescence intrinsèque.

A une concentration fixe de LI, l'utilisation d'un second agent atténuateur, tel que l'iode ou l'acrylamide, permet la détermination du K_{SV}^{Q}; une valeur représentative de l'accessibilité des tryptophanes à l'agent atténuateur ce qui reflète l'état structural de la protéine (schéma 52, voie c). L'existence de deux agents atténuateurs dans le milieu suppose que l'un peut atténuer la fluorescence de l'autre. L'atténuation de la fluorescence de l'iode ou de l'acrylamide par les LIs n'est pas envisageable dans la mesure où ces molécules ne réémettent pas de fluorescence après avoir été excitées à 340 nm.

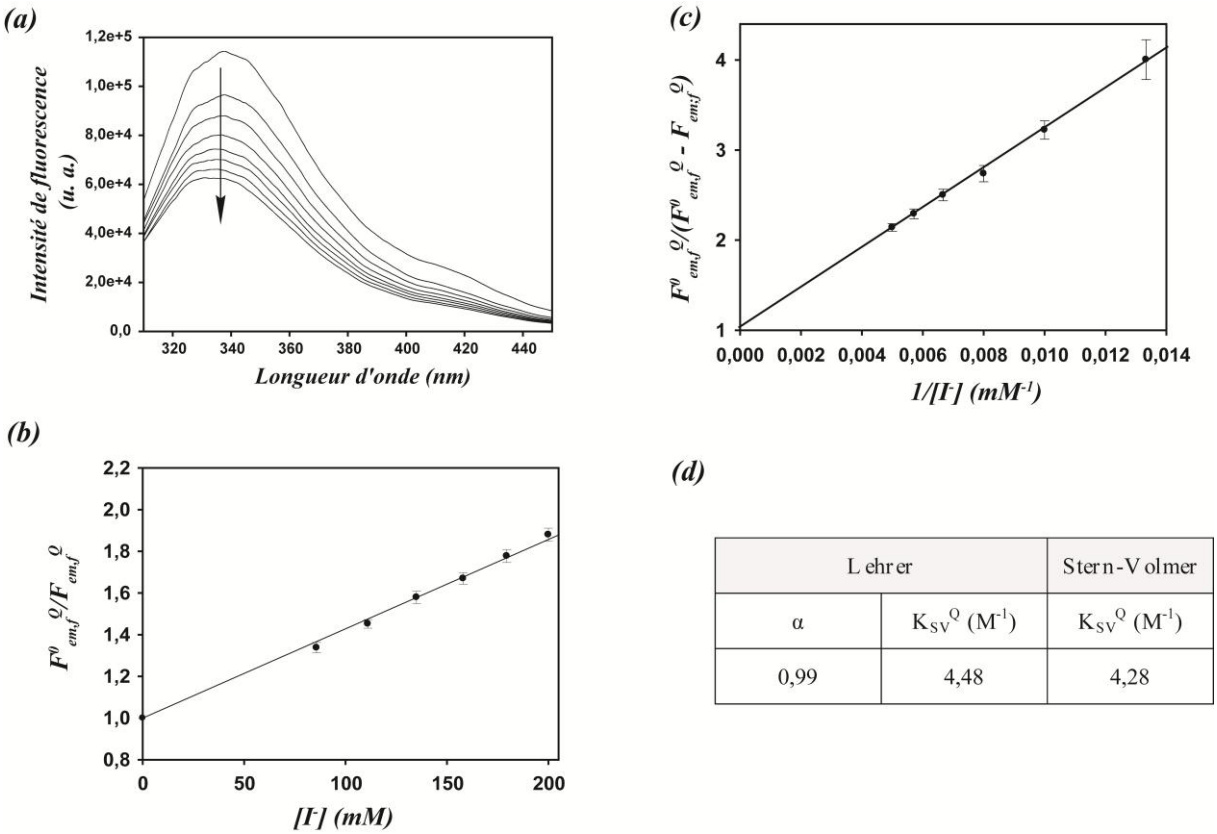
La constante de Stern-Volmer K_{SV} dépend de la durée de vie de l'état excité du fluorophore (τ_0) et de la constante cinétique de collision (k_q) qui dépend elle-même de la viscosité du milieu (η) (Matyus L *et al.*, 2006). La durée de vie du fluorophore (τ_0) devrait être déterminée en absence d'agent atténuateur. Cependant, les LIs agissent potentiellement tel que des agents atténuateurs et leur influence sur le temps de vie est implicite : le temps de vie du fluorophore augmente probablement avec la concentration de LI. Si l'on considère la viscosité du milieu, cette dernière augmente en raison de l'augmentation de la concentration de LI. Par conséquent, la valeur du $K_{SV}^{Q,LI}$ devrait diminuer si la protéine n'est pas dénaturée. Il en résulte que l'observation d'une augmentation de la valeur du $K_{SV}^{Q,LI}$ en présence de LI est nécessairement liée à l'exposition des résidus de tryptophanes au solvant ce qui est représentatif de la dénaturation protéique.

III. 1. 3. B. Détermination de l'outil d'analyse approprié à l'atténuation de la fluorescence de la FDH

La détermination de l'outil d'analyse de l'atténuation de la fluorescence dépend de l'exposition des fluorophores au solvant. Afin d'explorer le taux d'exposition des fluorophores de la FDH, la fluorescence de la FDH a été atténuée par l'iode, un agent atténuateur dynamique qui ne va atténuer que la fluorescence des fluorophores situés en surface ou à la proximité de la surface de l'enzyme (figure 8a). Les deux modèles, de Stern-Vomer ou de Lehrer, ont été utilisés pour interpréter les résultats.

Selon la relation de Lehrer (équation 5), la fraction de fluorophore accessible à l'iode (α) est approximativement de 1 (figure 8c et 8d). Cette valeur correspond à une population unique de fluorophore qui n'est pas profondément enfouie au sein la structure tridimensionnelle de la FDH. Les constantes d'atténuation de fluorescence de la FDH par l'iode (K_{SV}^{Q}) calculées selon

la relation de Lehrer ou de Stern-Volmer sont similaires (figure 8d). Le K_{SV}^{Q} observé est une moyenne des K_{SV}^{Q} des cinq résidus de tryptophanes présents au sein de la FDH dont les propriétés de fluorescence sont similaires mais pas strictement identiques. Les expériences d'atténuation de fluorescence de la FDH seront donc analysées à travers la relation de Stern-Volmer (équation 18) car le modèle de Lehrer est utilisé pour l'étude de populations hétérogènes de fluorophore.



Lehrer		Stern-Volmer
α	K_{SV}^{Q} (M^{-1})	K_{SV}^{Q} (M^{-1})
0,99	4,48	4,28

Figure 8 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par l'iode. Les spectres de fluorescence de la FDH ont été mesurés entre 310 et 450 nm en présence de 0-200 mM d'iodure de sodium (a). Les variations du spectre en présence de concentrations croissantes d'iode sont indiquées par une flèche. Les résultats sont analysés par la représentation de Stern-Volmer (b) ou de Lehrer (c). Les valeurs de K_{SV}^{Q} et de α obtenues sont reportés dans le tableau d.

III. 1. 3. C. Fluorescence de la FDH en présence de LIs

Les spectres de fluorescence de la FDH (2,61 µM) sont mesurés en présence de 0-70 % (v/v) de **LI-1**, **-2** et **-3**; les spectres de fluorescence des LIs seuls aux mêmes concentrations sont également enregistrés (encarts de la figure 9 a-c).

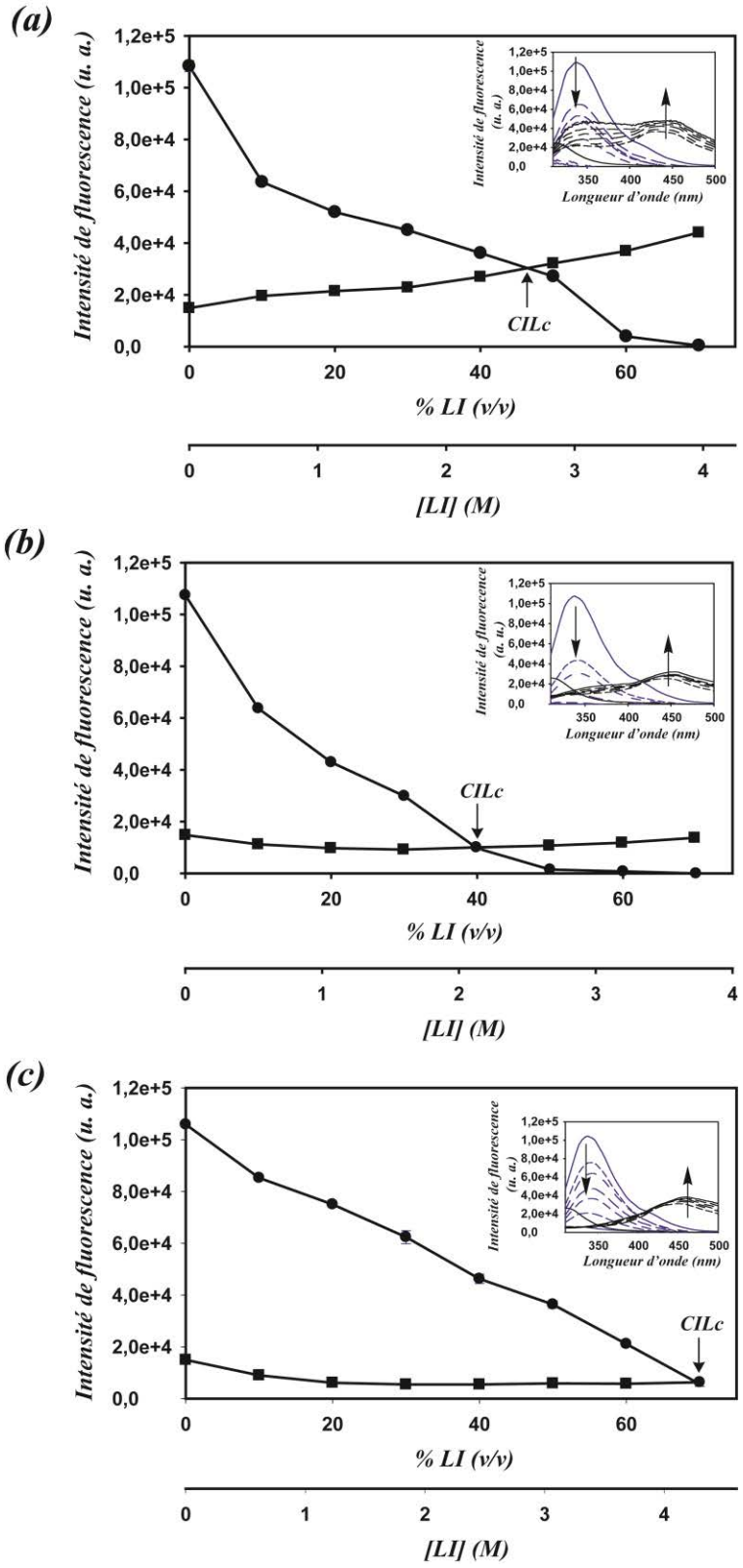


Figure 9 : Evolution de la fluorescence intrinsèque de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 (●) et du liquide ionique (■) à 335 nm après excitation à 280 nm en fonction de concentrations croissantes de LIs : (a) ***LI-1****, (b)* ***LI-2*** *et (c)* ***LI-3****. Les spectres de fluorescence d'origine de la FDH corrigés par la contribution du LI (en bleu) et des LIs seuls (en pointillés noirs) sont reportés dans des encarts. Les flèches indiquent l'évolution du spectre de fluorescence à concentration de LI croissante.*

Malgré la forte absorption des LIs dans la région UV (figure 10), la fluorescence intrinsèque de la FDH est clairement visible en dessous de 47 % (v/v) de **LI-1**, de 40 % (v/v) de **LI-2** et de 70 % (v/v) de **LI-3**. Au dessus de ces concentrations, l'intensité de fluorescence propre à la FDH est inférieure à celle du LI seul (figure 9 a-c).

Par conséquent, une concentration critique de LI ("CILc : Critical Ionic Liquid concentration") est définie dans un premier temps. Cette dernière correspond à la concentration maximale de LIs où la fluorescence d'une protéine peut être obtenue. Ce paramètre dépend de la nature du LI, de la présence d'impuretés dans ce dernier, de la concentration de protéine dans l'essai et devrait être déterminé pour chaque couple enzyme/LI. Les études de fluorescence ici présentées ont toutes été réalisées à des concentrations de LIs strictement inférieures à la CILc.

III. 1. 3. D. Propriétés d'absorption des LIs

Les spectres UV-Vis de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS (pH 7,2) ont été mesurés en présence de différentes concentrations de LIs (figure 10) afin de déterminer si la diminution de fluorescence des protéines en présence de LIs est seulement dûe à l'absorption de la lumière par ces milieux (équation 17, figure 10, schéma 52 voie a).

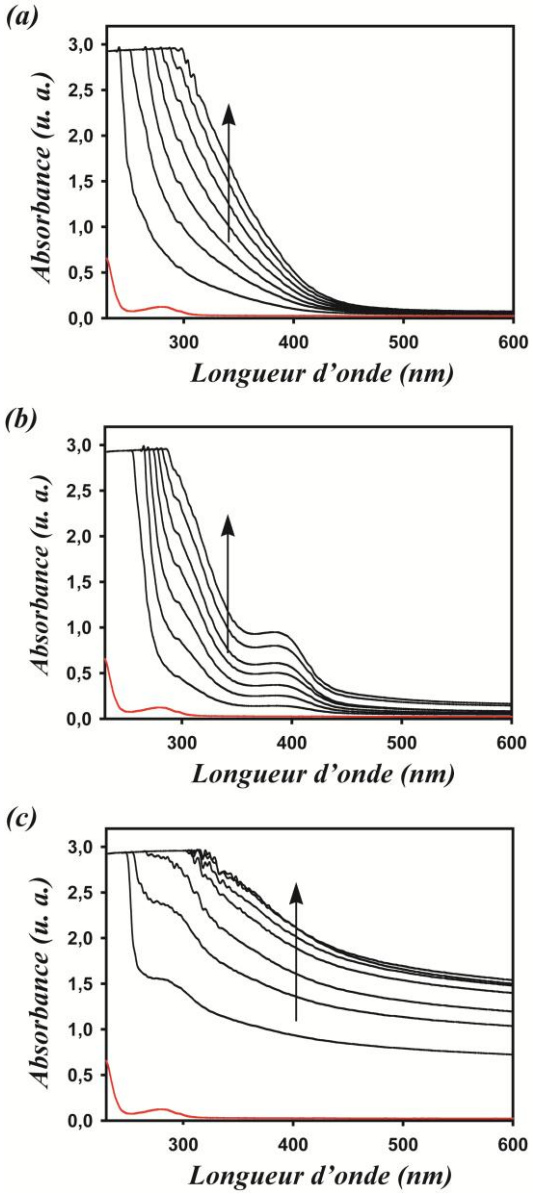


Figure 10 : Spectres d'absorption UV-Vis de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 en présence de 0 à 70% (v/v) de LIs. Le spectre de la FDH dans du tampon PBS pH 7,2 est en rouge et les spectres en présence de LIs sont en noir. (a), (b) et (c) sont respectivement les spectres mesurés en présence de concentrations croissantes de ***LI-1****,* ***LI-2*** *ou* ***LI-3****. Les flèches indiquent les variations du spectre à concentration de LI croissante.*

Les trois LIs absorbent fortement dans la région UV entre 230 et 400 nm. En absence de LIs, la FDH présente un pic d'absorption à 280 nm. Le pic d'absorption de la FDH n'est plus visible en présence de LIs et cela même à 10 % (v/v). Le coefficient d'extinction molaire des LIs à 280 nm est de 2,03 $M^{-1}.cm^{-1}$, 2,04 $M^{-1}.cm^{-1}$ et de 2,95 $M^{-1}.cm^{-1}$ respectivement pour le **LI-1**, le **LI-2** et le **LI-3**. Les coefficients d'extinction molaire à 335 nm sont de 0,92 M^{-1} cm^{-1}, 0,63 M^{-1} cm^{-1} et de 2,2 M^{-1} cm^{-1} respectivement pour le **LI-1**, le **LI-2** et le **LI-3** (tableau 12). Par conséquent, les LIs aborbent, une partie de l'intensité de la radiation excitant les fluorophores de la FDH à

280 nm et une partie de la fluorescence émise à 335 nm (tableau 12). Autrement dit, si aucune correction n'est appliquée, un spectre de fluorescence en LI ne peut être comparé qu'à un autre spectre de fluorescence mesuré à la même concentration de LI.

LIs	$\varepsilon^{280\ nm}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	$\varepsilon^{335\ nm}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	$\varepsilon^{560\ nm}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)
LI-1	2,03	0,92	0,02
LI-2	2,04	0,63	0,04
LI-3	2,95	2,2	1,27

Tableau 12 : Coefficients d'absorption molaire des trois LIs utilisés au cours de cette étude à 280 nm, 335 nm et 560 nm qui est la longueur d'onde d'absorption du formazan afin d'évaluer l'absorption des LIs dans cette région du spectre.

Le lien entre la fluorescence émise et l'absorption de la lumière par les LIs (schéma 52 voie a) est évaluée par l'intermédiaire de l'équation 3 (figure 11). Cette équation n'est pas strictement vérifiée dans le cas des trois LIs utilisés ($R^2 < 0,95$) (figure 11). De plus, dans le cas où l'équation 17 est validée, la pente observée devrait être égale à "l . ($\varepsilon_{280nm} + \varepsilon_{335nm}$)" et devrait suivre cet ordre : **LI-3** > **LI-1** > **LI-2** (tableau 12). Or, ce n'est pas le cas, l'ordre des pentes est **LI-2** > **LI-3** > **LI-1** (figure 11). Par conséquent, la diminution de fluorescence de la FDH en présence de LI n'est pas seulement due à l'absorption de la lumière par les LIs.

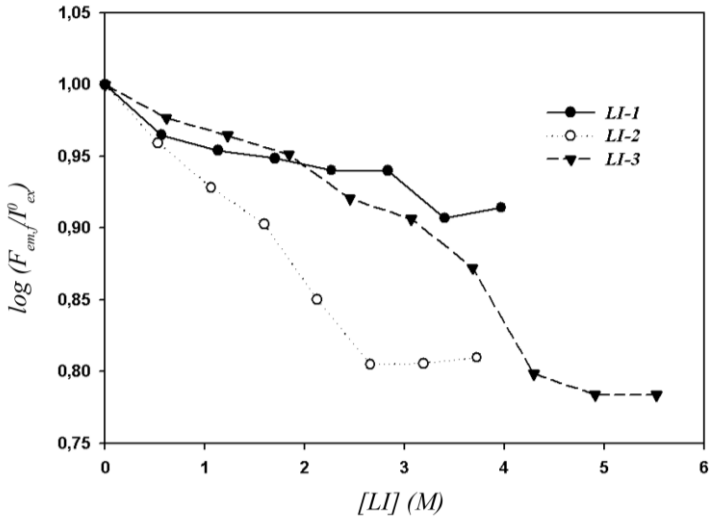


Figure 11 : Intensité de fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 à 335 nm en présence de concentrations croissantes de LIs représentée selon l'équation 3. I^0_{ex} est l'intensité de la radiation incidente d'origine et $F^0_{em,f}$ est l'intensité de fluorescence observée (filtrée).

III. 1. 3. E. Propriétés d'atténuation des LIs

Dans un premier temps, les propriétés d'atténuation des **LIs 1-3** et de l'imidazole ont été évaluées sur une solution de tryptophane; modèle des résidus de tryptophanes des protéines totalement exposés au solvant (schéma 52, voie b). La diminution de l'intensité de fluorescence en raison de l'absorption de la lumière (effet de filtre interne) est évaluée selon l'équation 17. Les **LIs 1-3** atténuent fortement la fluorescence des tryptophanes en solution, ce qui n'est pas le cas de l'imidazole (figure 12). L'équation 17 n'est pas vérifiée pour la diminution de l'intensité de fluorescence des tryptophanes en solution en présence de LIs; autrement dit, les variations d'intensités de fluoresence ne sont pas seulement dues à des phénomènes d'absorbtion mais également à des capacités d'atténuation propres aux LIs (figure 12). En revanche, la diminution de fluorescence de la solution de tryptophane en présence d'imidazole est principalement due à un effet de filtre interne et l'équation 17 est vérifiée dans ce cas précis (figure 12).

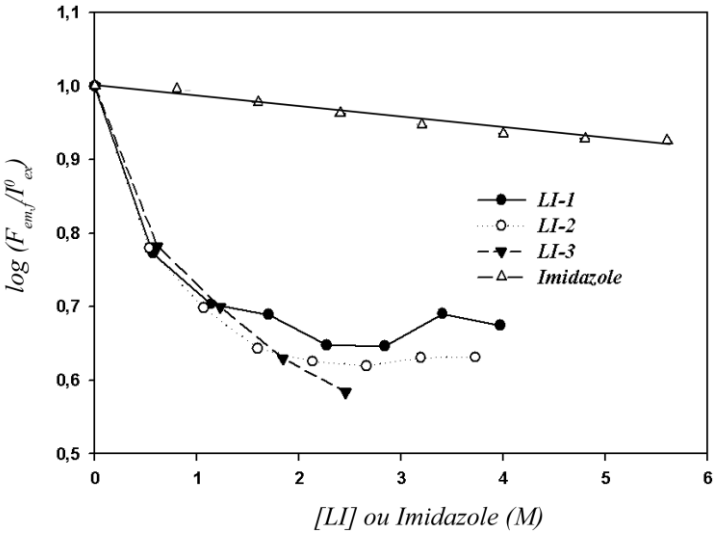


Figure 12 : Intensité de la lumière émise par une solution de tryptophane 50 µM dans du tampon PBS pH 7,2 en présence de concentrations croissantes de LIs ou d'imidazole. I^0_{ex} est l'intensité de la radiation incidente d'origine et $F^0_{em,f}$ est l'intensité de fluorescence observée (filtrée).

Les LIs sont, par conséquent, de forts agents atténuateurs, les K_{SV}^{LI} calculés pour l'atténuation de la fluorescence de la solution de tryptophane sont de 30 M^{-1}, 35 M^{-1} et 41 M^{-1} pour **LI-1**, **LI-2** et **LI-3** respectivement (tableau 13). Leur capacité à atténuer la fluorescence est supposée être due à l'interaction des tryptophanes avec le noyau imidazolium des LIs (Zhao H *et al.*, 2009).

L'imidazole, quand à lui, se révèle être un faible agent atténuateur, le K_{SV}^{LI} correspondant à l'atténuation de fluorescence de la solution de tryptophane est de 0,25 M^{-1}, ce qui est en accord avec les données de la littérature qui trouvent une valeur de 0,4 M^{-1} pour constante d'atténuation collisionnelle de la fluorescence du tryptophane par l'imidazole (Willaert K et Engelborghs Y, 1991).

Ces résultats confirment le fait que la diminution de l'intensité de fluorescence d'une protéine, observée en présence de LIs, ne peut pas seulement être attribuée à la dénaturation protéique mais également à l'atténuation de la fluorescence des résidus de tryptophanes exposés aux LIs.

	FDH		**Tryptophane en solution**
	K_{SV}^{LI} (M^{-1}) < CILc	**K_{SV}^{LI} (M^{-1}) > CILc**	**K_{SV}^{LI} (M^{-1})**
LI-1	0,88	~ 176	30
LI-2	1,56	~ 119	35
LI-3	0,55	~ 91	41
Imidazole	0,59		0,25

Tableau 13 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) ou d'une solution de tryptophane (50 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par les LIs ou l'imidazole. Les K_{SV}^{LI} sont extraits de la représentation de Stern-Volmer de la figure 13.

Les représentations de Stern-Volmer correspondant à l'atténuation de la fluorescence de la FDH par les LIs ont une allure biphasique (figure 13). Cette particularité n'est pas observée lorsqu'un LI est utilisé afin d'atténuer la fluorescence de tryptophane en solution.

Dans la mesure où les résidus de tryptophanes sont localisés dans un environnement protéique, la première hypothèse pouvant expliquer l'aspect biphasique de la représentation de Stern-Volmer est que la FDH se déplie exposant ses tryptophanes aux LIs. Les tryptophanes exposés seraient sensibles à l'atténuation des LIs de la même manière que les tryptophanes en solution; ce qui conduirait à une augmentation de l'efficacité d'atténuation des LIs (Bose S *et al.*, 2010).

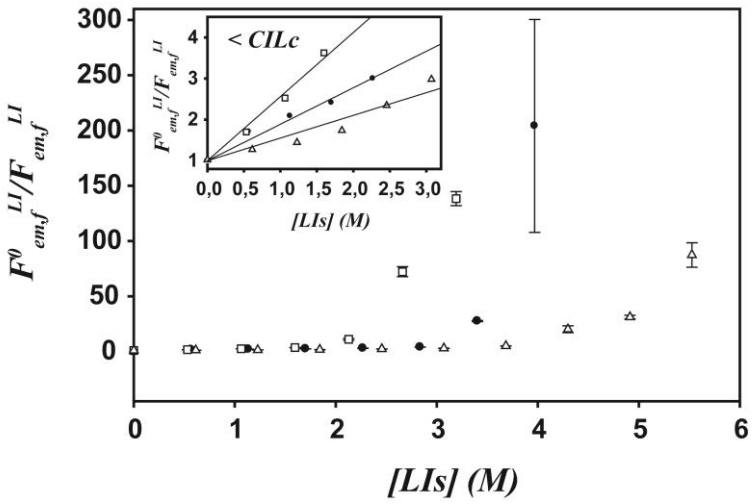


Figure 13 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par les LIs représentés selon la relation de Stern-Volmer. $F_{em,f}^{LI}$ et $F^{0}_{em,f}{}^{LI}$ sont les intensités de fluorescence avec ou sans LIs respectivement. Le rapport $F^{0}_{em,f}{}^{LI} / F_{em,f}^{LI}$ est reporté en fonction de la concentration de ***LI-1*** *(●),* ***LI-2*** *(□) ou* ***LI-3*** *(△). L'encart correspond à un agrandissement de la région sous la concentration critique de LI ("CILc : Critical Ionic Liquid concentration").*

En présence de faibles concentrations de LIs, le K_{SV}^{LI} calculé à partir de la représentation de Stern-Volmer est compris entre 0,5 et 1,6 M^{-1} , ce qui est inférieur aux K_{SV}^{LI} déterminés pour les tryptophanes en solution (tableau 13). Cela suppose qu'en présence de faibles concentrations de LIs, les résidus de tryptophanes de la FDH ne sont pas accessibles aux LIs et que la structure protéique n'est pas dénaturée.

En présence de fortes concentrations de LIs, un point d'inflexion est observé sur la courbe de Stern-Volmer (figure 13) résultant en une seconde phase où le K_{SV}^{LI} ne peut être qu'estimé et compris entre 91 M^{-1} et 176 M^{-1} (tableau 13). Ces valeurs de K_{SV}^{LI} sont supérieures à celles mesurées en présence de tryptophane en solution et pourraient correspondre à l'exposition des résidus de tryptophanes aux LIs; c'est-à-dire à la dénaturation totale de la FDH.

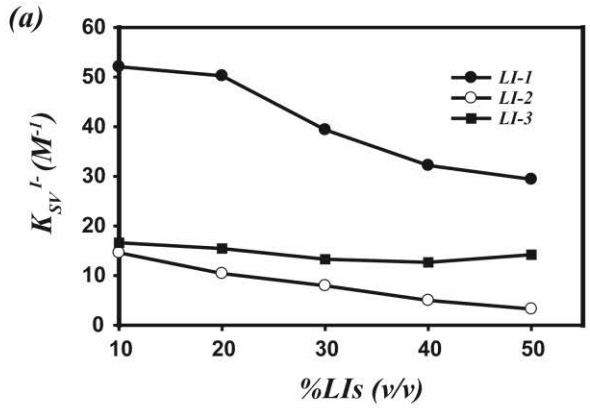
Fait intéressant, le point d'inflexion de la courbe de Stern-Volmer se situe à la CILc décrite auparavant; cela suppose qu'à des concentrations de LIs supérieures à la CILc, les K_{SV}^{LI} déterminés sont sujets à de fortes erreurs expérimentales en raison du faible signal de la protéine par rapport au signal du LI. De plus, il est difficile de certifier que la FDH est totalement dénaturée à une concentration de LI où les mesures de fluorescence ne sont plus fiables.

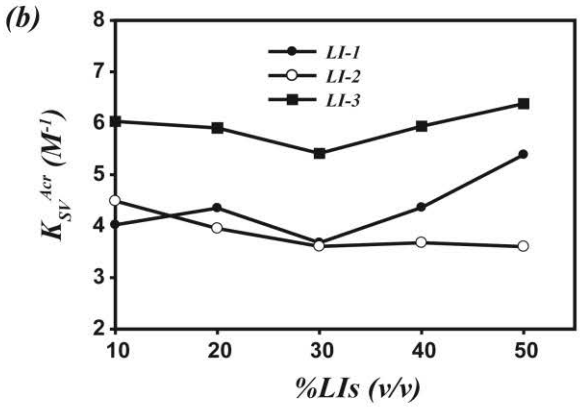
Par conséquent, malgré la soustraction de la contribution du milieu, les mesures de fluorescence intrinsèque des protéines ne sont exploitables que lorsque la concentration de LI dans l'essai est strictement inférieure à la CILc et cela démontre l'importance de la détermination de ce paramètre.

III. 1. 3. F. Atténuation de la fluorescence de la FDH par des agents atténuateurs dynamique et statique

Les mesures de fluorescence intrinsèque, et par conséquent de K_{SV}^{LI}, ne suffisant pas à expliquer l'influence des **LIs 1-3** sur la conformation de la FDH; des expériences d'atténuation de fluorescence de la FDH par l'iode ou l'acrylamide en présence de différentes concentrations de LIs ont été entreprises (schéma 52, voie c). Les deux grands types d'agents atténuateurs ont été utilisés afin d'explorer les deux processus généraux d'atténuation.

Dans un premier temps, l'effet des agents atténuateurs sur la fluorescence du milieu est analysé afin de déterminer la contribution de ce phénomène lors des expériences d'atténuation de fluorescence de protéines en LI (figure 14). La fluorescence de LIs est atténuée par l'iode ou l'acrylamide après excitation à 280 nm. Le K_{SV}^{Q} correspondant à l'atténuation des LIs par les agents atténuateurs ne peut être calculé à 335 nm en raison de la faible intensité de fluorescence de ces milieux à cette longueur d'onde. Les valeurs de K_{SV}^{Q} sont mesurées à 450 nm, une longueur d'onde correspondant approximativement à la longueur d'onde maximale de fluorescence des LIs (encarts de la figure 9). En présence d'acrylamide, les valeurs de K_{SV}^{Acr} sont relativement constantes entre 10 et 40% (v/v) de LIs, elles se situent entre 3,6 et 6,8 M^{-1} (figure 14b et 14c). L'ecart entre la valeur de K_{SV}^{Acr} calculée en présence de 10% et 40% (v/v) de LIs ne dépasse pas 1 M^{-1} pour les 3 LIs étudiés (figure 14c). En présence d'iode, les valeurs de K_{SV}^{I-} diminuent à mesure que la concentration de LI dans l'essai est augmentée (figure 14a). La valeur de K_{SV}^{I-} passe de 52,09 M^{-1} à 29,41 M^{-1} entre 10 et 40% (v/v) de **LI-1** (figure 14c). La diminution de la valeur de K_{SV}^{I-} s'explique par la nature de l'agent atténuateur utilisé. L'iode étant un agent atténuateur dynamique dont l'efficacité d'atténuation de la fluorescence dépend de sa capacité à interagir avec le fluorophore, ce dernier est plus sensible que l'acrylamide à l'augmentation de la viscosité du milieu (section III. 1. 3. A.) (Eftink MR et Hagaman KA, 1986). Ces expériences supposent que l'atténuation de la fluorescence des LIs par l'iode ou l'acrylamide est un phénomène qui n'affectera pas les expériences d'atténuation de fluorescence de la FDH à 335 nm en présence de ces agents atténuateurs.





(c)

	K_{SV}^{I-} (M^{-1})			K_{SV}^{Acr} (M^{-1})		
% IL (v/v)	**LI-1**	**LI-2**	**LI-3**	**LI-1**	**LI-2**	**LI-3**
10	52,09	14,06	16,62	4,02	4,49	6,03
20	50,26	10,43	15,45	4,35	3,95	5,91
30	39,39	7,96	13,3	3,68	3,60	5,41
40	32,20	5,01	12,68	4,36	3,68	5,94
50	29,41	3,28	14,21	5,39	3,60	6,38

*Figure 14 : Atténuation de la fluorescence des LI par l'iode (a) ou l'acrylamide (b). K_{SV}^{Acr} et K_{SV}^{I-} correspondent aux constantes d'atténuation de fluorescence calculées en présence d'acrylamide et d'iode respectivement. Les K_{SV}^{Q} sont extraits de la relation de Stern-Volmer, et reportés en fonction de la concentration de **LI-1** (●), **LI-2** (○) ou **LI-3** (■). Les valeurs numériques des K_{SV}^{Q} sont reportées dans un tableau (c).*

Afin d'évaluer l'état structural de la FDH en LI, la constante de Stern-Volmer, correspondant à l'atténuation de la fluorescence de la FDH par l'iode ou l'acrylamide, est déterminée en présence de différentes concentrations de LIs (figure 15).

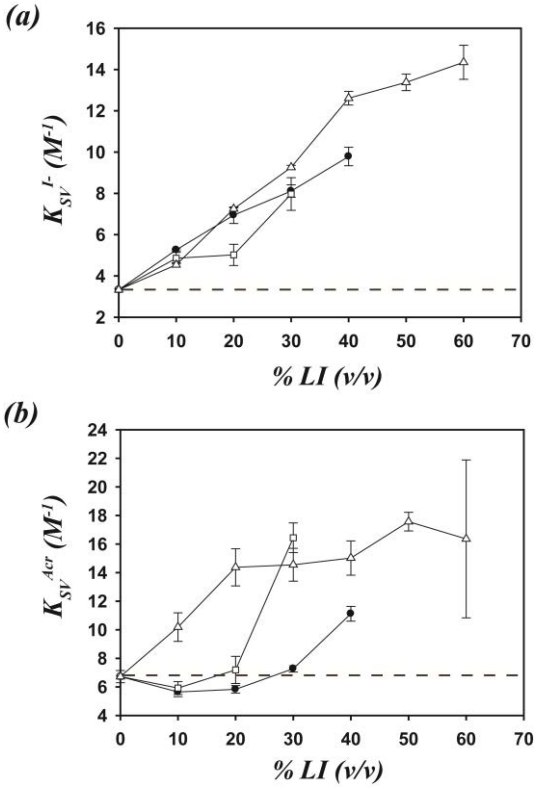


Figure 15 : Evolution du K_{SV}^{Q} obtenu à partir de la représentation de Stern-Volmer correspondant à l'atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par l'iode (a) ou l'acrylamide (b) en fonction de la concentration de ***LI-1*** *(●),* ***LI-2*** *(□) ou de* ***LI-3*** *(△).*

Les valeurs de K_{SV}^{Q} calculées pour l'atténuation de la fluorescence de la FDH par l'iode ou l'acrylamide sont de l'ordre du M^{-1} voir de la dizaine de M^{-1} (figure 15), ces dernières sont supérieures aux valeurs de K_{SV}^{LI} obtenus en présence de concentrations de LIs inférieures à la CILc (tableau 13). Autrement dit, en dessous de la CILc, les agents atténuateurs classiques tels que l'acrylamide et notamment l'iode sont plus efficaces que les LIs (figure 15, tableau 13).

Lorsque la fluorescence de la FDH est atténuée par l'iode, la valeur de K_{SV}^{I-} augmente avec la concentration de LIs (figure 15a). Au regard de l'augmentation de la viscosité du milieu avec la concentration de LI, ces valeurs de K_{SV}^{I-} observées en présence de LIs sont sous-estimées. L'augmentation de la valeur de K_{SV}^{I-} correspond à une plus grande efficacité d'atténuation de la fluorescence de la FDH par l'iode lorsque la concentration de LI dans l'essai est augmentée. Au niveau protéique, cela signifie que les résidus tryptophanyles sont plus exposés au solvant, un

phénomène lié au dépliement de l'enzyme. La valeur de K_{SV}^{I-} est multipliée par 2,96; 2,41 et 4,35 fois en présence de 40 % (v/v) de **LI-1**, de 30 % (v/v) de **LI-2** et de 60 % (v/v) de **LI-3** respectivement (figure 15a). La variation du K_{SV}^{I-} est nécessairement due à des variations structurales de la FDH car la fluorescence du LI seul à 335 nm est faible (inserts de la figure 9) et que son atténuation par l'iode à 450 nm n'augmente pas en fonction de la concentration de LI (figure 14 a et c). L'iode est un agent atténuateur dynamique sensible aux fluctuations de la conformation de l'enzyme en solution et par conséquent aux légères variations structurales (Somogyi B et Lakos Z, 1993).

Les résidus de tryptophanes de la FDH sont principalement localisés à l'interface du dimère (W150, W284, W295) ou à proximité de la surface (W33, W252) (figure 16). L'exposition des tryptophanyles au solvant à concentrations croissantes de LIs peut être la conséquence de la dissociation du dimère ou de l'augmentation des fluctuations de la structure protéique et notamment des régions situées à la périphérie de l'enzyme.

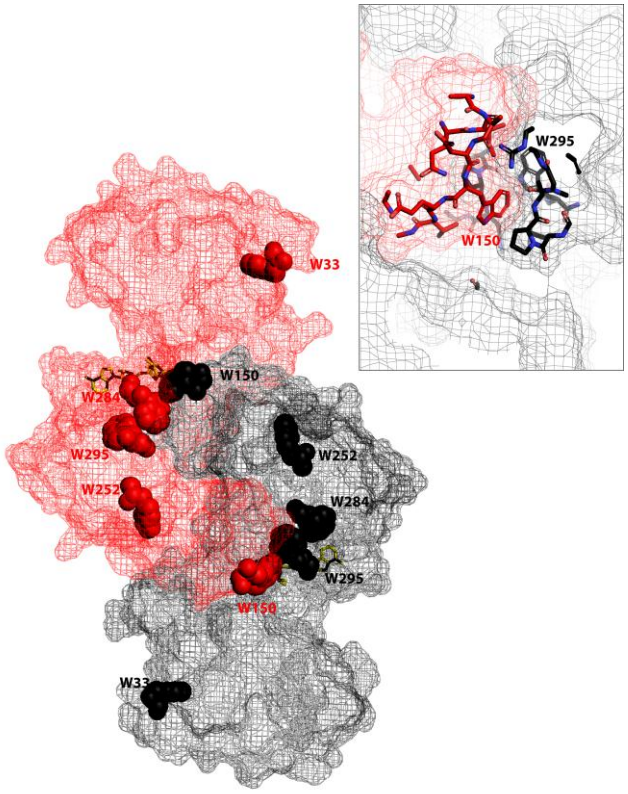


Figure 16 : Structure tridimensionnelle de la FDH de Candida boidinii. Structure des chaînes A et D, du crystal tétramérique l'enzyme (entrée pdb 2 fss), représentée sous forme de mailles rouges et noires. Les tryptophanyles (rouges et noirs) sont représentés sous forme de sphères. Le NADH est représenté sous forme de bâtons jaunes. Un agrandissement de l'interface entre les deux sous unités est inséré : les acides aminés représentés sous forme de bâtons sont localisés au sein d'une sphère de 8 angstroms de rayon autour du résidu tryptophane 150 (W150).

Lorsque la fluorescence de la FDH est atténuée par l'acrylamide, l'évolution du K_{SV}^{Acr} en fonction de la concentration de LI diffère pour les trois LIs et de l'atténuation par l'iode (figure 15b). Les valeurs de K_{SV}^{Acr} diminuent légèrement en dessous de 30 % (v/v) de **LI-1** et de 20 % (v/v) de **LI-2**. Cette diminution peut être attribuée à une conformation plus compacte réduisant la pénétration de l'acrylamide au sein de la structure de la FDH ou plus probablement à l'influence de la viscosité du milieu sur la valeur de K_{SV}^{Acr}. Au dessus de ces deux concentrations de LI, le K_{SV}^{Acr} augmente fortement d'un facteur de 1,65 et de 2,44 respectivement pour le **LI-1** et le **LI-2** à la CILc. L'augmentation du K_{SV}^{Acr} correspondrait à la dénaturation partielle de la protéine, autorisant ainsi l'acrylamide à pénétrer au sein de la structure protéique et à former un complexe avec les résidus de tryptophanes accessibles. L'augmentation du K_{SV}^{Acr} est corrélée à l'inactivation de la FDH au dessus de 20 % (v/v) de **LI-2** et au début de la diminution d'activité de la FDH à partir de 30 % (v/v) de LI-1 (figure 18).

En présence de **LI-3**, la valeur de K_{SV}^{Acr} est multipliée par un facteur de 2,14 à 20 % (v/v) de LI et reste constante au dessus de cette concentration; ce qui signifie que l'efficacité maximale d'atténuation de fluorescence de la FDH par l'acrylamide est atteinte à 20 % (v/v) de **LI-3**. Au niveau protéique, au dessus de 20 % (v/v) de **LI-3**, la conformation de la FDH serait suffisamment dépliée pour autoriser l'accès de l'acrylamide à tous les résidus de tryptophane.

Les différences observées entre l'atténuation à l'iode et à l'acrylamide s'expliquent par la nature de l'agent atténuateur. L'iode atténue la fluorescence des résidus de tryptophanes exposés au solvant et l'efficacité d'atténuation est liée aux fluctuations de la conformation de l'enzyme; plus la structure protéique est lâche et flexible et plus l'atténuation sera importante. A 3,69 M de **LI-3**, la valeur de K_{SV}^{I-} correspondant à l'atténuation de la fluorescence de la FDH augmente d'un facteur de 4,35 par rapport à la valeur de K_{SV}^{I-} calculée en absence de LI. Par comparaison, la valeur de K_{SV}^{I-} calculée en présence de 4,16 M d'urée augmente de 2,36 fois (figure 17). Cela signifie que les LIs dénaturent la FDH de manière plus importante que l'urée, un agent dénaurant classique. En comparaison de cet agent dénaturant classique, la structure des protéines est plus relachée et flexible en présence de LI. Un phénomène très probablement lié au pouvoir de dissolution des LIs, capables d'établir des liaisons hydrophobes de part les chaînes alkyles associées au cation (imidazolium) et des liaisons hydrophyles de par les groupements hydroxyles de l'anion. Ces intéractions de différentes natures conduisent au depliement du biocatalyseur.

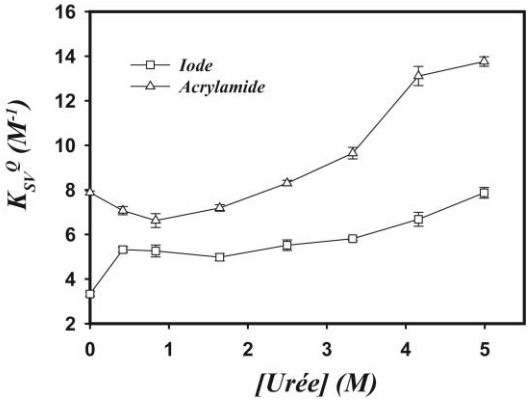


Figure 17 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par l'iode ou l'acrylamide en présence d'urée. Les K_{SV}^{Q} sont extraits de la relation de Stern-Volmer.

Lorsque la fluorescence de la FDH est atténuée par l'acrylamide, l'efficacité d'atténuation maximale est atteinte lorsque la FDH est suffisamment dépliée afin de permettre l'accès de l'agent atténuateur au niveau de tous les sites de fluorescence, ce qui ne correspond pas nécessairement à la dénaturation complète de la protéine. Cette valeur est atteinte au dessus de 20 % (v/v) de **LI-3** et à 30 % (v/v) de **LI-2** mais n'est pas atteinte pour le **LI-1** en raison de la faible CILc (figure 15b). Ces résulats suggèrent que l'acrylamide est un agent atténuateur statique qui atténue la fluorescence selon le modèle de pénétration (Somogyi B et Lakos Z, 1993) car l'efficacité d'atténuation maximale est atteinte lorsque l'acrylamide accède à tous les fluorophores (figure 15b). Par comparaison avec l'urée, la valeur maximale de K_{SV}^{Acr}, atteinte à 30 % (v/v) de **LI-2** ou **LI-3**, est 1,4 fois supérieure à la valeur K_{SV}^{Acr} mesurée en présence de 5 M d'urée. En présence de 5 M d'urée, l'atténuation maximale de la fluorescence de la FHD par l'acrylamide n'est pas atteinte. L'urée est donc moins dénaturant que les LIs.

III. 1. 3. G. Activité de la FDH en présence de différents LIs

L'activité de la FDH a été mesurée en présence de 0 à 70 % (v/v) de **LIs 1-3** afin de déterminer si un lien structure/activité peut être défini à partir des valeurs de K_{SV}^{Q}.

L'activité de la FDH est mesurée soit directement, par le suivi de l'apparition du NADH à 340 nm (figure 18a), soit indirectement par le suivi de l'apparition du diformazan à 560 nm (figure 18b) (voir section II. 2. 1. C.; schéma 47). L'allure générale des activités en fonction de la

concentration de LIs est similaire pour les deux méthodes. L'activité de la FDH commence à diminuer au dessus de 30 % (v/v) de **LI-1** et l'enzyme est totalement inactive à 70 % (v/v) de **LI-1**. L'activité enzymatique augmente légèrement entre 0 et 20 % (v/v) de **LI-1**. L'effet inactivant des LIs est plus prononcé en présence de **LI-2** ou de **LI-3**. En présence de ces deux LIs, l'activité enzymatique diminue en présence de 10 % (v/v) de LIs et l'activité est négligeable au dessus de 40 % (v/v) de **LI-2** et de 30 % (v/v) de **LI-3** (figure 18).

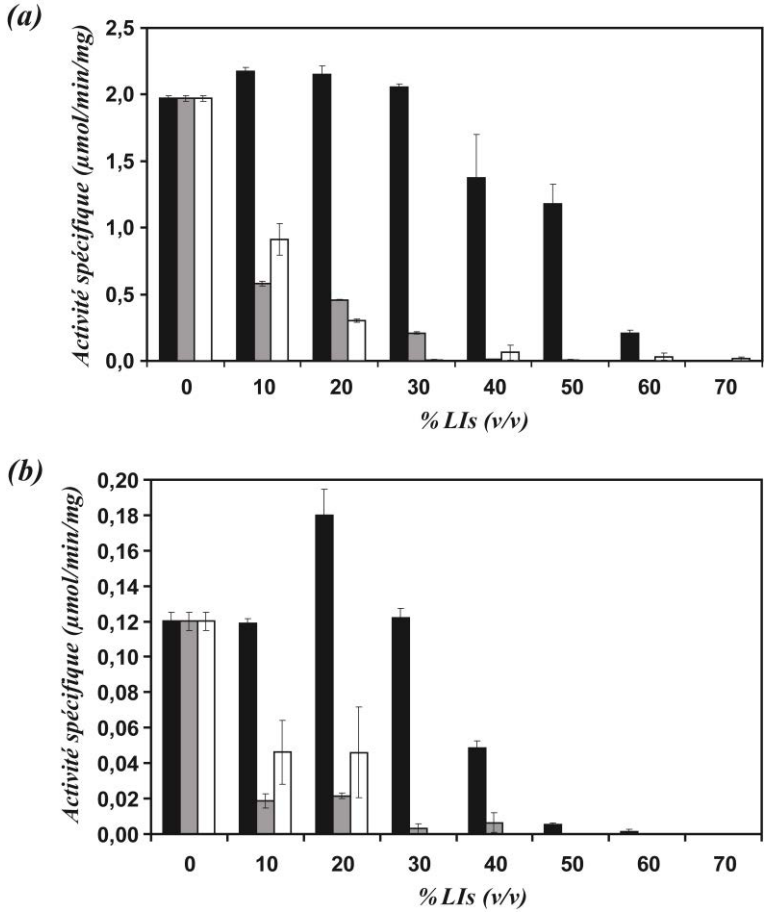


*Figure 18 : Activité de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 en présence de 0 à 70% (v/v) de LIs. L'activité est suivie à 340 nm (a) ou à 560 nm (b). Les barres noires, grises et blanches correspondent respectivement à l'activité de la FDH en présence de **LI-1**, de **LI-2** ou de **LI-3**.*

En présence de 10 à 30 % (v/v) de **LI-1**, le K_{SV}^{I-} augmente ce qui correspond au fait qu'une partie des résidus tryptophanyles deviennent accessibles au solvant (et à l'iode). Cependant, ces fluorophores restent suffisamment enfouis dans la mesure où l'acrylamide ne forme pas de complexe avec ces derniers ce qui se traduit par un K_{SV}^{Acr} constant voir légèrement diminué à ces concentrations de **LI-1** (figure 15). Les variations structurales de la FDH entre 0 et 30 % (v/v) de **LI-1** n'affectent pas l'activité enzymatique. Une hypothèse serait que les résidus de tryptophanes situés à l'interface des deux sous-unités sont exposés au solvant en raison de la

dissociation du dimère induite par le **LI-1**. Cela implique que le monomère est également une forme active de la FDH. Au dessus de 40 % (v/v) de **LI-1**, la valeur de K_{SV}^{Acr} augmente significativement et parallèlement, l'activité de la FDH diminue; ce qui signifie que l'enzyme a subi de grandes variations structurales autorisant l'accès de l'agent atténuateur statique à des résidus de tryptophanes enfouis tels que le W33 ou le W252 (figure 15b; 16 et 18).

En présence de **LI-2**, la FDH présente de légères variations structurales en dessous de 30 % (v/v) de LI car le K_{SV}^{I-} augmente alors que le K_{SV}^{Acr} reste constant. A 30 % (v/v) de **LI-2**, une concentration où l'activité de la FDH est négligeable, le K_{SV}^{Acr} augmente fortement ce qui correspond à un dépliement partiel de l'enzyme à cette concentration de LI (figure 15b). Entre 0 et 30 % (v/v) de **LI-2**, le K_{SV}^{Acr} reste constant alors que l'activité diminue. Cette première étape d'inactivation est possiblement due à un mécanisme différent de celui se déroulant en présence de **LI-1**. Ce dernier est composé du cation 1-methyl-3-methyl-imidazolium tandis que **LI-2** est composé du cation 1-butyl-3-methyl-imidazolium composé d'une chaîne alkyle plus longue. Le mécanisme d'inactivation en présence de **LI-2** fait donc probablement intervenir des interactions hydrophobes (Klahn M *et al.*, 2011).

La forte diminution d'activité en présence de 10 à 30 % (v/v) de **LI-3** ainsi que l'augmentation de K_{SV}^{Acr} suggère que l'enzyme est dénaturée à ces concentrations. Au dessus de 30 % (v/v) de **LI-3**, le K_{SV}^{Acr} reste constant supposant qu'à 30 % (v/v) de **LI-3** l'acrylamide a accès à tous les fluorophores présents au sein de la FDH. Par comparaison au **LI-1**, le **LI-3** est composé d'un anion phosphonate plus petit et par conséquent moins stabilisant (plus chaotrope) pour les structures protéiques que l'anion diméthylphosphate de **LI-1** (Zhao H *et al.*, 2006) (voir section I. 3. 2. F. 2. d.).

Ainsi, si le **LI-1** est considéré comme un LI dont les caractéristiques de kosmotropie/chaotropie sont intermédiaires, la nature du cation de **LI-2** et de l'anion de **LI-3** pourrait expliquer pourquoi ces LIs ont un effet plus important sur l'activité de la FDH que le **LI-1**.

III. 1. 4. Conclusions sur les analyses structurales en LI par des méthodes spectroscopiques

Les LIs absorbent fortement dans l'UV-visible et sont riches en liaisons covalentes rendant les méthodes de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge très difficiles, voir impossibles, à utiliser en présence de LIs à base d'imidazolium.

La fluorescence des protéines, et notamment l'atténuation de la fluorescence par des agents atténuateurs tels que l'acrylamide ou l'iode, s'est révélée être une méthode simple pour l'évaluation de la structure de l'enzyme en présence de LIs. Dans un premier temps, un paramètre, la CILc, est défini comme la concentration maximale de LI où le signal de fluorescence de la FDH est exploitable et propre à l'étude structurale en LI. La CILc est située entre 40 et 70 % (v/v) de LIs dans cette étude. Ces valeurs expliquent pourquoi la fluorescence intrinsèque des protéines n'a pas pu être efficacement utilisée pour l'analyse de structures protéiques à forte concentration de LIs (Bose S *et al.*, 2010; Wehofsky N *et al.*, 2008). Ces résultats supposent également que, dans le cas où une protéine est sous forme native en présence de LIs, un signal de fluorescence devrait être détecté car les résidus tryptophanyles seraient protégés par la conformation protéique. Cependant, une atténuation de la fluorescence des résidus tryptophanyles situés à proximité de la surface devrait être enregistrée en raison de l'absorption de la lumière UV par le LI. Les LIs agissent également comme des agents atténuateurs de la fluorescence des tryptophanes en solution; par conséquent, la fluorescence intrinsèque des protéines ne peut pas être directement liée au dépliement protéique. L'utilisation d'agent atténuateurs additionnels tels que l'iode ou l'acrylamide est proposée afin d'obtenir des informations d'ordre structural.

L'atténuation de la fluorescence par un agent atténuateur dynamique (tel que l'iode) ou un agent atténuateur statique (tel que l'acrylamide) à été réalisée en présence des LIs miscibles à l'eau à base de cation de type imidazolium à des concentrations inférieures à la CILc. L'agent atténuateur dynamique montre que, peu importe le LI utilisé, les résidus de tryptophanes de la FDH deviennent plus accessibles au solvant; cependant, il n'y a pas de lien direct entre les K_{SV}^{I-} calculés et les profils d'activités de la FDH en LI.

Les résidus de tryptophanes de la FDH sont principalement localisés à proximité de la surface de l'enzyme. L'atténuation de la fluorescence par l'iode montre que les LIs favorisent

l'interaction des tryptophanes avec le solvant sans nécessairement dénaturer totalement la protéine en dessous de la CILc. L'utilisation d'un agent atténuateur statique révèle que l'évolution du K_{SV}^{Acr} en fonction de la concentration de LI suit le profil d'activité et que l'inactivation observée peut être expliquée par de plus importantes variations structurales.

La fluorescence des protéines est donc une technique qui, utilisée avec précaution, permet d'étudier la structure des protéines en LI et d'obtenir des informations concernant le comportement structural des enzymes dans ces milieux.

III. 2. Modifications covalentes par des cations analogues aux LIs

III. 2. 1. Modifications covalentes de la FDH

III. 2. 1. A. Principe de la méthode de modification de la FDH

La FDH de *Candida boidinii* a été modifiée par des cations analogues aux cations composants les LIs afin de réduire l'effet que ces derniers peuvent avoir sur la structure/activité de l'enzyme (schéma 53). Les expériences de fluorescence montrent que les LIs miscibles à l'eau dénaturent l'enzyme et cela vraisemblablement en interagissant directement avec les stuctures tridimensionnelles. Les cations associés à l'enzyme serviraient alors à protéger l'enzyme des interactions dénaturantes des LIs.

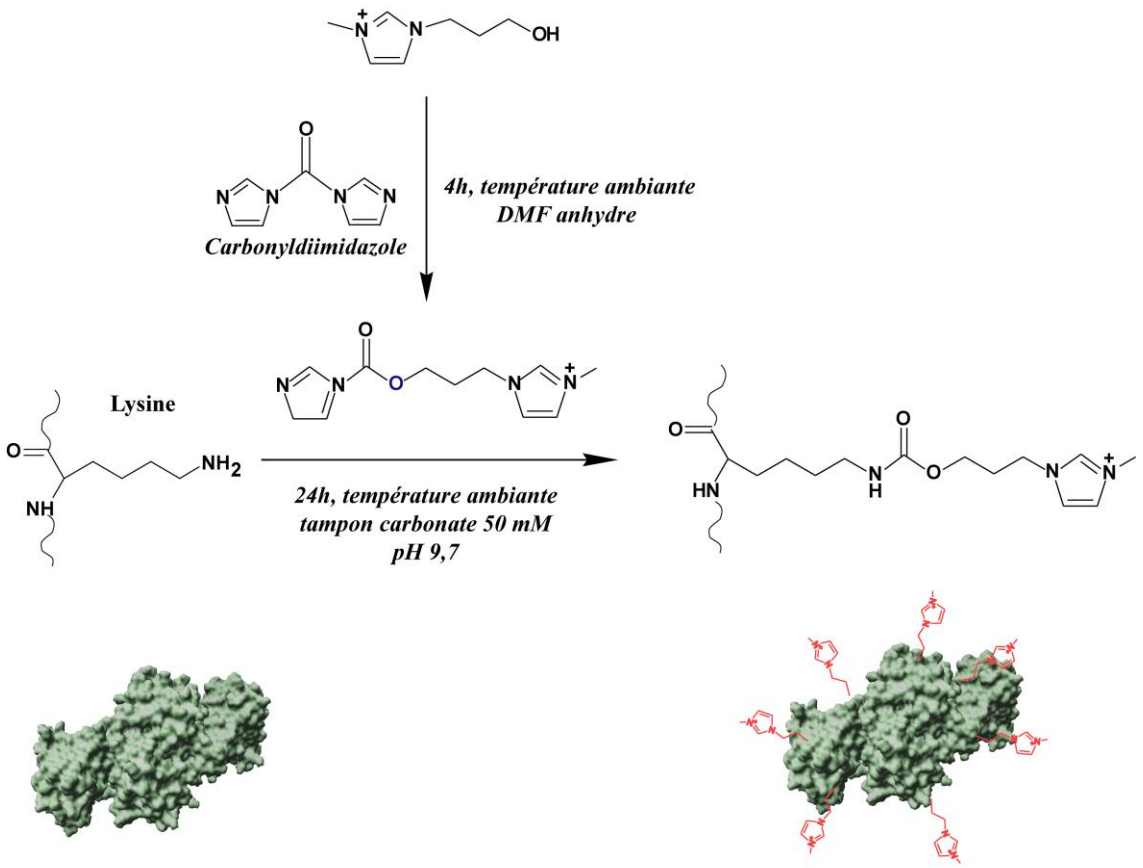
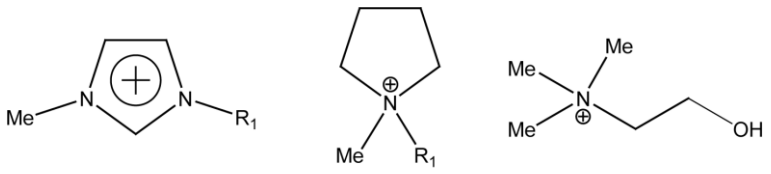


Schéma 53: Modification covalente de la FDH par l'hydroxypropyl imidazolium.

Les cations hydroxylés ont été greffés de manière covalente sur la fonction ε-amine des résidus de lysine après activation de leur fonction hydroxyle par du carbonyldiimidazole (schéma 53). La fonction est activée en condition anhydre sous atmosphère contrôlée (argon) tandis que le couplage est réalisé dans du tampon carbonate pH 9,7 (schéma 53). La FDH modifiée par les cations est concentrée et les cations n'ayant pas réagi sont éliminés sur une colonne de dessalage (voir section II. 2. 1. B.).

La FDH de *Candida boidinii* est un modèle de choix pour ce type de chimie dans la mesure où cette enzyme contient 31 lysines pour 364 acides aminés au total. La chimie du carbonyldiimidazole pour le greffage des cations sur la FDH a été préférée à la chimie plus simple à base d'EDC/NHS car la présence des deux groupements réactifs, carboxyles et amines, au sein de la protéine, a conduit à des phénomènes de réticulations et par conséquent à la formation d'aggrégats inactifs.

Trois types de cations, représentant les principales familles de cations retrouvés dans la composition des LIs, ont été greffés: des hydroxyalkylimidazoliums, des hydroxyalkylpyrolidiniums et le cholinium (schéma 54). L'effet de la taille de la chaîne alkyle associée aux cations de type imidazolium ou pyrrolidinium sur l'activité et la stabilité de la FDH en LI a été analysé.



	R_1
a	$-(CH_2)_2-OH$
b	$-(CH_2)_3-OH$
c	$-(CH_2)_4-OH$
d	$-(CH_2)_6-OH$

Schéma 54: Cations greffés sur la FDH.

III. 2. 1. B. Procédure générale de synthèse des sels de cations hydroxylés

Les sels de cation ont été synthétisés selon une procédure simple et sans solvant (Fang D *et al.*, 2008). Un équivalent de 1-methyl-pyrrolidine ou de 1-methyl-imidazole est mis en présence d'un équivalent de chloro-alcool, puis placé à reflux à 70°C pour les cations à base de pyrrolidinium et à 80°C pour les cations à base d'imidazolium durant 48h sous argon (schéma 55).

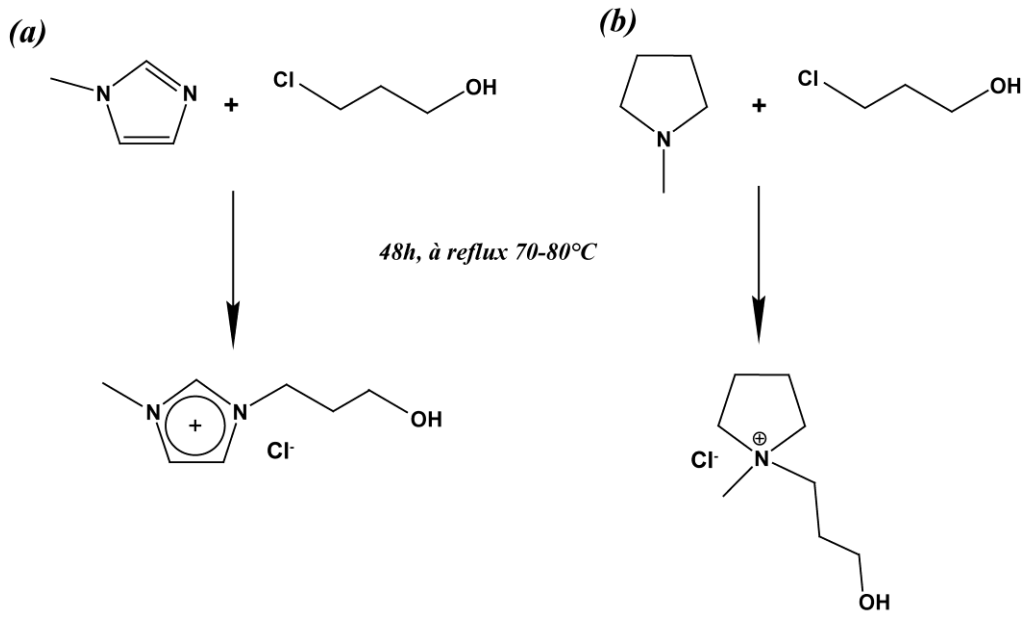


Schéma 55 : Schéma de synthèse de l'hydroxypropyl imidazolium chloride (a) et de l'hydroxypropyl pyrrolidinium chloride (b).

III. 2. 1. C. Caractérisation des cations synthétisés

Les sels de cations synthétisés sont caractérisés par spectrométrie de masse ESI^+ et par RMN ("Résonnance Magnétique Nucléaire") de l'hydrogène et du carbone, ^1H et ^{13}C respectivement.

L'analyse du produit de la synthèse de l'hydroxypropylimidazolium est donnée en guise d'exemple (figure 19). Après synthèse, le spectre ESI^+ du chlorure d'hydroxypropylimidazolium présente un pic majoritaire à 141,1 m/z correspondant au cation seul et un pic à 316,8 m/z correspondant à l'association de deux cations et d'un atome de chlore (figure 19c).

Le sel de cation est également analysé pas RMN. Les pics RMN correspondants aux différents groupes de protons sont retrouvés sur le spectre ^{1}H (figure 19a et d) et attribués selon la littérature (Langat J *et al.*, 2006). Le signal le plus déblindé est un doublet à 7,7 ppm correspondant aux hydrogènes a et b du noyau imidazolium selon la nomenclature utilisée sur la figure 19d. Le signal le plus blindé, un multiplet situé à 2,33 ppm, correspond aux deux hydrogènes de la chaîne hydroxyalkyle, nommés f sur la figure 19d, car chaque hydrogène résonne avec 4 hydrogènes voisins. Les deux triplets à 4,52 et 3,84 ppm sont respectivement attribués aux hydrogènes de la chaîne alkyle nommés g et e. Le pic le plus important en intensité à 4,12 ppm est attribué aux hydrogènes du groupement méthyle, nommés d. Le signal restant, à 4,97 ppm, est attribué à l'hydrogène c de l'imidazolium. En ce qui concerne le spectre RMN du carbone ^{13}C, les deux signaux les plus déblindés sont attribués aux carbones aromatiques a et b. Les 4 signaux situés entre 58,29 ppm et 32,03 ppm sont attribués aux carbones aliphatiques du cation.

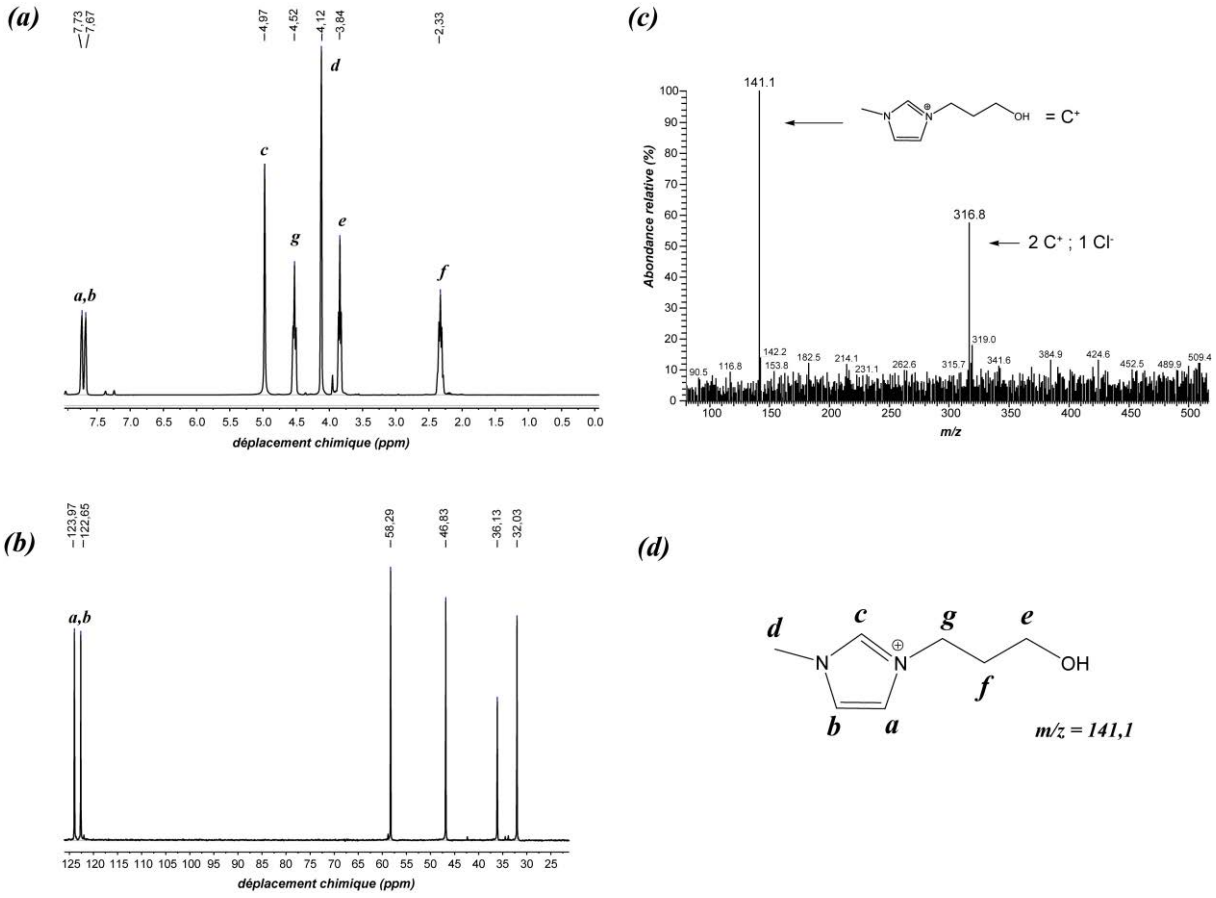


Figure 19 : Caractérisation de la synthèse de l'hydroxypropylimidazolium. Le cation est caractérisé par RMN du proton ^{1}H (a), du carbone ^{13}C (b) et par spectrométrie de masse ESI^{+} (c). La nomenclature des carbones et des hydrogènes (a-g) est reportée sur la structure de l'hydroxypropylimidazolium (d).

III. 2. 2. Effets des modifications sur l'activité de la FDH

III. 2. 2. A. Activité des enzymes modifiées

Le greffage de cations à la surface de la FDH induit une inactivation de l'enzyme, dans du tampon carbonate 25 mM pH 9,7, en fonction de la taille et de la nature du cation greffé (tableau 14). Les cations dont la chaîne alkyle possède plus de 3 carbones (**1c**, **1d**, **2c** et **2d**) induisent l'inactivation complète de l'enzyme (schéma 55, tableau 14). Les cations de grande taille ont un coefficient de viscosité B plus important que les cations de petite taille (schéma 30, tableau 14), par conséquent l'effet inactivant ici observé est analogue à l'effet des cations des LIs en solution (Zhao H *et al.*, 2006a; Zhao H 2006; Yang Z, 2009). Par exemple, le greffage du cation **1a**, dont le coefficient de viscosité B est de 0,491 $dm^3.mol^{-1}$, induit la perte de 35% de l'activité de la FDH non modifiée tandis que le greffage du cation **1d**, dont le coefficient de viscosité B est de 0,717 $dm^3.mol^{-1}$, induit l'inactivation totale du bioacatlyseur (tableau 14). La perte d'activité de la FDH suite au greffage des cations fait donc probablement intervenir des interactions hydrophobes entre la chaîne alkyle du cation et le cœur hydrophobe de la structure protéique conduisant ainsi à la dénatuation protéique (Klahn M *et al.*, 2011).

	AR (%)[a]	n[b]	Coefficient B ($dm^3.mol^{-1}$)[c]
FDH	100	n.a.	n.a.
FDH-1a	65	7-12	0,491
FDH-1b	50	3-9	0,516
FDH-1c	10	3-10	0,610
FDH-1d	0	7-11	0,717
FDH-2b	45	10*	0,540
FDH-2c	0	8-13	0,605
FDH-2d	0	9-16	0,748
FDH-3	65	3-9	0,380

Tableau 14 : Activité résiduelle de la FDH modifiée par les différents cations dans du tampon carbonate 25 mM pH 9,7. Activité résiduelle (AR), nombre de cations greffés (n) et constante de dissociation (K_D) des ligands de l'enzyme sauvage ou modifiée ***FDH-1-3****. [a] Déterminé en conditions saturantes de substrat ([NAD^+] 5 mM; [Formiate] 300 mM) [b] Déterminé par spectrométrie de masse ESI^+ [c] Coefficient de viscosité B calculé pour le cation à partir des valeurs de la littérature et sachant que les coefficients de viscosité B sont additifs (Zhao H et al., 06). * Spectres ESI^+ non complètement résolus.*

Les enzymes modifiées par les cations **1a**, **1b** et **3** ont une activité diminuée de 35 à 50% dans le tampon carbonate 25 mM pH 9,7. Ces cations de petite taille ont probablement un effet moins dénaturant en raison de leur moindre hydrophobicité en comparaison aux cations de type **c** et **d** (tableau 14). Par la suite, les travaux concernant les améliorations d'activité enzymatique en LI se sont donc plus particulièrement concentrés sur le greffage des cations **1a**, **1b** et **3** à la surface de la FDH.

III. 2. 2. B. Caractérisation des modifications : nombre et localisation

III. 2. 2. B. 1. Détermination du nombre de modifications

Le nombre de cations greffés a été estimé par spectrométrie de masse ESI^+. Le spectre de masse de l'enzyme sauvage présente un seul pic majoritaire à m/z 40 388 amu qui correspond à la FDH (40 370 Da d'après la banque de donnée protéique Uniport; entrée O13437) (figure 20A). La modification par des cations conduit à la formation de populations hétérogènes de 5 à 8 protéines où la différence de masse entre les pics correspond à la masse du cation greffé, par exemple, de 129 Da pour le cholinium comprenant la liaison carbamate (figure 20B).

La FDH modifiée par le cation **3** (le plus petit cation possédant le plus faible coefficient de viscosité B : 0,380 $dm^3.mol^{-1}$) présente 3 à 9 résidus modifiés tandis que 9 à 16 cations **2d** (le plus grand avec le plus fort coefficient de viscosité B : 0,748 $dm^3.mol^{-1}$) sont greffés. A l'exception du cation **1a**, plus le cation est grand et plus le nombre de modifications sera important (tableau 14). Le nombre de modifications est également corrélé à l'activité de la FDH, plus le nombre de résidus modifiés est important et moins l'enzyme est active (excepté pour le cation **1a**) (tableau 14, section III. 2. 2. A.).

Afin d'expliquer le lien entre la taille du cation, le nombre de cation greffé et l'activité enzymatique, l'hypothèse la plus probable se base sur la théorie d'Hofmeister appliquée aux cations des liquides ioniques et développée par Zhao (Zhao H, 2006). Les cations des LIs définis comme chaotropes (de petite taille avec un faible coefficient de viscosité B) tendent à stabiliser les structures protéiques tandis que les cations kosmotropes (de grande taille avec un fort coefficient de viscosité B) tendent à déstabiliser les structures protéiques voir à les dénaturer. Pour les cations **1c-d** et **2c-d**, les cations les plus volumineux et kosmotropes, le premier cation greffé induirait une destabilisation de la structure protéique ce qui augmenterait l'accessibilité des cations aux résidus de lysine durant le greffage et donc induirait le greffage d'un plus grand nombre de cations (tableau 14).

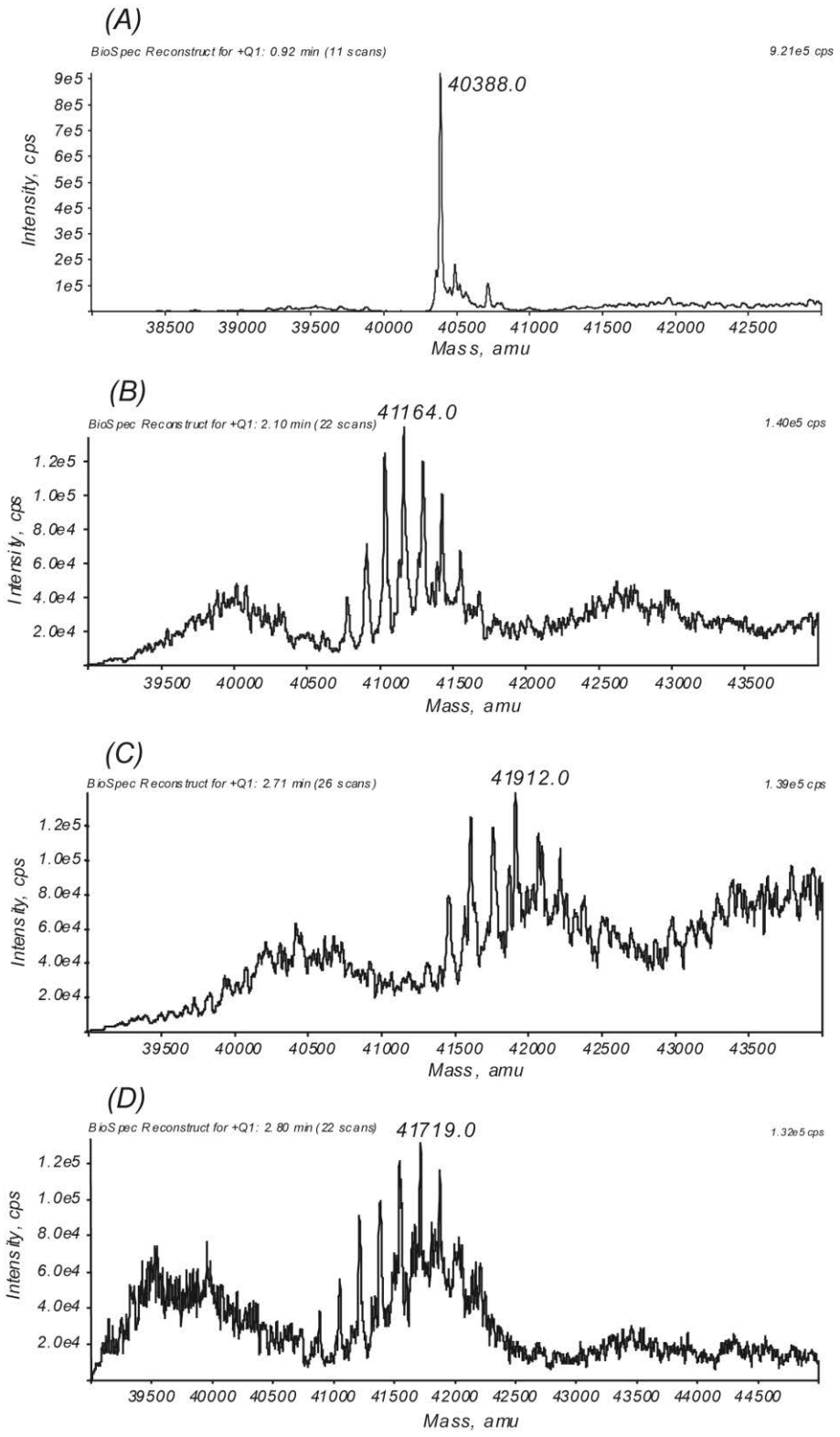


*Figure 20 : Spectres de masse ESI$^+$ de la FDH sauvage (A) et de la FDH modifiée par les cations **3** (B), **1a** (C) et **1b** (D).*

III. 2. 2. B. 2. Localisation des modifications

La localisation des cations sur les enzymes modifiées et actives (FDH-**1a**, **1b** et **3**) a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-ToF. La FDH native ainsi que les enzymes modifiées ont été digérées par la trypsine ou la chymotrypsine (schéma 56). La trypsine catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique en position C-terminale des acides aminés basiques (lysine, arginine) tandis que la chymotrypsine clive en position C-terminale des acides aminés aliphatiques et aromatiques (leucine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (schéma 56).

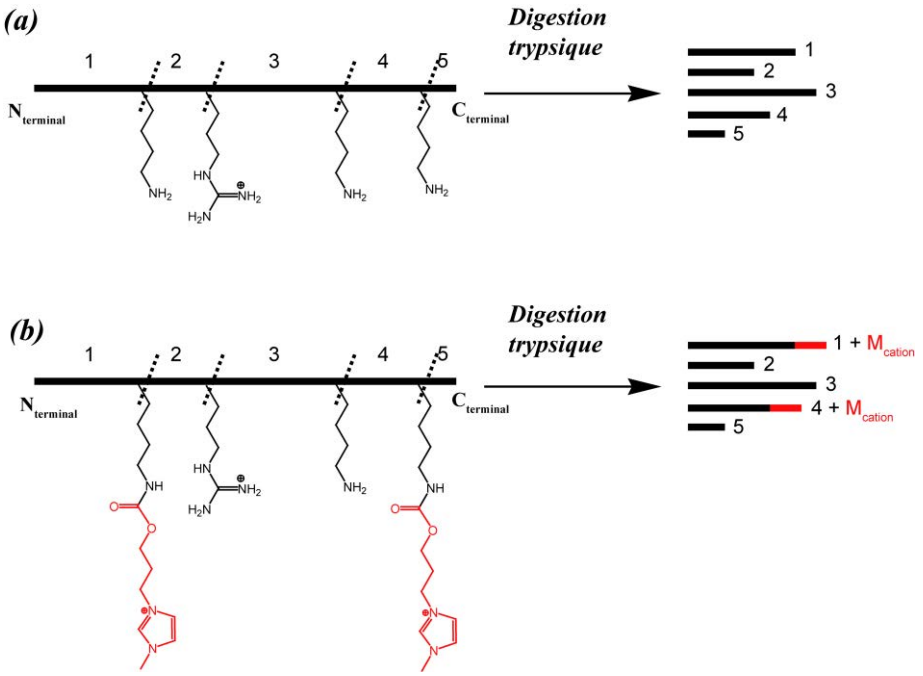


*Schéma 56 : Représentation schématique de procédure utilisée afin de déterminer la localisation des résidus modifiés. La FDH modifiée par le cation **1b** et digérée par la trypsine est utilisée pour illustrer la démarche utilisée pour déterminer la localisation des résidus modifiés.*

Les peptides issus de la digestion de l'enzyme sauvage sont identifiés à l'aide d'un logiciel de prédiction des empreintes massiques de digestion: PeptidMass (http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html). Les produits de digestion des enzymes modifiées sont identifiés par comparaison à la masse théorique des produits de digestion contenant 0 à 5 modifications calculées en considérant la masse isotopique des adduits : 152.0586, 166.0748 et 129.0790 respectivement pour les cations **1a**, **1b** et **3** (schéma 56). Seuls les fragments dont la différence de masse avec la masse théorique est inférieure à 1 Da et dont

le nombre de lysine est supérieur ou égal au nombre de cations greffés sont considérés (annexes III et IV).

La digestion par les deux types d'enzyme permet d'identifier des peptides couvrant 85 à 91% de la séquence primaire de l'enzyme: 91% pour la FDH non modifiée, 85 % pour la FDH-**1a**, 89% pour la FDH-**1b** et 97% pour la FDH-**3**. Parmi les 31 lysines présentes, plus où moins localisées à la surface de la FDH, il n'y a pas de site de modification majoritairement préférentiel (figure 21a). Néanmoins, les lysines 107, 108 et 157 sont modifiées par le cation **1b** tandis que les cations **1a** et **3** ne semblent pas être greffés sur ces résidus. Le cation **1b** étant plus volumineux que les cations **1a** et **3** (schéma 58), il est possible qu'il induise le dépliement partiel de la FDH de manière plus importante ce qui lui faciliterait l'accès à des résidus lysine inaccessibles aux cations **1a** et **3**. Les lysines 81, 83, 86, 189, 291, 301, 338 et les lysines 360, 363 et 364 présentes à l'extrémité C-terminale sont modifiées plus fréquemment par les 3 types de cations (figure 21a). L'extrêmité C-terminale de la FDH est flexible, sa structure tridimentionnelle n'est pas résolue et par conséquent les résidus 360, 363 et 364 ne sont pas visibles. Les lysines 81, 83, 86 et 338 sont localisées dans le domaine catalytique et sont régroupées à la surface du dimère de la FDH (figure 21b, face nord). Les lysines 189 et 291 sont localisées sur le domaine de fixation du NAD^+ et à proximité du site de fixation du cofacteur formé par l'espace ménagé entre le domaine catalytique et le domaine de fixation du NAD^+ (figure 21b). La lysine 291 est notamment située à l'entrée du site actif et sa chaîne latérale pointe en direction de ce dernier (figure 21 b, face nord, chaîne D), sa modification par les cations peut donc réduire l'accessibilité des substrats au site actif et donc entraîner une diminution de l'activité du biocatalyseur telle qu'elle est observée dans le tampon (tableau 14). La lysine 360 est supposée interagir avec la partie ribose du NAD^+. Il a été montré que sa mutation en alanine augmente le K_M de l'enzyme pour le NAD^+ (Labrou EN *et al.*, 2000). La modification de la lysine 360 par des cations pourrait donc également augmenter la valeur de K_M de l'enzyme pour le NAD^+.

Comme attendu, les lysines modifiées sont préférentiellement localisées à la surface de la FDH. L'essentiel des modifications sont relativement éloignées du site actif. Par conséquent, les variations d'activités enzymatiques suite à la greffe de cations (tableau 14) ne sont probablement pas seulement dues à des effets de gènes stériques, comme dans le cas de la lysine 291, mais pourraient également être dues à la dénaturation partielle de régions situées à la surface de la structure tridimensionnelle de la FDH.

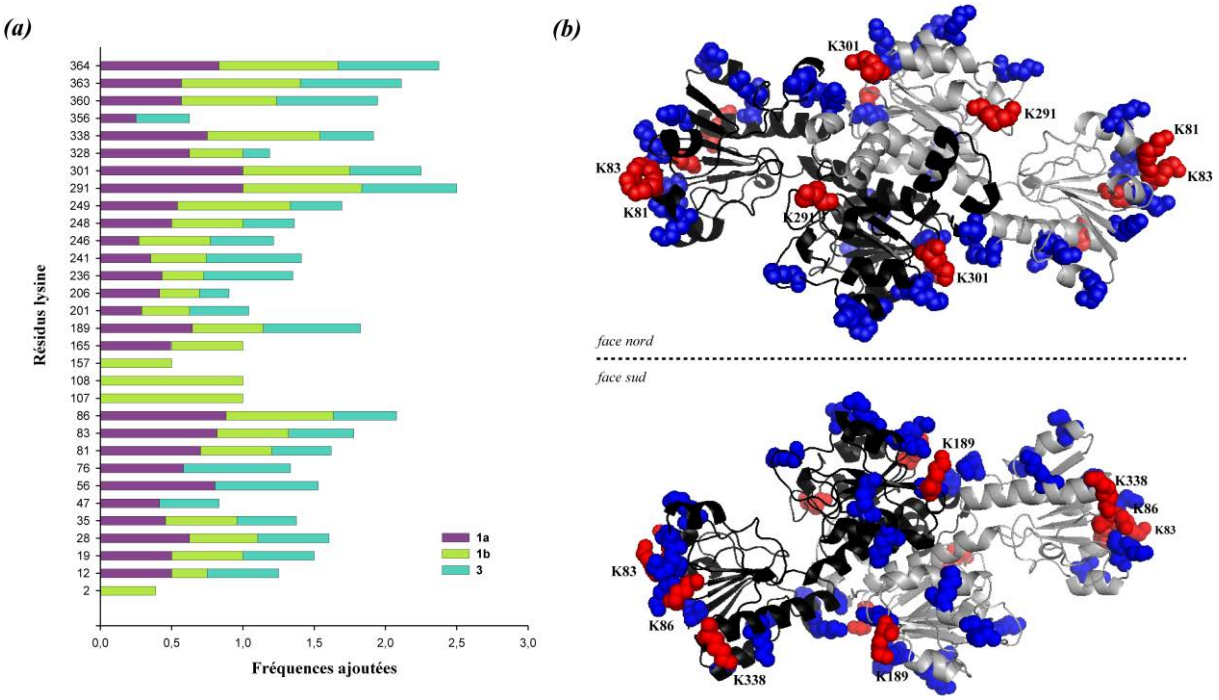


*Figure 21 : Localisation des résidus lysine modifiés sur la FDH. (a) Fréquence de modification des résidus de lysine par les cations **1a**, **1b** et **3**. (b) Structure tridimensionnelle des chaînes A (noir) et D (gris) du crystal tetramérique de la FDH de Candida boidinii (entrée pdb 2fss). La structure tridimensionnelle du dimère de la FDH est visualisée sous forme de ruban, les lysines sont visualisées sous forme de sphères bleues et celles dont la fréquence de modification est plus importante (fréquence > 1,7) sont visualisées sous forme de sphères rouges.*

III. 2. 2. C. Analyse de la fixation des substrats

Après modification de la FDH, les cations de grande taille induisent l'inactivation de l'enzyme. La capacité de ces différentes enzymes à fixer les substrats a été analysée par spectroscopie de fluorescence. Une fois le substrat fixé, la fluorescence de l'enzyme est atténuée; plus précisément, à l'image des agents atténuateurs statiques, les substrats associés au site catalytique limitent les propriétés de fluorescence des fluorophores à proximité (Tishkov VI *et al.*, 1996; Labrou NE et Rigden DJ, 2001). Dans le cas de la FDH de *Candida boidinii*, les fluorophores concernés seraient le W284 et le W295 situés sur le domaine de fixation du NAD^+ et situés à proximité du site de fixation du cofacteur (figure 16).

Selon le mécanisme réactionnel de la FDH (schéma 57), l'atténuation de la fluorescence par le NAD^+ est directement réalisée en présence de concentrations croissantes de cofacteur. Le formiate ne se fixe seulement que lorsque le NAD^+ est déjà lié au site catalytique. Par conséquent, la fixation du formiate est analysée en présence d'une concentration saturante (500 µM) de NAD^+ (schéma 57). Afin que la réaction catalytique n'ait pas lieu, un inhibiteur compétitif de la fixation du formiate est utilisé : l'azide (K_D^{N3} 0,15 µM) (Tishkov VI *et al.*, 1996).

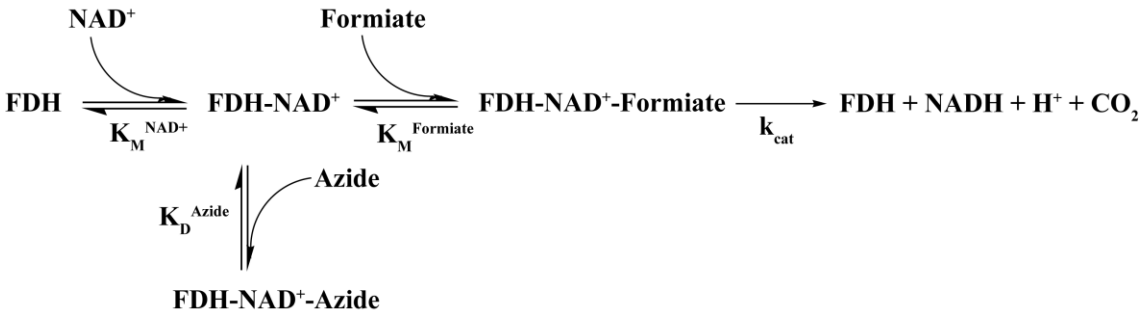


Schéma 57 : Schéma réactionnel de la FDH : les substrats sont le NAD^+ et le formiate tandis que l'azide est un inhibiteur competitif de la fixation du formiate.

III. 2. 2. C. 1. Fixation du NAD^+

	K_D^{NAD+} (µM)	K_D^{N3} (µM)	Coefficient B ($dm^3.mol^{-1}$) [c]
FDH	207 ± 19	1.33 ± 0,59	n.a.
FDH-1a	206 ± 28	0.90 ± 0,20	0,491
FDH-1b	276 ± 43	1.05 ± 0,53	0,516
FDH-1c	339 ± 59	n. d.	0,610
FDH-1d	251 ± 15	n. d.	0,717
FDH-2a	276 ± 43	1.49 ± 0,95	0,540
FDH-2b	251 ± 39	n. d.	0,605
FDH-2c	388 ± 88	n. d.	0,748
FDH-3	187 ± 12	2.07 ± 0,95	0,380

Tableau 15 : Constantes de dissociation (K_D) de la FDH, native ou modifiée, par les cations pour le NAD^+ et l'azide (N_3) déterminées à partir des figures 22 et 23. [c] Coefficient de viscosité B calculé pour les cations (Zhao H, 2006).

Les intensités de fluorescence de la FDH sont mesurées en présence de différentes concentrations de NAD^+. La variation du pourcentage d'atténuation de la fluorescence de la FDH en fonction de la concentration de NAD^+ décrit une courbe hyperbolique représentative d'un mécanisme saturant (figure 22). L'atténuation maximale de fluorescence pour la FDH sauvage est de 55%. Cette valeur est cohérente si l'on considére la capacité totale d'atténuation de la fluorescence théorique de 60%, sachant que sur les 5 tryptophanes présents au sein de la structure tridimensionnelle de la FDH trois sont susceptibles d'interagir avec le(s) substrat(s) : les tryptophanes W295 et W284 sont localisés à moins de 4 angstoms de l'arginine 258 du site actif du même monomère, et le tryptophane W150 à moins de 4 angstroms de l'arginine 258 du

second monomère dans la forme dimérique de la FDH (figure 16, schéma 42). Une constante de dissociation (K_D) est extraite de la représentation non linéaire de l'atténuation de la fluorescence (section I. 3. 3. D. 3. a.). Cette valeur correspond à la concentration de NAD^+ pour laquelle la moitié de l'atténuation de la fluorescence maximale est atteinte. Le K_D^{NAD+} de la FDH non modifiée est de 207 ± 19 µM, cette valeur est supérieure au K_M de l'enzyme pour le NAD^+ (43 µM, tableaux 15 et 16). Cela s'explique par deux phénomènes : d'une part, le formiate stabiliserait la fixation du NAD^+ en facilitant la formation du complexe ternaire et d'autre part, lors de la réaction enzymatique, le NAD^+ est transformé en NADH qui est libéré laissant ainsi le site actif libre pour la fixation d'une autre molécule de cofacteur. Les valeurs de K_D^{NAD+} ne permettent pas d'expliquer la différence d'activité enzymatique observée entre les enzymes modifiées avec des cations de petite taille (FDH-**1a**, FDH-**1b** et FDH-**3**) et les enzymes modifiées avec des cations de plus grande taille (FDH-**1c**, FDH-**1d**, FDH-**2c** et FDH-**2d**) (figure 22, tableau 14). Par exemple, la FDH-**1a** et la FDH-**1d** ont une valeur de K_M^{NAD+} respectivement de 206 ± 28 µM et de 251 ± 15 µM alors que la première présente 65% d'activité résiduelle et que la seconde est inactive (tableau 14 et tableau 15). La différence entre les enzymes actives et inactives est visible au niveau de l'atténuation maximale de la fluorescence. L'atténuation maximale de la fluorescence suite à la fixation du NAD^+ sera d'autant plus importante que l'enzyme est active (figure 22). Ainsi, l'atténuation maximale de la fluorescence de la FDH sauvage est la plus importante tandis que l'atténuation maximale de fluorescence des enzymes modifiées avec les plus grands cations (**1c-d** et **2c-d**) est inférieure.

Ces résultats signifient que l'enzyme non modifiée fixe et/ou interagit avec le cofacteur de façon plus importante que les enzymes modifiées par des cations de grande taille. Curieusement, les enzymes inactives ont toujours la capacité de fixer le NAD^+ et avec des K_D semblables aux enzymes inactives (tableau 15, figure 22). Il est probable que les variations structurales de la FDH suite au greffage des cations **1c-d** et **2c-d** conduisent à l'éloignement des tryptophanes à proximité du site de fixation du NAD^+ (figure 16), réduisant ainsi l'effet atténuateur du cofacteur tandis que ce dernier est fixé avec un K_D quasi-similaire.

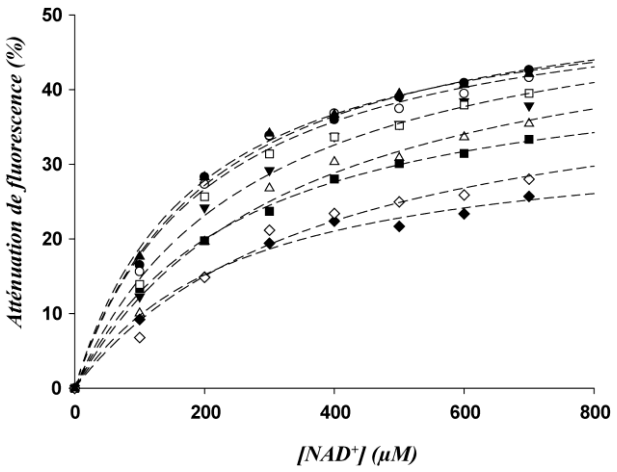


*Figure 22 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par le NAD^+ (0-700 µM). Atténuation de la fluorescence de la FDH non modifiée (●), FDH-**1a** (○), FDH-**1b** (▼), FDH-**1c** (Δ), FDH-**1d** (■), FDH-**2b** (□), FDH-**2c** (♦), FDH-**2d** (◊) and FDH-**3** (▲). Les hyperboles à partir desquelles les valeurs de K_D^{NAD+} sont déterminées sont représentées en pointillé ($R^2 > 0.99$).*

III. 2. 2. C. 2. Fixation de l'azide

La capacité à fixer le NAD^+ ne permet pas d'expliquer complètement l'inactivation des enzymes modifiées par les cations **1c-d** et **2c-d**. La fixation du second substrat, le formiate, est étudiée par la mesure de l'intensité de la fluorescence de l'enzyme en présence de différentes concentrations d'azide, un analogue structural du produit de la réaction, en présence d'une concentration saturante en NAD^+ (500 µM) au vu du K_D^{NAD+} (~ 200 µM).

A l'image de la fixation du NAD^+, la fixation de l'azide sur l'enzyme sauvage décrit une courbe hyperbolique significative d'un mécanisme de saturation où le K_D^{N3} est de 1,33 ± 0,59 µM et l'atténuation maximale est de 14% (figure 23, tableau 15). L'atténuation maximale de la fluorescence de la FDH native par l'azide est plus faible que l'atténuation maximale de la fluorescence dûe à la fixation du NAD^+ (figure 22 et 23). Cette différence peut s'expliquer par le fait que lors des expériences d'atténuation de la fluorescence à l'azide, le NAD^+ est déjà présent dans l'essai en concentration saturante (500 µM) et qu'une grande partie de la fluorescence est déjà atténuée.

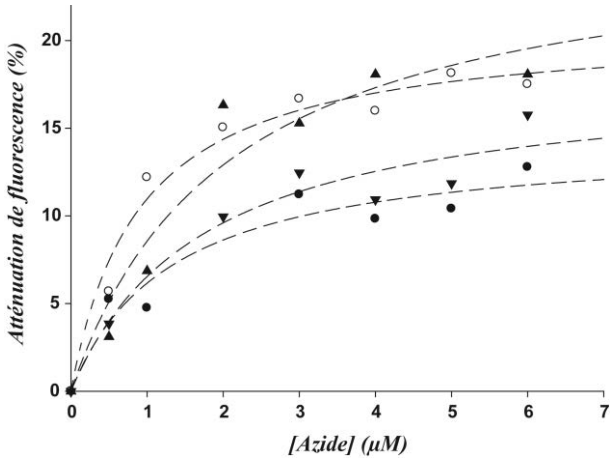


*Figure 23 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (2,61 µM) dans du tampon PBS pH 7,2 par l'azide (N_3 : 0-6 µM) en presence d'une concentration saturante de NAD^+ (500 µM). Atténuation de la fluorescence de la FDH (●), FDH-**1a** (○), FDH-**1b** (▼), and FDH-**3** (▲). Les hyperboles à partir desquelles les valeurs de K_D^{N3} sont déterminées sont représentées en pointillés ($R^2 > 0,9$).*

Les enzymes actives sont capables de fixer l'azide et par extension le formiate. Concernant les enzymes inactives, les variations de fluorescence en présence d'azide sont trop faibles pour permettre le calcul d'une constante de dissociation. Les enzymes modifiées avec des cations volumineux ne fixent donc pas ou que très faiblement l'azide. Le greffage des cations de petite taille (**1a-b** et **3**) n'affecte le K_D^{N3} que très faiblement en comparaison à l'enzyme native (tableau 15). Cependant, la valeur d'atténuation maximale de la fluorescence des enzymes modifiées par ce type de cation est supérieure à celle de l'enzyme non modifiée : 17 et 26% d'atténuation maximale respectivement pour la FDH-**1b** et **3** tandis que l'atténuation maximale est de 12% pour l'enzyme sauvage. L'augmentation de l'atténuation maximale des enzymes modifiées par les cations **1a-b** et **3** pourrait correspondre à des modifications structurales de l'enzyme de telle sorte que les tryptophanes du site catalytique soient plus proches du site de fixation de l'azide que dans l'enzyme native. Autrement dit, le greffage des cations **1a-b** et **3** conduirait à l'obtention d'un site catalytique plus refermé sur l'azide.

III. 2. 2. C. 3. Conclusion sur la fixation des substrats

Les expériences de fixation des substrats donnent des informations sur le mécanisme responsable de l'inactivation des enzymes considérant la nature du cation greffé. Le greffage des cations de petite taille n'affecte pas ou très peu la fixation des substrats ceci expliquant pourquoi ces enzymes sont actives. En lien avec l'activité, les cations **1a-b** et **3** n'ont pas d'effet ou ont un effet limité sur la structure de l'enzyme en solution. Le greffage des cations de grande taille (**1c-d** et **2c-d**) réduit l'atténuation de fluorescence maximale du NAD^+ ce qui pourrait être expliqué par la réorientation des tryptophanes à proximité du site actif suite à un dépliement de la structure protéique. Le greffage de ce type de cations abolit la capacité de l'enzyme à fixer le formiate.

Les cations **1c-d** et **2c-d** induisent très probablement le dépliement partiel de la FDH ce qui réduit sa capacité à fixer les substrats (section III. 2. 2. C. 2.).

III. 2. 2. D. Activité enzymatique de la FDH modifiée en LI

L'effet que ces modifications peuvent avoir sur l'activité de l'enzyme en LI à été étudiée en présence du [MMIm][Me_2PO_4] (ou **LI-1**), un LI miscible à l'eau composé d'un cation chaotrope associé à un anion kosmotrope et dont l'effet inactivant est progressif en fonction de la concentration de LI (figure 18).

L'activité de la FDH native et de la FDH modifiée par les cations **1a-b** et **3** a été mesurée par le suivi de l'apparition du NADH à 340 nm en présence de 0 à 70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Tel qu'il a été observé auparavant (section III. 1. 3. G.), l'activité de la FDH native diminue en présence de concentrations croissantes de LI. L'activité spécifique varie de 0,33 à 0,06 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ de 0 à 40% (v/v) de LI ce qui correspond à une perte de 76% de l'activité initiale (figure 24). A des concentrations supérieures à 40% (v/v) de LI, l'enzyme est inactive en raison de l'effet dénaturant du LI (section III. 1. 3. G.).

Le greffage des cations (**1a-b** et **3**) entraîne la diminution de l'activité spécifique de la FDH de 0,33 à 0,10-0,15 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ soit 30 à 45% de l'activité de l'enzyme non modifiée (figure 24).

En présence de concentrations croissantes de LI, l'activité spécifique des enzymes modifiées diminue; cependant, cette perte d'activité est moins importante que pour l'enzyme sauvage (figure 24). Les enzymes modifiées ne sont pas affectées par la présence de 20% (v/v) de LI dans l'essai tandis que l'enzyme sauvage a perdu 24% de son activité initiale à cette même concentration de LI. En présence de 40% (v/v) de LI, les enzymes retiennent 33 à 46% de leur activité initiale tandis que l'enzyme sauvage n'a retenu que 24% de son activité initiale (figure 24b). Le plus intéressant reste l'effet que ces modifications ont sur l'activité de l'enzyme en présence de concentrations de LI supérieures à 40% (v/v). En présence de 70% (v/v) de LI, la FDH-**1a** retient plus de 43% de son activité initiale (0,06 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$), la FDH-**1b** retient 30% de son activité initiale (soit 0,034 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$) et la FDH-**3** retient 36% de son activité initiale (soit 0,044 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$). Curieusement, les enzymes modifiées sont moins actives à 50 et 60% (v/v) de LI par rapport à 70% (v/v) de LI. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les LI en solution ne se comportent pas comme des sels classique. C'est-à-dire que malgré le fait que le LI soit considéré comme miscible à l'eau, ce dernier n'est probablement pas totalement dissocié en solution et pourrait former des micro-domaines à l'image des LIs non miscibles à l'eau formant des domaines où les molécules (anion/cation) sont organisés et orientés (Sieffert N et Wippf G, 2006a, 2006b; Fehér E *et al.*, 2007). La formation de ce type de micro- ou nano-domaines aurait pour conséquence d'augmenter la concentration du LI au voisinage de l'enzyme et donc modifierait le comportement cinétique.

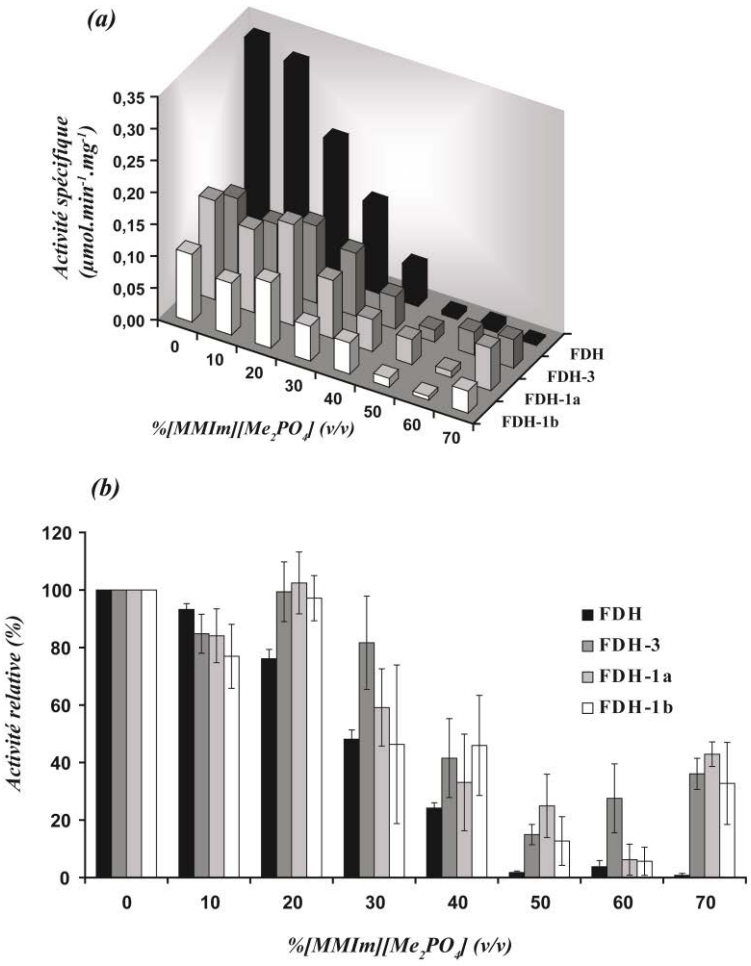


*Figure 24 : Activité de la FDH native et modifiée en présence de LI. Activités spécifiques (a) et relatives (b) de la FDH native (noir), FDH-**3** (gris foncé), FDH-**1a** (gris clair) et de la FDH-**1b** (blanc) en présence de 0-70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] (v/v). La concentration de FDH est de 0,3 µM, celle de NAD+ de 5 mM, le formiate est à 300 mM dans du tampon carbonate pH 9,7.*

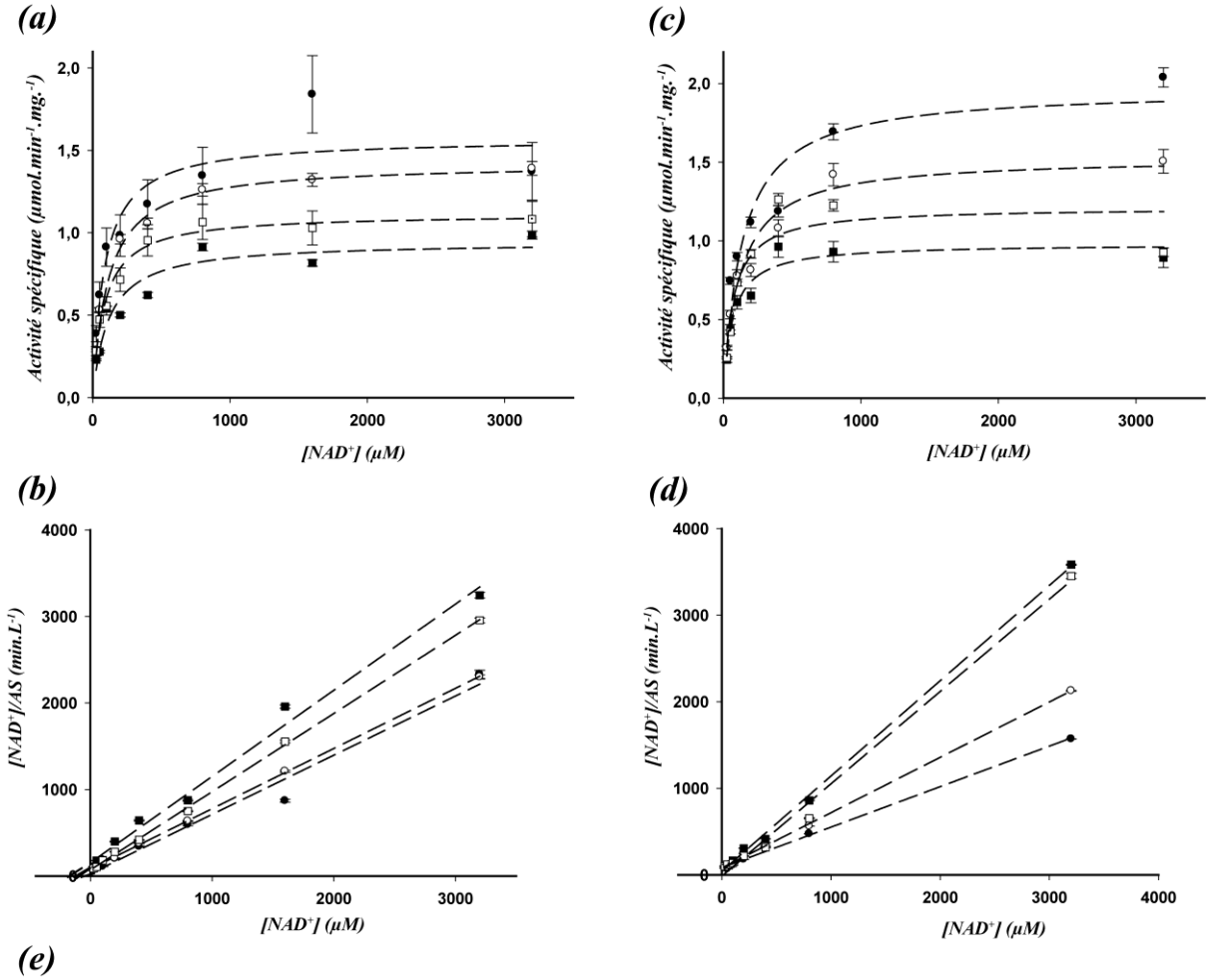
Ces résultats montrent que le greffage de cations à la surface de la FDH améliorerait son activité en LI. Le cation **1a** donne de meilleurs résultats, cette observation pourrait s'expliquer de différentes manières. D'une part, le cation **1a** est plus petit que le cation **1b** et serait donc plus stabilisant que ce dernier. D'autre part, il est de la même nature que le cation du LI ce qui faciliterait les interactions avec le **LI-1**, ce qui n'est pas le cas du cation **3**. De plus, le cation **1a** est greffé en plus grand nombre ce qui aurait pour conséquence de réduire d'autant plus les effets que les LIs ont sur la structure de l'enzyme.

III. 2. 2. E. Paramètres cinétiques de la FDH modifiée en présence de LI

Les paramètres cinétiques de la FDH sauvage et de la FDH modifiée par les cations **1a-b** et **3** ont été déterminés en présence ou en absence de 30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. A cette concentration de LI, les enzymes sont suffisamment actives afin de pouvoir apprécier les différences de vitesse lorsque la concentration de NAD^+ varie.

Les paramètres cinétiques sont extraits de la représentation de Hanes-Woolf (figure 25b et d). Il est à noter que cette représentation linéaire permet d'obtenir de meilleurs coefficients de corrélations ($R^2 > 0,99$ excepté pour la FDH native en absence de LI où le R^2 est de 0,98) et malgré une légère différence entre les valeurs obtenues par l'ajustement non linéaire de l'équation de Michaelis-Menten (figure 25a et c) et celles obtenues par l'ajustement linéaire de l'équation de Hanes-Woolf, les résultats ainsi que leur interprétation restent les mêmes.

En solution aqueuse, le greffage des cations **1a-b** et **3** augmente la valeur de la constante de Michaélis pour le NAD^+ (K_M^{NAD}) de 1,8 à 3,6 fois (figure 25e). La valeur de k_{cat} varie peu selon les modifications réalisées (de 53.10^3 à 81.10^3 min^{-1}), ce qui induit que l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{NAD}) soit directement liée au K_M^{NAD}. L'efficacité catalytique varie peu pour le cation **1a** et est diminuée de 2,2 et de 2,9 fois respectivement pour les cations **1b** et **3** en raison de leur K_M (figure 25e). En solution aqueuse les enzymes modifiées sont donc moins efficaces pour la réduction du NAD^+ que l'enzyme native.



(e)

	sans [MMIm][Me_2PO_4]			30 % (v/v) [MMIm][Me_2PO_4]		
	K_M^{NAD+} (µM)	k_{cat} (× 10^3 min^{-1})	k_{cat}/K_M^{NAD+} ($min^{-1}.µM^{-1}$)	K_M^{NAD+} (µM)	k_{cat} (× 10^3 min^{-1})	k_{cat}/K_M^{NAD+} ($min^{-1}.µM^{-1}$)
Wt	43	53	1236	177	78	440
1a	79	81	1019	101	103	1022
1b	156	67	427	38	60	1606
3	120	67	561	123	73	592

*Figure 25 : Paramètres cinétiques de la FDH native (●) et modifiée par les cations **1a**(□), 1b (■) et **3** (○) mesurés en présence (a et b) ou en absence (c et d) de 30% (v/v) de **LI-1** dans du tampon carbonate 50 mM pH 9,7. La représentation non linéaire de Michaelis-Menten est présentée en a et c. Les paramètres cinétiques sont extraits de la représentation linéaire de Hanes-Woolf (b et d) et reportés dans un tableau (e). Les activités enzymatiques sont mesurées en présence d'une concentration fixe de fomiate (300 mM) et de différentes concentrations de NAD^+ (0,025 - 3,2 mM). La concentration de FDH est de 0,3 µM.*

La réduction de l'efficacité catalytique des enzymes modifiées pourrait être due à la gène stérique occasionnée par le greffage des cations à la surface de l'enzyme. Autrement dit, en solution aqueuse, ces cations vont probablement venir gêner la fixation du NAD^+ au niveau du site catalytique (voir section III. 2. 2. B. 2.).

En présence de 30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4], la valeur de K_M^{NAD} de l'enzyme non modifiée est 4 fois supérieure à la valeur calculée en solution aqueuse tandis que la valeur de K_M^{NAD} de la FDH-**1a** ne varie que très légèrement, qu'elle reste constante pour le cation **3** et qu'elle est inférieure pour le cation **1b**. Ceci signifie qu'en présence de 30% (v/v) de **LI-1**, les enzymes modifiées fixent plus fortement le NAD^+ que l'enzyme sauvage. En présence de ce LI, le k_{cat} augmente légèrement pour toutes les enzymes et là encore, l'efficacité catalytique va essentiellement dépendre du K_M^{NAD}. L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{NAD}) de l'enzyme native diminue de 2,8 fois en présence de LI tandis que l'efficacité catalytique des enzymes modifiées par les cations **1a** et **3** est similaire à celle observée dans le tampon. En présence de LI, la valeur de l'efficacité catalytique de la FDH-**1b** est 3 fois supérieure à celle observée dans le tampon.

En absence de LIs, l'efficacité catalytique des enzymes modifiées est inférieure à celle de l'enzyme sauvage. Inversement, en présence de LI, l'efficacité catalytique des enzymes modifiées est supérieure à celle de l'enzyme sauvage. L'amélioration de l'efficacité catalytique en présence de LI pourrait être due au fait que les cations greffés à la surface de l'enzyme préservent cette dernière de l'interaction dénaturante avec le LI. La préservation de la structure de l'enzyme des enzymes modifiées en présence de LI expliquerait les plus faibles valeurs de K_M^{NAD}.

III. 2. 2. F. Temps de demi-vie de la FDH native et modifiée en LI

L'effet du greffage des cations **1a-b** et **3** à la surface de la FDH ainsi que l'effet de **LI-1** en solution sur les temps de demi-vie de l'enzyme ont été étudiés. L'activité des différentes enzymes en solution aqueuse ou en présence de 37,5% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] a été mesurée toutes les 24 heures jusqu'à inactivation totale de l'enzyme.

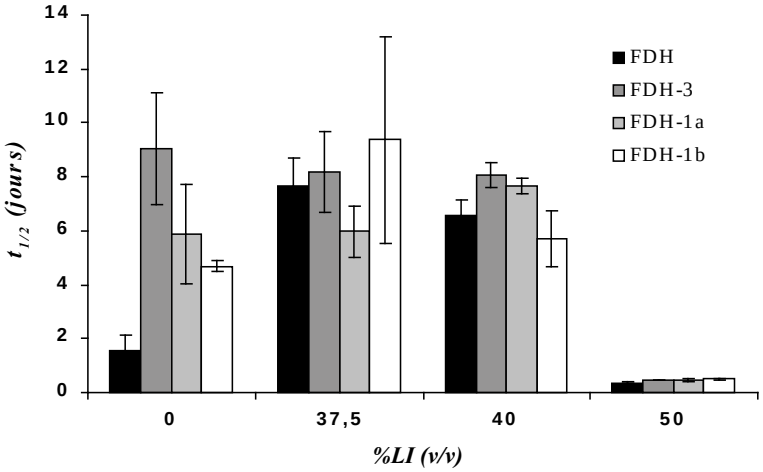


*Figure 26 : Stabilité de la FDH (0,3 µM) native ou modifiée par les cations **1a-b** et **3** dans du tampon carbonate (25 mM, pH 9,7) ou en présence de 37,5; 40 ou 50 % (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. La FDH native est en noir tandis que les enzymes modifiées par les cations **3**, **1a** et **1b** sont respectivement en gris foncé, gris clair et en blanc.*

En présence de 37,5-40% (v/v) de **LI-1**, la valeur de temps de demi-vie de l'enzyme non modifiée est plus importante. En solution aqueuse, le temps de demi-vie est de 1,5 jours (± 0,6 jour) tandis qu'en présence de 37,5% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] la stabilité de l'enzyme non modifiée est 5 fois supérieure, son temps de demi-vie est de 7,6 jours (± 0,6 jour) (figure 26).

L'effet stabilisant du [MMIm][Me_2PO_4] a déjà été observé pour l'alcool déshydrogénase (ADH) de *Rhodococcus erythropolis*. Le temps de demi-vie de cette déshydrogénase est augmenté d'un facteur de 2,3 en présence de 10% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Cependant, l'effet stabilisant de **LI-1** ne s'applique pas à toutes les enzymes, ce même LI diminue le temps de demi-vie de la glucose déshydrogénase d'un facteur de 1,2 (Hussain W *et al.*, 2008). Le mécanisme par lequel les LIs miscibles à l'eau stabilisent les enzymes est un sujet en cours d'étude. L'amélioration de la stabilité temporelle est très probablement liée à la stabilisation de la structure de l'enzyme en présence de LI; un phénomène résultant de l'interaction directe entre ces sels chargés et les résidus polaires des protéines exposés au solvant (Fujita K *et al.*, 2006; Zhao H *et al.*, 2006a; Micaelo NM et Soares CM, 2008). Les ions composants le LI jouent un

rôle important dans ces phénomènes de stabilisation, les LIs composés d'un anion de grande taille (kosmotrope) et un cation de petite taille (chaotrope) étant considéré comme des LIs ayant le plus de chance d'avoir des propriétés stabilisatrices (Zhao H *et al.*, 2006a; Zhao H, 2006).

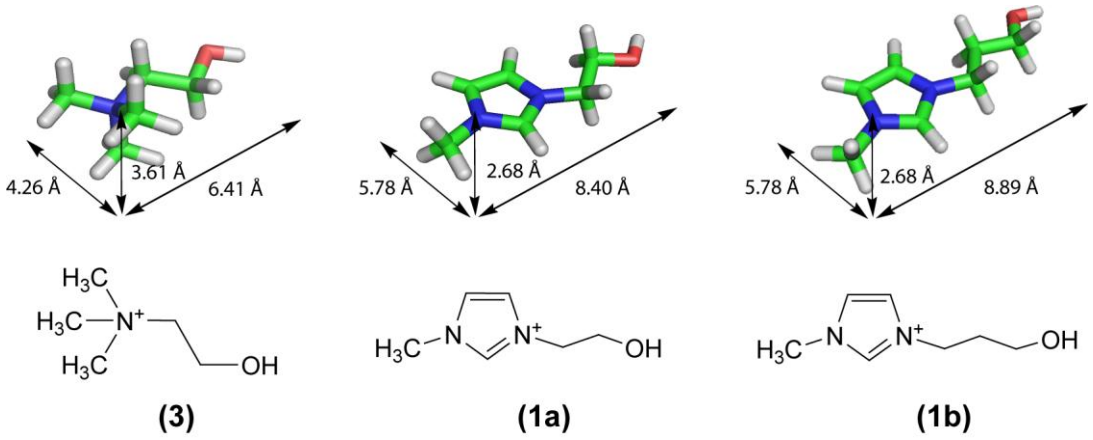


Schéma 58 : Structures et dimensions des cations utilisés.

D'autre part, le greffage de cations analogues aux cations des LIs améliore le temps de demi-vie de la FDH en solution aqueuse. Le temps de demi-vie des enzymes modifiées est de 4,7 à 9 jours, ce qui correspond à une amélioration du temps de demi-vie d'un facteur de 3 à 6 respectivement pour la FDH-**1b** et la FDH-**3**. Les enzymes modifieées par les cations **1a-b** et **3** conservent leur activité au cours du temps ce qui pourrait correspondre au maintien d'une partie de la conformation de la FDH. Les cations chargés étant situés à la surface de la structure tridimensionnelle de la FDH, ces derniers pourraient favoriser les répulsions électrostatiques entre les enzymes et donc prévenir l'agrégation. En présence de LI, l'effet stabilisateur des cations greffés n'est pas distinguable de l'effet du LI seul. Autrement dit, l'effet stabilisateur du LI seul est dominant par rapport à l'effet des cations greffés. Ces deux types de stabilisation ne sont pas complémentaires excepté pour le cation **1b** où la présence de LI améliore le temps de demi-vie de l'enzyme modifiée d'un facteur de 2, le $t_{1/2}$ est de 4,7 jours en solution aqueuse et de 9,4 jours en présence de 37,5% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Le cation **1b** étant le plus grand (schéma 58) et donc le plus kosmotrope, ce dernier a un effet stabilisant moindre en solution aqueuse. Par conséquent, en présence de 37,5-40% (v/v) de **LI-1**, l'effet stabilisateur du LI étant plus important, un effet stabilisant complémentaire est observé.

En solution aqueuse, l'effet stabilisant des cations greffés est d'autant plus important que le cation est de petite taille et que son coefficient de viscosité B est faible (schéma 58). Ainsi, le coefficient de viscosité B du cation **3** est le plus faible (B = 0,380 $dm^3.mol^{-1}$), il augmente avec

le cation **1a** (B = 0,491 $dm^3.mol^{-1}$) et le cation **1b** (B = 0,516 $dm^3.mol^{-1}$). L'effet stabilisant des LIs pourrait donc être simulé en greffant le cation à la surface de l'enzyme. Par extension ces résultats suggèrent que la stabilisation des enzymes en LIs est un phénomène se déroulant au niveau de la couche d'hydratation des enzymes et plus précisément en raison de l'interaction des ions composant le LI avec les structures protéiques.

III. 2. 2. G. Evaluation de la structure par atténuation de fluorescence

La structure de l'enzyme sauvage et des enzymes modifiées par les cations **1a-b** et **3**, en présence de 0-40% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4], a été analysée par atténuation de fluorescence en présence d'iode. L'iode a été choisi comme agent atténuateur car il est plus sensible aux légères variations structurales (figure 15, section III. 1. 3. F). L'atténuation de la fluorescence de la FDH par l'acrylamide permet de détecter de grandes variations structurales et les informations concernant la structure de la FDH dans le [MMIm][Me_2PO_4] avec cet agent atténuateur sont limitées dans la mesure où ces variations sont observées sur une seule concentration de LI (40% (v/v)) (figure 15).

La fluorescence des enzymes est mesurée en présence de différentes concentrations d'iode. Les résultats sont analysés avec la relation de Stern-Volmer et les K_{SV}^{I} sont extraits de cette formule (équation 18).

En solution aqueuse, le K_{SV}^{I} de l'enzyme sauvage est inférieur au K_{SV}^{I} des enzymes modifiées par les cations **1a-b** et **3** (figure 27a). Les enzymes modifiées sont donc moins compactes et structurées que l'enzyme non modifiée en solution aqueuse, ce qui signifie que le greffage des cations induit le dépliement partiel de l'enzyme. Ce résultat explique pourquoi les enzymes modifiées sont moins efficaces en solution aqueuse (figure 24 et 25).

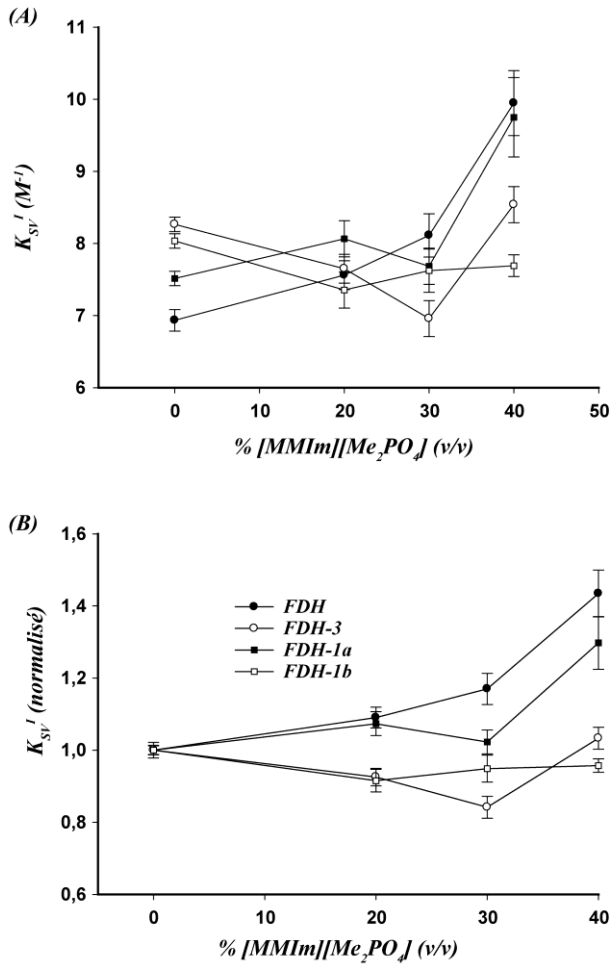


*Figure 27 : Atténuation de la fluorescence de la FDH sauvage et modifiée par de l'iode en présence de différentes concentrations de LIs. Les K_{SV}^{I} correspondant à l'atténuation de la fluorescence de la FDH native (●), la FDH-**3** (○), la FDH-**1a** (■) et la FDH-**1b** (□), à différentes concentrations de LIs, sont reportés en valeurs absolues (a) ou normalisées (b).*

Entre 0 et 40% (v/v) de **LI-1**, la valeur de K_{SV}^{I} de la FDH non modifiée augmente tandis que la valeur de K_{SV}^{I} des enzymes modifiées reste constant voir diminue entre 0 et 30% (v/v) de **LI-1** (figure 27). Le report des K_{SV}^{I} normalisés par rapport aux K_{SV}^{I} obtenus dans le tampon, en fonction de la concentration de **LI-1** montre que les enzymes modifiées sont moins sensibles à l'effet dénaturant du LI : en présence de 40% (v/v) de LI, la valeur de K_{SV}^{I} augmente de 40% pour l'enzyme native, de 30% pour la FDH-**1a** et varie peu pour la FDH-**1b** et **3** (figure 27b). En présence de 40% (v/v) de **LI-1**, l'état structural est inversé, le K_{SV}^{I} des enzymes modifiées est inférieur au K_{SV}^{I} de la FDH native (figure 27a). La FDH native est donc moins structurée que les enzymes modifiées en présence de 40% (v/v) de **LI-1**. Cette donnée explique pourquoi les enzymes modifiées ont une activité et des paramètres cinétiques améliorés en présence 30-40% (v/v) de LI par rapport à l'enzyme non modifiée (figure 24 et 25).

III. 2. 3. Conclusions et perspectives sur les modifications covalentes de la FDH

Dans le domaine des réactions biocatalysées en LIs, la modification d'enzymes par des cations analogues des LIs, développée au cours de cette thèse, est une nouvelle approche pour améliorer l'activité et la stabilité des enzymes en présence de LIs miscibles à l'eau.

Une partie des travaux réalisés au cours de cette thèse se sont intéressés à la biocatalyse en présence de LIs miscibles à l'eau afin de s'affranchir des contraintes de partition/diffusion des espèces réactives et de s'intéresser plus particulièrement aux effets que le LIs peuvent avoir sur la structure protéique. Le greffage de cations analogues aux LIs a été réalisé dans l'objectif de préserver la structure protéique de l'interaction directe des LIs et de réduire les effets dénaturants de ces derniers.

L'analyse du nombre de modification montre que les enzymes modifiées forment des populations hétérogènes de biocatalyseurs comportant un nombre variable de cations. Le nombre moyen de cation greffé dépend à la fois de la nature et de la taille du cation. Plus le cation est volumineux et kosmotrope, plus le nombre de modifications est important. Ce phénomène s'explique par le fait que les cations volumineux tendent à déstabiliser/dénaturer les protéines ce qui faciliterait l'accès à des résidus de lysines difficilement accessibles sur l'enzyme native. Les modifications sont préférentiellement localisées sur des résidus de lysines situés à la surface de l'enzyme et exposés au solvant.

Le greffage de cations à la surface de la FDH réduit son activité en solution aqueuse la rendant inactive lors de l'utilisation des cations volumineux **1c-d** et **2c-d**. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les cations **1c-d** et **2c-d** déplient l'enzyme de telle sorte qu'elle ne soit plus active. Le greffage des cations **1a-b** ou **3** préserve l'activité de la FDH à des concentrations de [MMIm][Me_2PO_4] supérieures à 40% (v/v) tandis que l'enzyme sauvage est inactive dans ces conditions. En présence de 30% (v/v) de LIs, les enzymes modifiées par les cations **1a-b** et **3** ont des valeurs de K_M^{NAD} inférieures et des valeurs de k_{cat}/K_M^{NAD} supérieures à celles de l'enzyme non modifiée. L'évaluation de la structure de l'enzyme par atténuation de fluorescence, en présence d'un agent atténuateur dynamique, montre que le greffage des cations **1b** et **3** à la surface de la FDH améliore sa stabilité structurale en LI. Bien que les enzymes modifiées soient partiellement dépliées en solution, le dépliement de la FDH en présence de

concentrations croissantes de LI est moins important lorsque les cations **1b** et **3** sont greffés à sa surface. En présence de 40% (v/v) de **LI-1**, les enzymes modifiées sont plus structurées que l'enzyme sauvage. Le [MMIm][Me_2PO_4] seul, à 37,5-40% (v/v), augmente le temps de demi-vie de la FDH. Le greffage de cations analogues aux cations des LIs à la surface de la FDH améliore la stabilité de l'enzyme en solution aqueuse. Cet effet n'est pas additif à la stabilisation du LI. L'effet stabilisateur des cations greffés varie selon la nature et la taille du cation mimant ainsi l'effet stabilisateur ou dénaturant lorsque ces mêmes cations composent un LI.

En plus d'améliorer le temps de demi-vie et de préserver, dans une moindre mesure, la structure de la FDH en présence de LIs, le greffage de cations analogues aux LIs à la surface de l'enzyme permet de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'inactivation des enzymes dans ces milieux.

Outre l'utilisation de cette méthode pour l'amélioration des performances des biocatalyseurs en LIs; cette méthode est, d'un point de vue théorique, un outil permettant d'étudier le lien pouvant exister entre la taille du cation et l'effet qu'il peut avoir sur les structures protéiques (Ciaccafava A *et al.*, 2011).

La méthode de greffage conduit à des populations hétérogènes de biocatalyseur. Afin d'avoir une analyse plus détaillée, l'idéal serait d'isoler des populations homogènes de biocatalyseur comportant un nombre donné de modifications à des positions précises ce qui permettrait de discerner les modifications responsables de l'amélioration de l'activité enzymatique des modifications réduisant l'activité enzymatique.

Les résidus de lysines à proximité du site actif de la FDH (K236 et K291) pourraient être mutés, en leucine par exemple, afin de réduire les gènes stériques éventuellement occasionnées lors de la modification de ces résidus.

III. 3. Evolution dirigée de la FDH

III. 3. 1. Principe de la méthode d'évolution dirigée

La FDH de *Candida boidinii* a été mutée de manière aléatoire avant d'obtenir des mutants dont l'activité et la stabilité en LI seront accrues. L'objectif est, en plus d'obtenir un biocatalyseur actif en LI, d'analyser les mutations responsables de cette activité afin de mieux comprendre le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'inactivation et de la dénaturation des enzymes en LI. Ultérieurement, cette étude permettrait de développer des méthodes afin d'optimiser l'activité et la stabilité des biocatalyseurs en LI (voir section I. 2. 5. B. 2. a.; schéma 20).

III. 3. 2. Production de la FDH en système bactérien

III. 3. 2. A. Amplification du gène de la FDH et clonage dans le vecteur pET-28b

Le gène codant pour la FDH de *Candida boidinii* (entrée EMBL : AJ245934; 1095 paires de bases; entrée Uniprot : O13437) a été synthétisé par la société GenScript®. Le gène est fourni dans le vecteur pUC57 (pUC57-FDH), la séquence est insérée entre les sites de restriction BamHI/XbaI (voir section II. 2. *3*-A.). La présence de l'insert dans le vecteur commercial est vérifiée par la digestion BamHI/XhoI par électrophorèse en gel d'agarose (figure 28). Le vecteur seul, non digéré, montre plusieurs bandes correspondant à des formes moins enroulées dont une bande majoritaire située entre 2,5 et 3 kb (kilo bases soit 10^3 pb) (figure 28, puit 1). Après digestion par BamHI ou XhoI, une seule bande est observée entre 3000 et 4000 pb (figure 28, puit 2 et 3). Cette bande correspond au vecteur pUC57-FDH, sa taille est de 3824 pb (annexe II). Après digestion par le couple BamHI/XhoI, deux bandes sont observées : une bande entre 2500 et 3000 pb correspondant au vecteur pUC57 seul dont la taille est de 2706 pb, et une bande entre 1000 et 1500 pb correspondant à la séquence codant pour la FDH, de 1118 pb (figure 28, puit 4; annexe II-b).

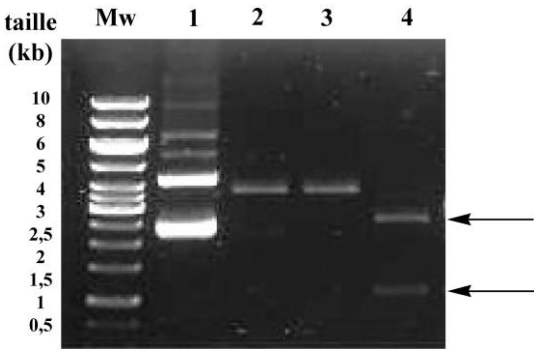


Figure 28 : Digestion de pUC57-FDH par les enzymes de restrictions BamHI et/ou XhoI. Image du gel d'agarose 0,7% révélé sous UV. La taille des bandes du marqueur de poids moléculaire (Mw) en kilo bases est reportée sur la gauche du gel. La piste 1 correspond au vecteur non digéré et les digestions par BamHI seule, XhoI seule ou le couple BamHI/XhoI sont respectivement déposées sur les pistes 2; 3 et 4.

Le vecteur pUC57-FDH est amplifié par la culture des cellules *E. coli* DH10B. Le gène codant pour la FDH est ensuite inséré dans le vecteur d'expression pET-28b puis transformé par choc thermique dans les bactéries *E. coli* BL21 prévues pour l'expression. Les *E. coli* BL21 codent pour la T7 RNA polymérase et permettent donc l'expression de la FDH après induction à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (voir section II. 2. 3. A. 1. b.).

Les cellules contenant le vecteur recombinant sont sélectionnées sur un milieu contentant de la kanamycine. Après amplification des cellules et extraction de l'ADN plasmidique, la présence du vecteur d'expression contenant l'insert (pET-28b-FDH) est vérifiée par la double digestion BamHI/XhoI (figure 29). En absence d'enzyme de restriction, le vecteur pET-28b-FDH existe essentiellement sous forme enroulée, ce dernier consiste en une bande à proximité du marqueur de 5000 pb tandis que sa taille théorique est de 6446 pb (annexe II). Après digestion par les enzymes de restriction BamHI ou XhoI, une bande est visible entre 6000 et 8000 pb correspondant au vecteur pET-28b-FDH dont la taille est de 6446 pb (figure 29, piste 2 et 3; annexe II-a). Après digestion par le couple BamHI/XhoI, l'insert correspondant à la séquence de la FDH est isolé du vecteur et deux bandes sont visibles : la première correspond au vecteur pET-28b seul (5328 pb) et la seconde correspond à l'insert (1124 pb) (figure 29, piste 4). La séquence codant pour la FDH a donc bien été clonée dans le vecteur d'expression pET-28b.

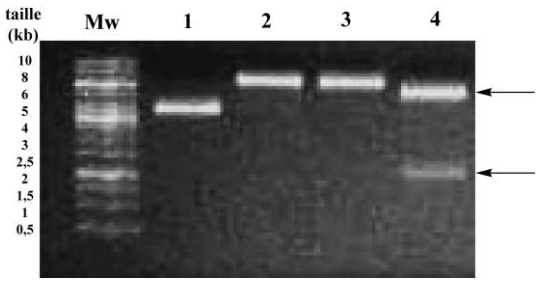


Figure 29 : Digestion de pET-28b-FDH par les enzymes de restrictions BamHI et/ou XhoI. Image du gel d'agarose 0,7% révélé sous UV. La taille de bandes du marqueur de poids moléculaire en kilo bases est reporté sur la gauche du gel. La piste 1 correspond au vecteur non digéré et les digestions par BamHI seule, XhoI seule et BamHI/XhoI sont respectivement déposés sur les pistes 2 ; 3 et 4.

Le vecteur pET-28b-FDH est séquencé en présence d'amorces se fixant au niveau du promoteur et de la séquence de terminaison du phage T7, situées de part et d'autre de l'insert sur le vecteur pET-28b (annexe I et II). Si l'on considère la séquence de l'insert, soit 1124 pb au total; 844 pb sont alignées avec la séquence déterminée en présence de l'amorce T7 Pro. (de 1 à 844 pb) et 900 pb sont alignées avec la séquence déterminées en présence de l'amorce T7 ter (de 225 à 1124).

Le séquençage du vecteur pET-28b-FDH confirme donc la présence de l'insert cloné BamHI/XhoI dans le vecteur pET-28b. Ce vecteur sera utilisé pour toutes les expériences qui suivront pour l'expression de la formiate déshydrogénase sauvage (FDH-Wt).

III. 3. 2. B. Expression de la FDH dans *E. coli BL21*

Les cellules *E. coli* BL21 sont transformées par choc thermique, soit par le vecteur vide (pET-28b), soit par le vecteur recombinant (pET-28b-FDH), et mises en culture à 37°C sur la nuit. Au temps 0 de l'expérience, l'expression de la FDH est induite par l'ajout d'1 mM d'IPTG dans le milieu de culture. L'activité de l'extrait cellulaire brut d'un aliquot de cellule est mesurée toutes les heures afin de contrôler l'expression de la FDH (figure 30). L'activité est reportée en activité spécifique rapportée à la quantité totale de protéine présente dans l'essai. Au temps 0 de l'induction, aucune activité formiate déshydrogénase n'est observée (figure 30), cela est également le cas des cellules *E. coli* BL21 seule ou transformée par le vecteur pET-28b ne codant pas pour la FDH. L'activité enzymatique augmente entre 1 et 5 heures d'induction, l'activité spécifique maximale est observée après 5h d'induction (figure 30). Après 5 h d'induction, l'activité spécifique diminue légèrement, probablement en raison de l'importante production de FDH dans le milieu intracellulaire pouvant conduire à la formation de corps

d'inclusion réduisant ainsi l'activité spécifique en raison d'intéractions hydrophobes dénaturantes. Le temps d'induction est donc fixé à 5h.

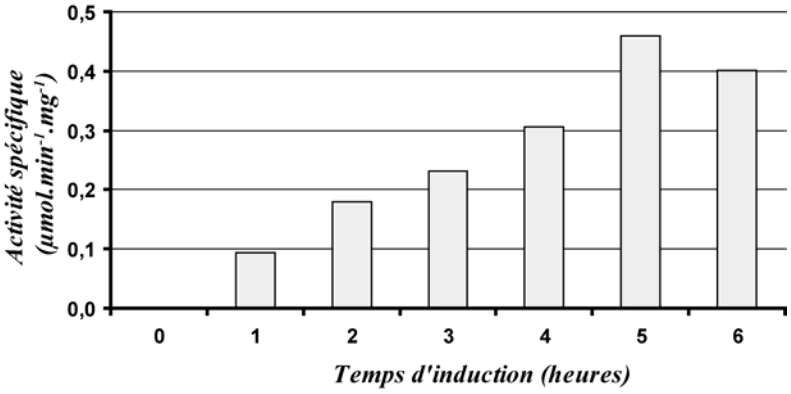


Figure 30 : Mesure de l'activité formiate déshydrogénase à différents temps d'induction. L'activité est reportée en activité spécifique rapportée à la quantité totale de protéine présente dans l'essai.

III. 3. 2. C. Purification de la FDH

La purification de la FDH se décompose en deux étapes. Dans un premier temps, l'enzyme est purifiée par un procédé de séparation en deux phases aqueuses ("ATPS" : Aqueous Two Phases Separation) (voir section II. 2. 3. E. 1.) (Ansorge-Schumacher MB *et al.*, 2006), puis dans un second temps, le produit de la purification par ATPS est passé sur une colonne d'hydroxyapatite (Schutte H *et al.*, 1976). L'élution de la FDH est réalisée en augmentant la concentration en ions phosphates dans la colonne.

	Quantité de protéines (mg)	Activité spécifique ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)	Facteur de purification	Rendement
Extrait cellulaire brut	285,68	0,0208		
ATPS	29	0,11	19	56%
Hydroxyapatite	0,42	2,4	115	17%

Tableau 16 : Tableau de purification. Les quantités de protéines sont estimées selon la méthode de Bradford. Les activités spécifiques sont rapportées à la quantité de protéine dans l'essai. Le facteur de purification est calculé à partir des activités spécifiques et le rendement est estimé selon l'activité totale récupéré par rapport à l'activité totale de départ.

Avant purification, le contenu des cellules induites forme une trainée de bandes, sur SDS-PAGE, où la FDH forme une bande plus large et intense (figure 31, piste 1). L'activité spécifique de l'extrait cellulaire brut est de 0,02 µmol.min^{-1}.mg^{-1} et une quantité totale de 285,68 mg de protéines sont utilisées (tableau 16). Après purification par ATPS, la FDH est facilement discernable, cependant, un certain nombre de bandes contaminantes persistent et notamment une bande intense aux alentours 45 kDa (figure 31, piste 3). A cette étape, l'activité spécifique est de 0,11 µmol.min^{-1}.mg^{-1} ce qui correspond à un facteur de purification de 19 par rapport à l'activité spécifique de départ. La quantité de protéine récupérée est de 29 mg ce qui correspond à un rendement de 56% si l'on considère l'activité totale disponible dans l'extrait cellulaire de départ et l'activité totale récupérée à cette étape (tableau 16).

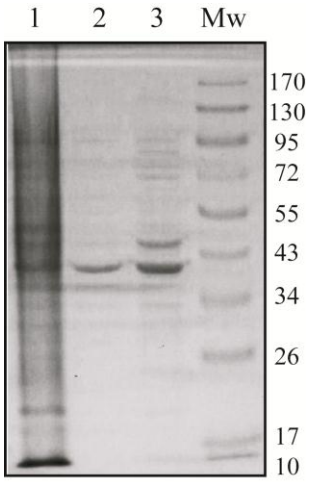


Figure 31 : Contrôle des purifications de la FDH par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les cellules induites à l'IPTG sont directement déposées sur la piste 1 (2µl de cellules), les protéines issues de la purification par ATPS puis sur hydroxylapatite sont respectivement déposées sur les pistes 3 et 2 (5 µg). La taille des marqueurs de poids moléculaire (Mw) en kDa est reportée sur la droite du gel.

La purification sur hydroxyapatite conduit à l'obtention d'une bande majoritaire, en dessous de 43 kDa, correspondant à la FDH (40,4 kDa). Les bandes contaminantes sont négligeables et la bande de 45 kDa observée après ATPS est éliminée (figure 31, piste 1). La FDH commence à être éluée à partir de 20 mM d'ions phosphate dans la colonne (figure 32). Les fractions les plus actives sont obtenues par le passage d'une solution à 60 mM d'ions phosphates. Le pic d'élution de la FDH est relativement large, par conséquent, un certain nombre de protéines contaminantes persistent dans les premières fractions actives (annexe VIII). Seules les fractions obtenues après

le passsage de la solution à 60 mM d'ion phosphate sont récupérées. Après hydroxyapatite, l'activité spécifique est de 2,4 µmol.min^{-1}.mg^{-1}, le facteur de purification par rapport à l'extrait de départ est de 115. La quantité d'enzyme récupérée est de 0,42 mg ce qui correspond à un rendement de 17% par rapport à l'activité disponible dans l'extrait de départ (tableau 16).

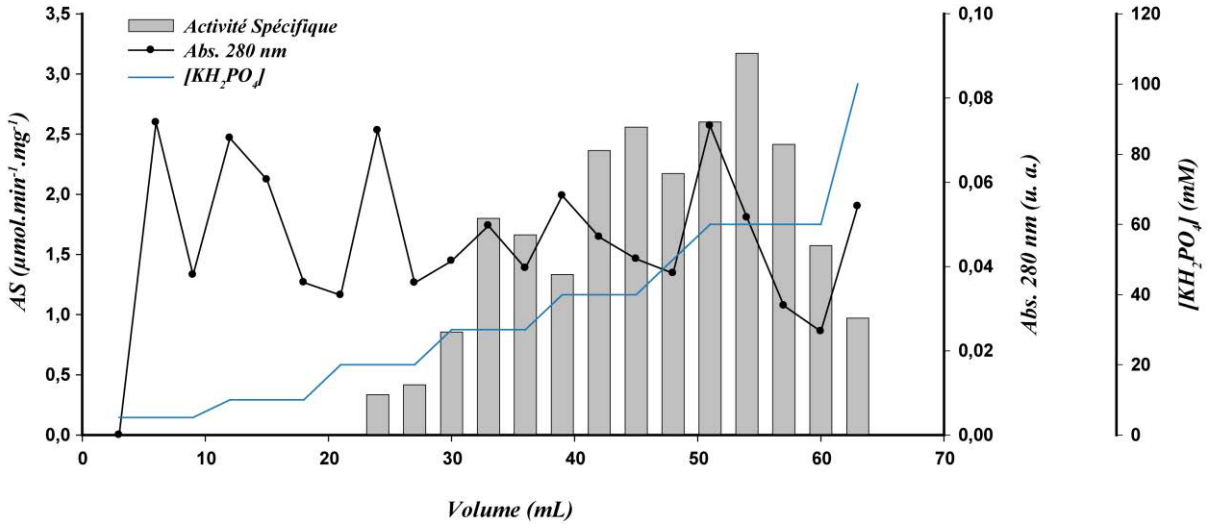


Figure 32 : Purification sur chromatographie d'hydroxylapatite en basse pression. L'élution de la FDH est réalisée par le passage successif de solutions à différentes concentrations d'ion phosphate (pH 7,4) dans la colonne (coubre bleue). L'activité spécifique (AS) est représentée par des barres grises, l'absorption à 280 nm par une courbe noire. Des fractions de 3 mL sont collectées.

Ces facteurs de purification, de l'ordre de plusieurs dizaines, s'expliquent par le fait que la FDH est surexprimée dans les bactéries *E. coli* BL21. Elle est par conséquent présente en grande quantité dans l'extrait cellulaire brut de départ. Le rendement de 17% après hydroxylapatite s'explique par le fait que cette chromatographie échangeuse d'ions n'est pas spécifique de la FDH, ce qui conduit à la formation d'un pic d'élution étalée entre 20 et 60 mM.

III. 3. 3. Mutagenèse aléatoire par PCR de basse fidélité

L'évolution d'une enzyme nécessite la mise en place d'une stratégie prenant en considération l'adéquation entre les moyens à disposition et le résultat escompté. Deux stratégies d'évolution sont communément utilisées. La première consiste à introduire un nombre important de mutations et de réaliser un faible nombre de cycle d'évolution, la bibliothèque ainsi créée contient une très grande variété de mutants avec un grand nombre de mutants inactifs. L'avantage de cette approche est qu'elle permet d'obtenir rapidement un mutant avec le paramètre désiré. L'inconvénient est que la taille de la banque de mutants créée est très grande (de l'ordre de 10^8 mutants) avec un nombre important de séquences redondantes. Or, les méthodes de criblage sont généralement limitées à des librairies de 10^4 mutants. La réussite tient essentiellement de la capacité de cribler un très grand nombre de mutants (Arnold FH, 1998). De plus, les mutations ont parfois des effets antagonistes, or, cette méthode ne permet pas de discriminer les mutations bénéfiques et omet l'analyse et la compréhension de ces mutants au profit des résultats.

La seconde approche d'évolution consiste à introduire un faible nombre de mutations et de réaliser plusieurs cycles d'évolution. La taille des banques, le nombre de mutant inactifs et la redondance sont donc plus faibles. Lors de cette approche, il n'est pas nécessaire de cribler un grand nombre de mutants pour espérer en obtenir un avec le paramètre désiré. Le faible nombre de mutations permet l'analyse pas à pas des mutations bénéfiques. L'évolution idéale est donc de réaliser la mutation d'un acide aminé par cycle et de cumuler les mutations bénéfiques (Arnold FH, 1998).

L'approche consistant à introduire un petit nombre de mutation a été utilisée au cours de cette thèse. Parmi les différentes techniques existantes pour introduire de la variabilité génétique, la PCR de basse fidélité a été choisie pour sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre. Le premier objectif a donc été de trouver des conditions réactionnelles de PCR permettant l'introduction d'un nombre restreint de mutations afin que ces dernières s'expriment au niveau protéique par un ou deux acides aminés modifiés. La difficulté de notre approche est de trouver des conditions favorisant les mutations tout en permettant à la PCR de se dérouler. En plus d'utiliser la Taq polymérase, qui favorise l'introduction de mutations en ne corrigeant pas les erreurs, deux conditions réactionnelles ont été testées : l'utilisation de concentrations biaisées en nucléotides et l'ajout de manganèse, un cation augmentant le taux d'erreurs de la Taq polymérase.

III. 3. 3. A. PCR en présence de concentrations biaisées de désoxynucléotides

La PCR sur le gène de la FDH a été réalisée en présence de deux fois plus de bases puriques (adénine, guanine) que de bases pyrimidiques (cytosine, thymidine) (Wong TS *et al.*, 2006). Cette condition de PCR n'empêche pas la PCR de se dérouler et conduit à un produit de PCR de la taille de l'insert (figure 33, pistes 7 à 11). Les produits de PCRs sont clonés dans le vecteur pET-28b puis transformés dans des bactéries *E. coli* BL21. Afin d'évaluer le taux d'erreur induit selon cette condition, l'ADN plasmidique issu de trois clones différents, sélectionnés sur kanamycine, est séquencé. Aucune des trois séquences ne présente de mutations. Il est probable que le biais en désoxynucléotide ne soit pas suffisant pour l'obtention de mutations. L'utilisation de manganèse dans le milieu a donc été testée.

III. 3. 3. B. PCR en présence de manganèse

L'ajout de 250 µM de manganèse dans le milieu réactionnel conduit à l'obtention d'un produit de PCR de 1416 pb correspondant à l'insert (figure 33, pistes 2 à 6). Les produits de PCR sont clonés dans le vecteur pET-28b, transformés dans des bactéries *E. coli* BL21 puis sélectionnés sur kanamycine. L'ADN plasmidique de trois clones différents est séquencé (figure 34, clones Mn_1, Mn_2 et Mn_3).

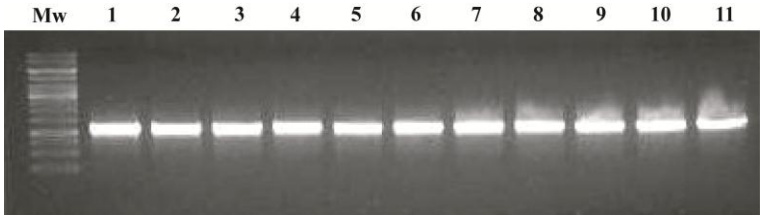


Figure 33 : Contrôle des PCR de basse fidélité. Gel d'agarose 0,7%. De gauche à droite, le premier puit correspond au marqueur de taille similaire à celui utilisé lors des gels d'agarose précédents, le second puit à une PCR classique (1), les cinq suivants à des PCR en présence de concentrations biaisées de dNTPs (2 à 6) et les cinq derniers puits correspondent à des PCR en présence de 250 µM de Mn^{2+} (7 à 11).

Au total, 7 mutations sont dénombrées pour 3002 pb séquencées; le taux de mutation moyen est donc estimé à 2,5 mutations pour 1000 pb (figure 34). Sur les 7 mutations observées, 6 sont des transitions, de purine à purine (A → G, ×3) ou de pyrimidine à pyrimidine (T → C, ×2 et C → T) et une correspond à une transversion de pyrimidine à purine (C → G). Au niveau protéique les mutations se traduisent par le changement de 2 acides aminés en moyenne (figure 35).

```
Mn_1            TGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAGTT 240
Mn_2            TGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATT 240
Mn_3            TGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATT 239
FDH-Wt          TGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATT 83
                ******************************************************** **

Mn_1            AGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAACTACTACTTCTGATAAAGA 300
Mn_2            AGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGA 300
Mn_3            AGGTATTGCCAATCGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGA 299
FDH-Wt          AGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGA 143
                ************* *************************** ******************

Mn_1            AGGTGAAACAGGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCC 360
Mn_2            AGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCGCCACTCC 360
Mn_3            AGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCC 359
FDH-Wt          AGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCC 203
                ********** ***************************************** *******

Mn_1            TTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGT 420
Mn_2            TTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGT 420
Mn_3            TTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGT 419
FDH-Wt          TTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGT 263
                ************************************************************

Mn_1            CGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAA 480
Mn_2            CGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAA 480
Mn_3            CGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAA 479
FDH-Wt          CGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAA 323
                ************************************************************

Mn_1            GAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGT 540
Mn_2            GAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGT 540
Mn_3            GAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGT 539
FDH-Wt          GAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGT 383
                ************************************************************

Mn_1            CATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCA 600
Mn_2            CATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCA 600
Mn_3            CATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCA 599
FDH-Wt          CATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCA 443
                ************************************************************

Mn_1            CGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGC 660
Mn_2            CGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGC 660
Mn_3            CGATTGGGAGGTTGTTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGC 659
FDH-Wt          CGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGC 503
                ************** *********************************************

Mn_1            TACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCC 720
Mn_2            TACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCC 720
Mn_3            TACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCC 719
FDH-Wt          TACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCC 563
                ************************************************************
```

```
Mn_1            AAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGG 780
Mn_2            AAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGG 780
Mn_3            AAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGG 779
FDH-Wt          AAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGG 623
                ************************************************************

Mn_1            TGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAA 840
Mn_2            TGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAA 840
Mn_3            TGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAA 839
FDH-Wt          TGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAA 683
                ************************************************************



Mn_1            TGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAA 900
Mn_2            TGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAA 900
Mn_3            TGCTCCATTACACGCAGGTAGAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAA 899
FDH-Wt          TGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAA 743
                ******************** ***************************************

Mn_1            AAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGC 960
Mn_2            AAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGA-GATGTTGC 959
Mn_3            AAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGC 959
FDH-Wt          AAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGC 803
                ************************************************* ********
```

Figure 34 : Alignement des séquences géniques issues de la PCR de basse fidélité en présence de Mn^{2+} (250 µM). L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence nucléotidique ClustalW2. Les étoiles correspondent à un alignement strict et les mutations sont en rouge. Les pb sont numérotées selon la séquence du gène de la FDH de Candida boidinii; entrée EMBL : AJ245934. Mn_1 à 3 sont les séquences géniques issue de trois clones différents transformés par le vectreur pET-28b contenant l'insert obtenu après une PCR en présence de 250 µM de Mn^{2+}. La FDH sauvage est notée FDH-Wt ("Wild type").

La mutation d'un nucléotide peut conduire à l'obtention d'un codon stop (mutation non sens) ou du même acide aminé (mutation silencieuse). D'un point de vue physico-chimique, les mutations ne favorisent pas l'introduction des acides aminés d'une certaine nature. Sur les 6 mutations conduisant au remplacement d'un acide aminé : 1 induit le changement de l'acide aminé par un acide aminé considéré comme fortement similaire (la thréonine 66 en alanine), 2 correspondent au changement de l'acide aminé par des acides aminés de faible similarité (la sérine 52 en glycine et l'alanine 167 en valine) et 3 mutations induisent le changement de l'acide aminé par des acides aminés de nature différente (le tryptophane 33 en arginine, l'isoleucine 42 en thréonine et la thréonine 235 en arginine) (figure 35). Les variations de nature des acides aminés sont particulièrement intéressantes dans la mesure où le but de cette étude est d'améliorer la stabilité structurale des biocatalyseurs en LIs. L'intérêt est donc d'étudier quels rôles jouent la nature des acides aminés sur la structure des enzymes en présence LI. Cette condition de PCR de basse fidélité est donc choisie pour la suite des expériences.

```
FDH             MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
Mn_3            MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANRLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
Mn_1            MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELTTTSDKEGETGELDKHIPD 60
Mn_2            MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
                ********************************* ******** *********.********

FDH             ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
Mn_3            ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
Mn_1            ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
Mn_2            ADIIIATPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
                *****:****************************************************

FDH             VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
Mn_3            VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
Mn_1            VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
Mn_2            VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
                ********************************.***************************

FDH             ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
Mn_3            ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGRKGLIN 240
Mn_1            ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
Mn_2            ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
                ***************************************************** *****

FDH             KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
Mn_3            KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQP------------ 288
Mn_1            KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGY--------------------- 279
Mn_2            KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVQQL------------------------------ 270
                **************************

FDH             KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
Mn_3            ------------------------------------------------------------
Mn_1            ------------------------------------------------------------
Mn_2            ------------------------------------------------------------

FDH             HDKK 364
Mn_3            ----
Mn_1            ----
Mn_2            ----
```

Figure 35 : Alignement des séquences protéiques correspondant aux mutants obtenus par la PCR de basse fidélité en présence de 250 µM Mn^{2+}. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence protéique ClustalW2. Les étoiles correspondent à une identité, les deux points correspondent à une forte similarité, un point correspond à une faible similarité et l'absence de point correspond à un changement de nature. Les mutations sont en rouge.

III. 3. 4. Criblage de la librairie de mutants

III. 3. 4. A. Criblage des mutants actifs directement sur boîte de pétri

Les cellules *E.Coli BL21* ont été transformées chimiquement par le vecteur pET-28b contenant les produits de PCR de basse fidélité réalisées en présence de manganèse. Les boites de pétris contenant les différentes colonies codant pour les mutants sont répliquées sur un milieu sélectif (kanamycine) et inducteur (IPTG). Les colonies portant un vecteur codant pour un mutant actif sont directement criblées sur boîte. Brièvement, les cellules sont fixées par une fine couche d'agar sur laquelle les différentes solutions servant au criblage à base de PES/NBT sont appliquées (schéma 59).

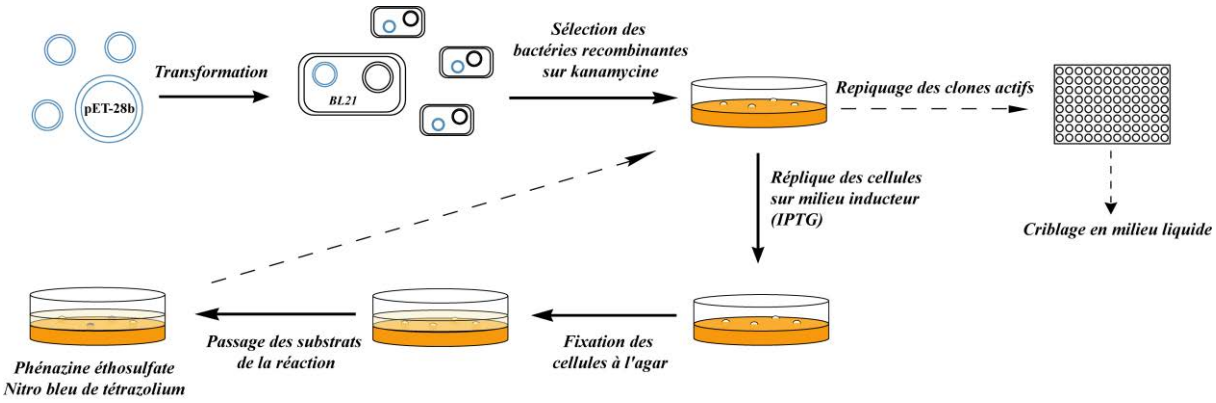


Schéma 59 : Représentation simplifiée du protocole de criblage en milieu solide.

Les cellules présentant une activité formiate déshydrogénase sont noires et la couleur diffuse autour de la colonie. Les cellules considérées comme inactives sont grisâtres et les bords sont bien dessinés (figure 36). La couleur grisâtre des clones inactifs est due à l'oxydation du NADH endogène à *E.Coli* par le PES/NBT. Le criblage sur boîte a été vérifié par la mesure d'activité d'extraits cellulaires de cellules déterminées comme positives ou négatives (figure 37).

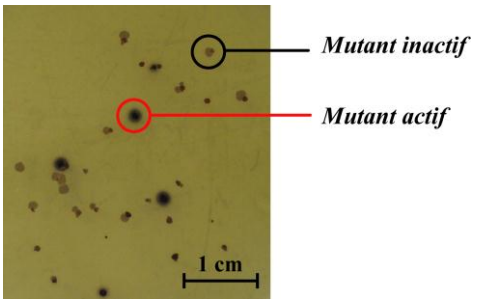


Figure 36 : Photographie d'une partie de boîte de pétri après criblage de l'activité formiate déshydrogénase.

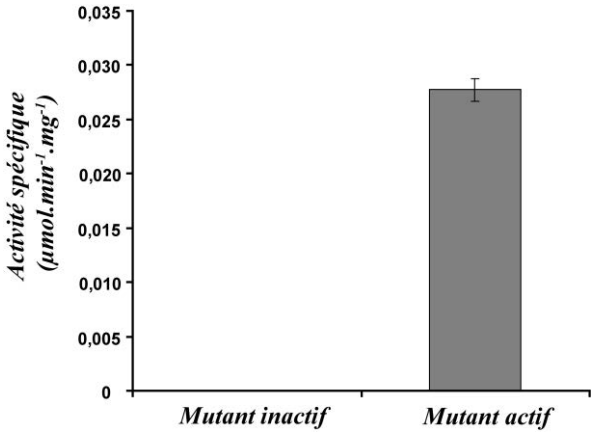


Figure 37 : Contrôle du test de criblage. Mesure de l'activité d'extraits cellulaire bruts de colonies criblées comme actives ou inactives par le suivi de l'apparition du NADH à 340 nm dans du tampon PBS pH 7,2.L'extrait cellulaire brut est obtenu en présence de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4, Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 200 mM (voir section II. 2. 3. D. 1.).

La difficulté de ce test de criblage s'est avérée être d'ordre technique dans la mesure où les transformations chimiques conduisent à des boîtes contenant parfois 25 à 30 colonies environ ce qui nécessite l'utilisation d'une grande quantité de cellules et la multiplication des manipulations. A ce jour, 987 clones ont été criblés en milieu solide, 94 (soit 9,5 %) sont actifs en solution après extraction du contenu cellulaire par du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4, Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 200 mM.

III. 3. 4. B. Criblage en présence de LI

III. 3. 4. B. 1. Mise au point du test de criblage en présence de LI

Une fois les mutants actifs sélectionnés en milieu solide, leur activité en LI est mesurée en plaque de microtitration de 96 puits. La mesure d'activité d'un nombre important de mutants nécessite la mise en place d'un test simple faisant intervenir le moins d'étapes expérimentales possibles. Comme il a été décrit précédemment, l'activité formiate déshydrogénase peut être suivie soit directement à 340 nm soit à 560 nm en présence de PES/NBT. Le nombre de mutants à cribler pouvant être important, la mesure de l'absorbance en point final à 560 nm a été choisie car les cinétiques sont consommatrices de temps ce qui peut conduire à l'inactivation du biocatalyseur lors de l'expérience. Ainsi, pour une plaque 96 puits, si le temps d'acquisition de chaque cinétique enzymatique est de 1 minute, le dernier mutant testé est incubé durant 96 minutes à température ambiante en contact du LI tandis que le premier mutant est incubé durant moins d'une minute. Ces différentes conditions expérimentales peuvent conduire à des différences d'activité. Afin de tester les différents mutants simultanément, le choix a donc été d'ajouter les différents produits réactionnels dans le puit et de mesurer la différence d'absorbance à 560 nm après 5 minutes, en présence de PES/NBT.

Dans un premier temps, la mise au point du test a été réalisée en présence de concentrations croissantes de FDH commerciale afin de déterminer à partir de quelle concentration d'enzyme l'absorbance mesurée à 560 nm dépend de l'activité de la FDH (figure 38a). Le seuil de détection correspond à une différence d'absorbance de 0,008 après 5 minutes de réaction. Afin d'éviter les ambigüités expérimentales, un mutant sera considéré actif lorsque la différence d'absorbance à 560 nm, entre 0 et 5 minutes de réaction, est supérieure à 0,02 unité d'absorbance ce qui correspond à un rapport signal/bruit de 5,1 (figure 38a). Le seuil de détection est atteint pour une activité de 20 $mU.mL^{-1}$. Dans un second temps, l'activité de la FDH commerciale (80 $mU.mL^{-1}$) est mesurée en présence de 0 à 70 % (v/v) de **LI-1** afin de déterminer quelle concentration de **LI-1** utiliser pour le criblage (figure 38b). L'activité de l'enzyme diminue parallèlement à l'augmentation de la concentration de **LI-1** dans l'essai. La FDH est totalement inactive à 70% (v/v) de **LI-1**. Le criblage des mutants sera réalisé à 60% (v/v) de LI afin d'observer des différences d'activité entre l'enzyme sauvage et le mutant à une concentration de LI où l'inactivation de l'enzyme sauvage n'est pas totale. Ainsi ce test

permettra de directement cribler les mutants plus actifs en présence de fortes concentrations de **LI-1**.

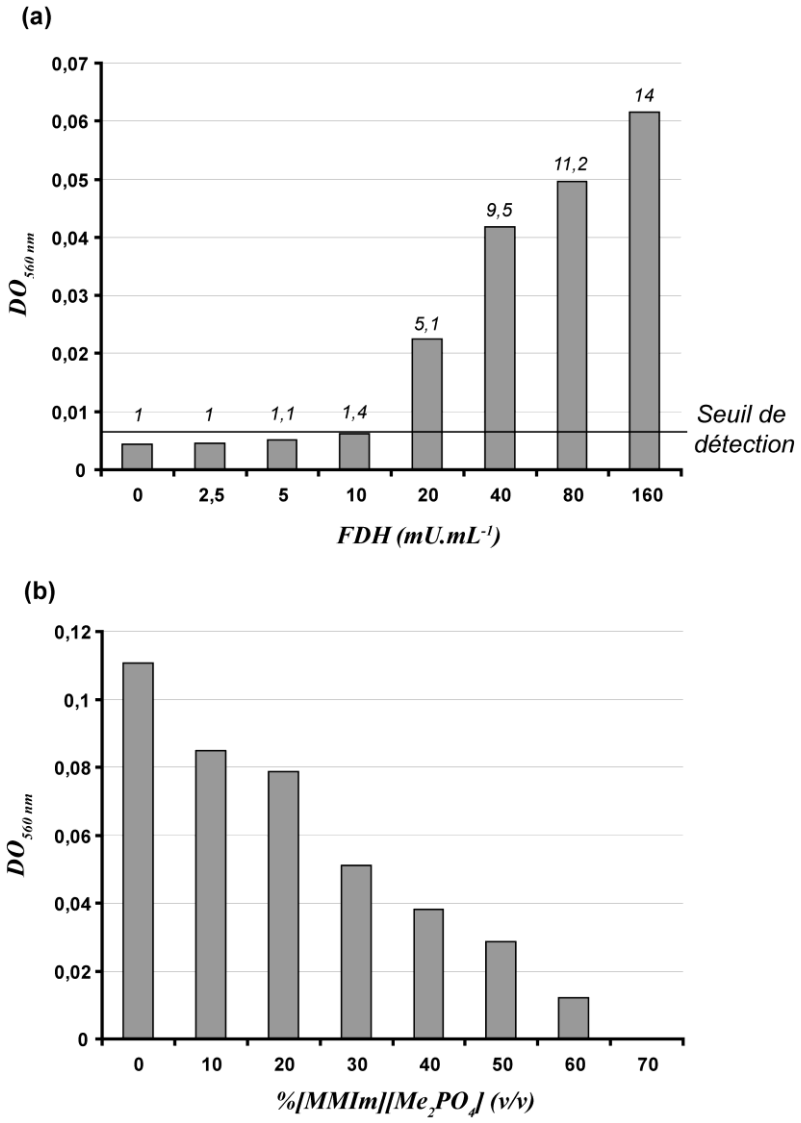


Figure 38 : Contrôle du test de criblage en solution. Mesure de la différence d'absorbance après 5 minutes en présence de différentes concentrations de FDH (a) ou en présence 80 mU.mL^{-1} de FDH et de 0-70% (v/v) de ***LI-1****. Le seuil de détection et le rapport signal/bruit sont rapportés sur la figure a.*

III. 3. 4. B. 2. Criblage des mutants en présence de LI

Les mutants actifs sur boîte sont repiqués et mis en culture dans 1 mL de milieu LB dans des plaques 96 puits pouvant contenir 2 mL de milieu par puit. Après induction à l'IPTG (1 mM) durant 5 heures et centrifugation, l'extrait cellulaire brut est récupéré (voir section II. 2. 3. D. 2.).

L'activité des mutants actifs en milieu solide est mesurée soit dans du tampon PBS pH 7,2 (100 mM), soit en présence de 60% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] dans des plaques 96 puits (section II. 2. 3. D. 2.). A ce jour, l'activité de 88 clones actifs en milieu solide a été criblée en solution. L'activité de témoins est également mesurée. Ces témoins sont : 3 clones codant pour l'enzyme sauvage (figure 39 A-C), un témoin consistant au tampon d'extraction seul (figure 39 D), un témoin correspondant à des cellules transformées par le vecteur vide pET-28b (figure 39 E) et 3 clones criblés négatifs sur boîte (figure 39 F-H). Les clones témoins codant pour la FDH sauvage sont actifs et le milieu seul ou les cellules transformées par le vecteur vide ne produisent pas d'activité. Ce test semble donc adapté au criblage de l'activité enzymatique dans le tampon (figure 39). Cependant, en ce qui concerne les 3 colonies criblées inactives sur boîte, une colonie s'avère être active dans ce test. Comme il a été observé auparavant, les clones négatifs sont plus ou moins grisâtres. Le dépôt non homogène de la surcouche d'agar peut entraîner la formation de zones où la couche d'agar est plus épaisse réduisant d'autant la diffusion des substrats. Ainsi, un clone positif peut être amené à être considéré comme négatif. La photographie de la plaque 96 puits (figure 41b) montre que malgré qu'il soit considéré comme actif d'après le seuil de détection déterminé préalablement (figure 38); le puit contenant ce mutant est faiblement coloré et donc faiblement actif. C'est également une raison qui pourrait expliquer le fait qu'il ait été considéré comme inactif sur boîte. Sur les 88 clones testés en absence de **LI-1**, 5,7 % de clones, criblés positifs sur boîte, s'avèrent être inactif (dA < 0,02) en solution (figure 39 et 41b). C'est-à-dire que l'activité mesurée est en dessous du seuil de détection déterminé préalablement (dA_{560nm} < 0,02) (figure 38).

Par conséquent, malgré son efficacité globale, le test de criblage en milieu solide peut conduire à l'observation de faux positifs, actifs sur boîte mais inactifs en solution (5,7 %) et à l'omission de clones actifs, inactifs sur boîtes mais actifs en solution (33%).

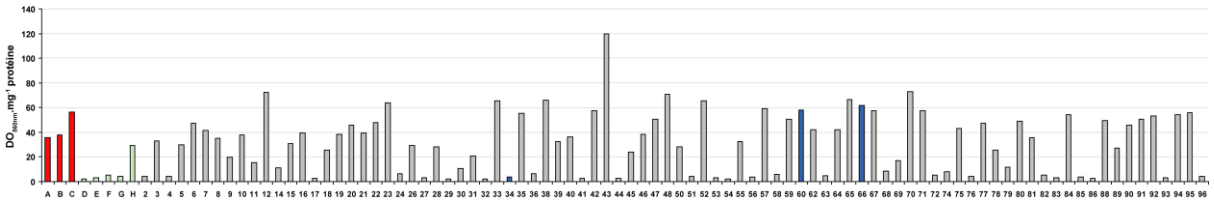


Figure 39 : Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en solution. La différence d'absorption à 560 nm après 5 minutes, corrigée par la concentration de protéine, est reportée en fonction de la numérotation du puit. A, B et C sont les témoins positifs correspondant à la FDH sauvage (rouge). D est le milieu d'extraction (tampon phosphate de potassium pH 7,5, Triton X-100 0,1 % (v/v), EDTA 200 mM) (vert), E l'activité d'extraits cellulaires de cellules tranformées par le vecteur vide (pET-28b) (vert) et F, G et H sont les activités de cellules criblées négatives sur boîte (vert). Les barres d'activité des mutants 60 et 66 sont colorées en bleu.

En présence de 60% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4], la grande majorité des enzymes sont inactives (figure 40). Seuls trois mutants sont considérés comme actifs : le 34, 60 et 66 d'après la numérotation utilisée. Parmi les mutants actifs en LI, 2 sont faiblement actifs, le mutant 34 présente une activité de 0,0295 dA_{560nm} et le mutant 66 présente une activité de 0,0233 $dA5_{60nm}$. Le mutant 60 est plus actif, son activité est de 0,2228 dA_{560nm} . En comparaison au criblage réalisé en solution aqueuse (figure 39), les mutants 60 et 66 préservent respectivement 54% et 6,7% d'activité en présence de 60% (v/v) de **LI-1** (figure 40). Le mutant 34 est un cas particulier dans la mesure où il est quasiment inactif en solution aqueuse, la différence d'absorbance à 560 nm est de 0,0268 alors que le seuil de détection a été fixé à 0,02. Le cas du mutant 34 sera discuté par la suite.

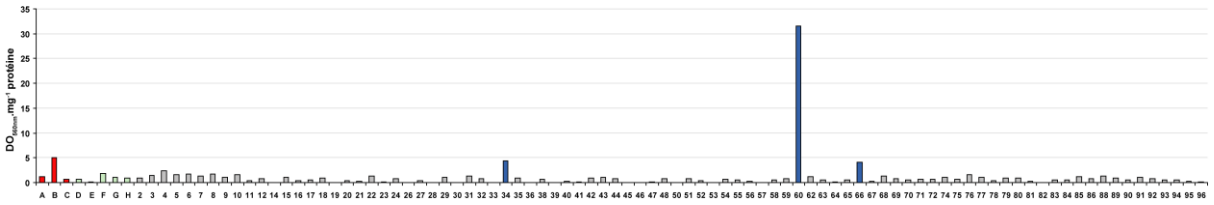


Figure 40 : Criblage de l'activité formiate déshydrogénase en présence de 60% (v/v) de LI. La différence d'absorption à 560 nm après 5 minutes, corrigée par la concentration de protéine, est reportée en fonction de la numérotation du puit. La nomenclature et le code couleur sont les même que ceux utilisés dans la figure 39.

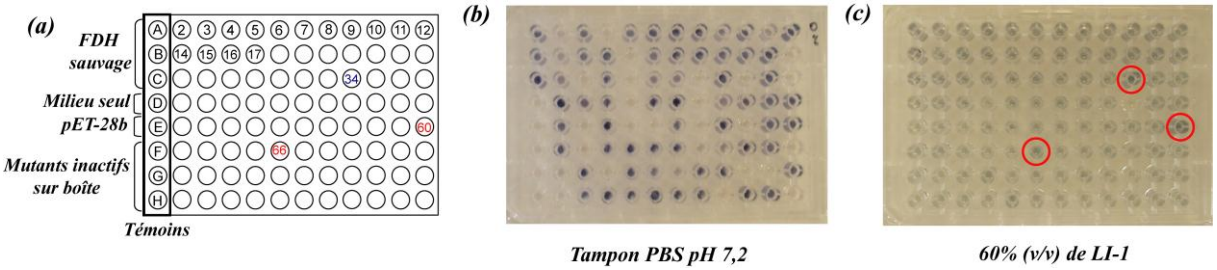


Figure 41 : Photographie d'une plaque 96 puits après criblage de l'activité formiate déshydrogénase des mutants dans du tampon PBS pH 7,2 (b) ou en présence de 60% (v/v) de ***LI-1*** *(c). Les mutants actifs en présence de LI sont encerclés en rouge. Un schéma montrant la numérotation des mutants selon leur position dans la plaque ainsi que le positionnement des témoins est reporté en a. La colonne de gauche correspond à l'activité mesurée pour les différents témoins. A partir du haut, les puits correspondent à la mesure de l'activité de 3 colonies codant pour l'enzyme sauvage (A, B et C), au tampon d'extraction seul (D), à une colonie transformée par le vecteur vide (pET-28b) (E) et à 3 colonies criblées négatives sur boîte (F, G et H).*

Le criblage en milieu liquide permet donc de rapidement observer l'activité de mutants actifs en LI. Il permet également d'éliminer les faux positifs, criblés comme actifs sur boîte de pétri mais inactifs en solution aqueuse.

III. 3. 5. Etude des mutants sélectionnés

III. 3. 5. A. Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques

La séquence des mutants 34, 60 et 66 a été déterminée afin d'examiner les mutations de ces derniers (figure 42). Le mutant 34 présente un grand nombre de mutations et d'insertions/délétions de séquence (annexe V), dont plusieurs entrainent la formation de codons stop. Les différentes phases ouvertes de lectures ne produisent que des fragments protéiques dont la taille est inférieure à 50 acides aminés. Le grand nombre de mutations peut s'expliquer par le fait que lors d'une PCR, le taux d'erreur de l'enzyme augmente avec le nombre de cycle. La séquence nucléotidique du mutant 34 est incohérente avec son activité dans le tampon PBS pH 7,2, ce mutant est donc un faux positif aussi bien en présence, qu'en absence de LI.

Le mutant 60 présente deux mutations au niveau nucléotidique correspondant aux transitions A → G et T → C respectivement en position 560 et 930 de la séquence génique de la FDH (annexe VI). Ces mutations se traduisent au niveau protéique par le remplacement l'asparagine 187 et de la thréonine 321 en sérine (figure 42). Les mutations N187S et T321S sont respectivement situées dans le domaine de fixation du cofacteur et dans le domaine catalytique (figure 43a). Ces mutations sont situées à la surface de la structure tridimensionnelle et ne semblent pas jouer un rôle direct dans le mécanisme catalytique ou la dimérisation de l'enzyme. La mutation T321S ne change pas grandement les propriétés physico-chimiques de l'acide aminé dans la mesure où ces deux derniers sont polaires et ont une fonction hydroxyle en commun. La différence est l'absence d'un groupement méthyle sur le radical de la sérine, le mutant T321S sera donc légèrement plus polaire. En ce qui concerne la mutation N187S, les deux acides aminés sont polaires comme pour la mutation T321S. Cependant, la variation des propriétés physico-chimiques est plus importante que lors de la mutation T321S car elle induit le passage d'une fonction carboxamide à une fonction hydroxyle diminuant ainsi la polarité légèrement.

Ces mutations en sérine sont intéressantes car l'idée d'introduire des fonctions hydroxyles, afin de jouer sur la capacité de former des liaisons hydrogènes entre l'enzyme et le solvant a déjà été utilisée d'une autre manière. L'hydroxylation des cations des LIs dans le but d'améliorer les activités de type déshydrogénase dans ces milieux a déjà démontré un effet bénéfique (de Gonzalo G *et al.*, 2007; Walker AJ et Bruce NC, 2004). L'idée de faire varier la polarité des résidus de surface a également été utilisée afin d'améliorer l'activité enzymatique en solvants organiques non polaires. Ainsi, une étude montre que la mutation d'un résidu polaire de surface de la subtilisine (acide apartique 248) en un acide aminé moins polaire (alanine ou leucine) augmente son activité de deux fois en présence de 80% (v/v) de DMF (Martinez P et Arnold FH, 1991).

```
FDH-Wt          MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
Mut.60          MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
Mut.66          MKIVLVLYDAGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPD 60
                ************************************************************

FDH-Wt          ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
Mut.60          ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
Mut.66          ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
                ************************************************************

FDH-Wt          VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
Mut.60          VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
Mut.66          ASVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
                .***********************************************************

FDH-Wt          ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
Mut.60          ERLLPFSPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
Mut.66          ERLLPFNPKELLYYDYQALPREAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
                ******.*************:**************************************

FDH-Wt          KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
Mut.60          KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
Mut.66          KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRN 300
                ************************************************************

FDH-Wt          KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
Mut.60          KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQSRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
Mut.66          NYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK 360
                :*******************:**************************************

FDH-Wt          HDKK 364
Mut.60          HDKK 364
Mut.66          HDKK 364
```

Figure 42 : Alignement des séquences protéiques correspondant aux mutants 60 et 66 avec la FDH sauvage. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence protéique ClustalW2. Les étoiles correspondent à une identité, les deux points correspondent à une forte similarité, un point correspond à une faible similarité et l'absence de point correspond à un changement de nature de l'acide aminé. Les mutations sont en rouge.

Le mutant 66 présente 3 transitions au niveau génique T → C, C → T et A → G respectivement en position 362, 462 et 602 de la séquence de la FDH (annexe VII). Au niveau protéique, ces mutations se traduisent par les changements d'acides aminés : V121A, K201R et K301N (figure 42). Les mutations V121A et K201R ne changent pas les propriétés physico-chimiques de l'acide aminé tandis que la mutation K301N consiste au passage d'un acide aminé basique chargé à un acide aminé polaire non chargé. Les mutations ici observées conduisent donc à l'augmentation globale de la polarité de la FDH. Au niveau structural, les 3 mutations sont situées au niveau du domaine de fixation du NAD^+ et à la surface de l'enzyme. Les 3 mutations du mutant 66 ne semblent pas jouer un rôle direct dans la multimérisation de la FDH ou lors de la catalyse (figure 43b).

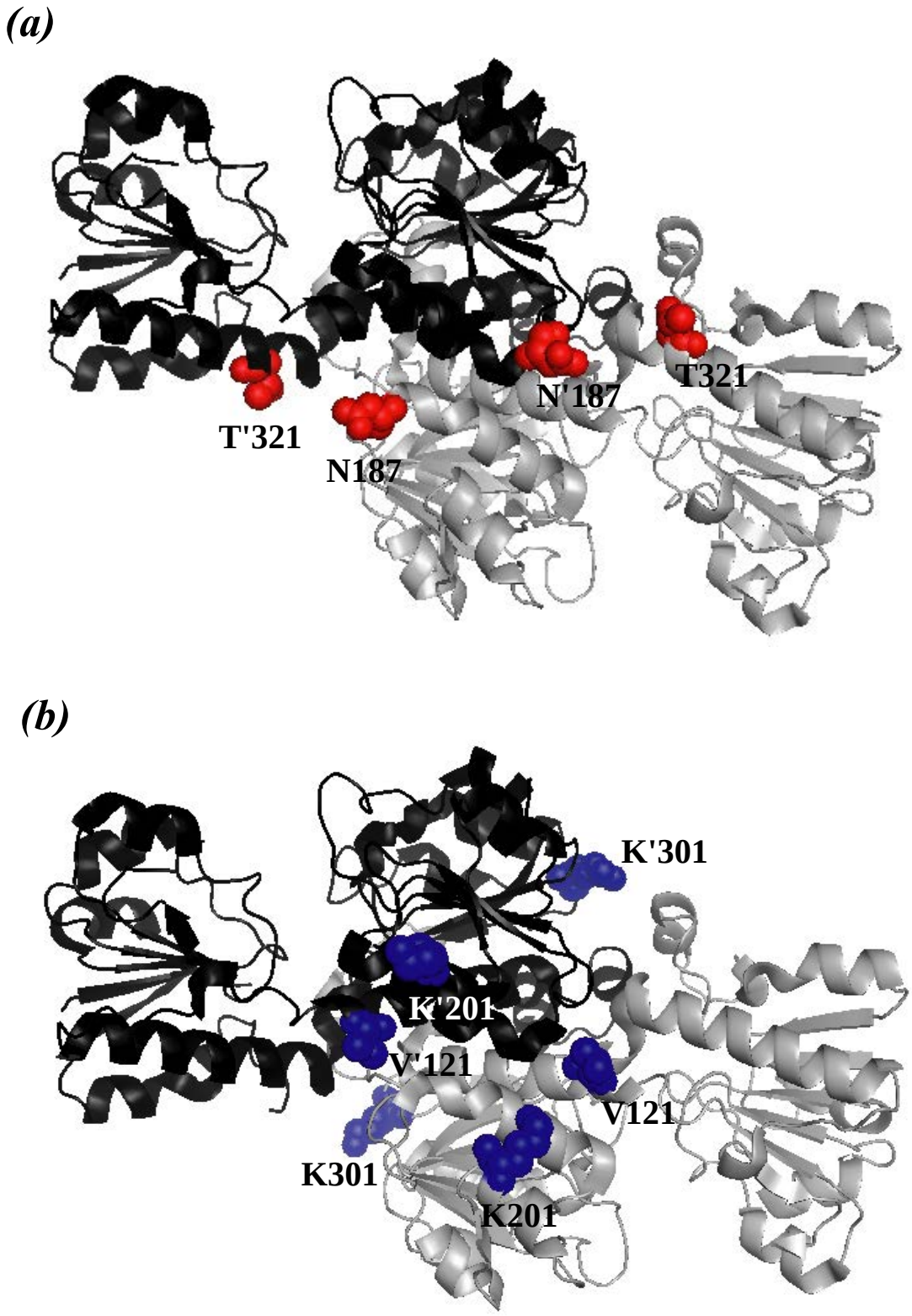


Figure 43 : Localisation des mutations, obtenues lors du premier cycle d'évolution dirigée, sur la FDH de Candida boidinii. Les structures tridimensionnelles des chaînes A (gris) et D (noir) du cristal tétramérique de la FDH de Candida boidinii (entrée pdb 2fss) sont visualisées sous forme de ruban. Les mutations du mutant 60 sont visualisées sous forme de sphères rouges (a) et celles du mutant 66 sont visualisées sous forme de sphères bleues (b). Le nom des résidus mutés est indiqué selon le code à une lettre des acides aminés, une apostrophe est ajoutée pour les résidus de la chaîne D du cristal de FDH.

III. 3. 5. B. Test d'activité des mutants sélectionnés en LI

Le criblage de l'activité des différents mutants a été réalisé en présence des extraits cellulaires bruts. La présence de contaminants, tels que des tensio-actifs (triton X-100 0,01% (v/v) final) et peut être de quelques débris membranaires, peut éventuellement biaiser les mesures d'activité (voir section II. 2. 3. E.). La FDH sauvage et les mutants 60 et 66 ont donc été purifiés par la technique de séparation de phases aqueuses suivie d'une chromatographie sur hydroxyapatite (voir section III. 3. 2. C.). L'activité des enzymes purifiées a été mesurée en présence de 0 à 70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] afin de confirmer ou infirmer la meilleure activité des mutants en présence de forte concentration de LI observé lors du criblage (figure 40 et figure 44).

En absence de LI, les mutants sont moins actifs que l'enzyme sauvage. Les activités des mutants sont inférieures à l'activité de l'enzyme sauvage de 2,4 et de 2,8 fois respectivement pour les mutants 60 et 66 (soit 41% et 36% de l'activité spécifique de l'enzyme sauvage respectivement pour les mutants 60 et 66) (Figure 44a). L'activité des différentes enzymes diminue en présence de 50 à 70% (v/v) de **LI-1**. Cependant, les mutants 60 et 66 sont toujours actifs en présence de 60 ou 70% (v/v) de **LI-1** tandis que l'enzyme sauvage est quasiment inactive (figure 44a et b). L'enzyme sauvage préserve 3% (± 1,23) de son activité initiale à 60% (v/v) de LI et 2% (± 1,86) à 70% (v/v) de LI. Le mutant 60 préserve 28% (± 1,7) de son activité initiale en présence de 60% (v/v) de LI et 30% (± 6,6) en présence de 70% (v/v) de LI (figure 44b). Lors du criblage, le mutant 60 était aussi actif que l'enzyme sauvage dans le tampon PBS pH 7,2 et préservait 54% de son activité initiale à 60% (v/v) de **LI-1** tandis que dans cette expérience le mutant purifié est moins actif que l'enzyme sauvage dans le tampon et préserve 28% de son activité à 60% (v/v) de LI. La différence entre les résultats obtenus lors du criblage (figure 39) et les résultats obtenus en présence des enzymes purifiées (figure 44) est très probablement due à la présence de contaminations dans l'essai telles que le Triton X-100 ou les débris membranaires. Cependant, en présence des enzymes purifiées les résultats vont dans le même sens, à savoir, une amélioration d'activité en présence de fortes concentrations de LI. Cependant, les activités en absence de LI et le taux d'amélioration sont diffèrents (figure 44a et figure 39).

Le criblage permet de distinguer les mutants plus actifs en présence de fortes concentrations de LIs et les biais observés vont dans le sens d'une surestimation de l'activité.

Le mutant 66 préserve 12% (± 6,55) de son activité initiale à 60% (v/v) de LI et 13% (± 11,24) à 70% (v/v) de LI (figure 44). Au regard du taux d'erreurs concernant l'activité du mutant 66 à 70% (v/v) de LI, son amélioration d'activité à cette concentration de LI est à nuancer. Par la suite, des expériences complémentaires seront réalisées en présence du mutant 60 afin d'essayer de comprendre pour quelle(s) raison(s) son activité est améliorée en présence de fortes concentrations de **LI-1**. Le mutant 66 sera quant à lui mis de côté dans la mesure où l'amélioration de son activité à 70% (v/v) de **LI-1** est discutable au regard des barres d'erreurs.

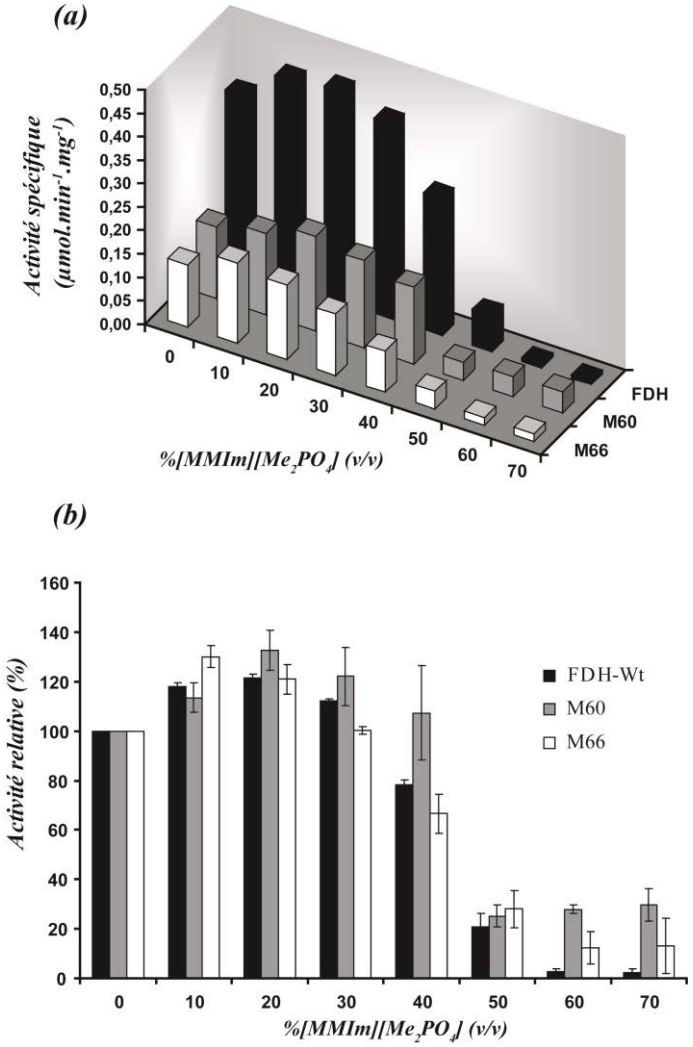


Figure 44 : Activités de la FDH sauvage et des mutants 60 (M60) et 66 (M66) en présence de 0 à 70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Les activités spécifiques (a) ou relatives (b) de la FDH sauvage (noir), du mutant 60 (gris) ou du mutant 66 (blanc) sont mesurées en présence de 0-70% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] (v/v).

III. 3. 5. C. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de la FDH sauvage et du mutant 60 ont été déterminés en présence de 0-30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] (figure 45a et b). Les paramètres cinétiques de la FDH sauvage sont recalculés afin de pouvoir les comparer aux paramètres cinétiques du mutant 60, les deux enzymes étant produites et purifiées selon le même protocole.

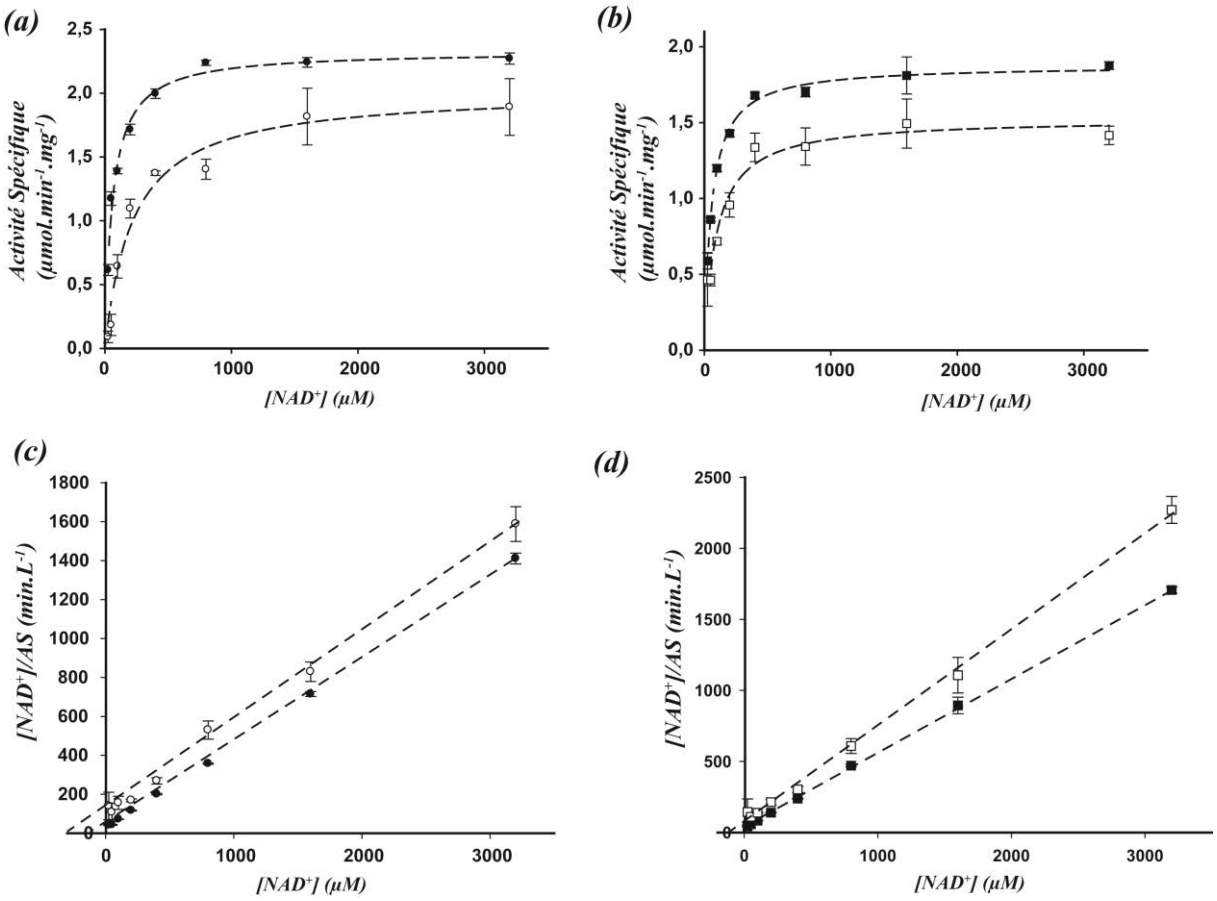


Figure 45 : Représentations non linéaires de l'équation de Michaelis-Menten (a et b) et représentations linéaires de l'équation de Hanes-Woolf (c et d, des activités de la FDH sauvage (a et c) et du mutant 60 (b et d) en présence (motifs blancs) ou en absence (motifs noirs) de 30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] (v/v). L'activité enzymatique est reportée en activité spécifique (AS).

En absence de LI, la valeur de K_M^{NAD} de l'enzyme sauvage est 1,13 fois inférieure à celle du mutant 60 et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{NAD}) est 1,75 fois supérieure (tableau 17). L'enzyme sauvage est donc plus efficace en solution aqueuse. L'effet du LI sur les paramètres cinétiques des enzymes a été évalué en présence de 30% (v/v) de **LI-1**. En presence de fortes concentrations de LI, les activités sont trop faibles, notamment celles de l'enzyme sauvage, et ne permettent pas le suivi de l'activité enzymatique en présence de différentes concentrations de NAD^+. La présence de 30% (v/v) de **LI-1** a un effet négatif sur les paramètres cinétiques de la FDH sauvage et du mutant 60. L'enzyme sauvage est plus sensible à ce changement d'environnement : la valeur de K_M^{NAD} est augmentée de 3,8 fois et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{NAD}) est réduite de 4 fois. Le LI a un effet moins important sur les paramètres cinétiques du mutant 60 : la valeur de K_M^{NAD} est augmentée de 1,6 fois et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{NAD}) est réduite de 2,04 fois (tableau 17). En présence de LI, les paramètres cinétiques du mutant 60 sont légèrement meilleurs que ceux de l'enzyme sauvage. Les mutations N187S et T321S préservent donc, dans une certaine mesure, les paramètres cinétiques de la FDH en présence de **LI-1**. Cependant, le rôle précis des mutations dans ce phénomène est difficile à interpréter car les mutations ne sont pas directement liées au site catalytique (figure 43).

	sans [MMIm][Me_2PO_4]			**30 % (v/v) [MMIm][Me_2PO_4]**		
	K_M^{NAD} (µM)	**k_{cat} (× 10^3 min^{-1})**	**k_{cat}/K_M^{NAD} ($min^{-1}.µM^{-1}$)**	**K_M^{NAD} (µM)**	**k_{cat} (× 10^3 min^{-1})**	**k_{cat}/K_M^{NAD} ($min^{-1}.µM^{-1}$)**
Wt	59	122	2066	223	113	507
M60	67	79	1179	106	61	577

Tableau 17 : Paramètres cinétiques de le FDH sauvage (0,2 µM) et du mutant 60 (0,24 µM) en presence ou en absence de 30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4]. Les paramètres sont extraits de la représentation de Hanes-Woolf. Les cinétiques sont mesurées de tampon PBS pH 7,2 en présence de 300 mM de formiate et de 0,025à 3,2 mM de [NAD^+].

III. 3. 5. D. Analyse de la fixation des substrats

III. 3. 5. D. 1. Fixation du NAD^+

La capacité de la FDH sauvage et du mutant 60 à fixer le NAD^+ a été étudiée par atténuation de fluorescence en présence de différentes concentrations de cofacteur. Les expériences d'atténuation ont été réalisées en présence de 0 et de 30% (v/v) de [MMIm][Me_2PO_4] afin d'analyser l'effets du LI sur la fixation du NAD^+. Une constante de dissociation (K_D^{NAD}) est alors calculée. En solution aqueuse, la valeur de K_D^{NAD} du mutant 60 est de 221 ± 24 µM tandis que la valeur de K_D^{NAD} de la FDH sauvage est de 373 ± 55 µM. L'enzyme sauvage fixe donc 1,68 fois moins fortement le NAD+, en solution aqueuse, que le mutant 60. En présence de 30% (v/v) de **LI-1**, la valeur de K_D^{NAD} du mutant 60 est de 591 ± 50 µM tandis que la valeur de K_D^{NAD} de la FDH sauvage est de 952 ± 97 µM (tableau 18). Par conséquent, en présence ou non de 30% (v/v) **LI-1**, le mutant 60 fixe plus fortement le NAD^+ que l'enzyme sauvage (figure 46, tableau 18). En présence de **LI-1**, la capacité des enzymes à fixer le NAD^+ est moins importante probablement en raison de la dénaturation partielle de l'enzyme. Le LI induit une augmentation de la valeur de K_D^{NAD} de 2,5-2,6 fois pour l'enzyme sauvage et le mutant 60. L'effet du **LI-1** sur la fixation du NAD^+ est donc du même ordre de grandeur pour les deux enzymes (tableau 18). Les mutations N187S et T321S améliorerent donc la fixation du NAD^+ en présence ou en absence de LI.

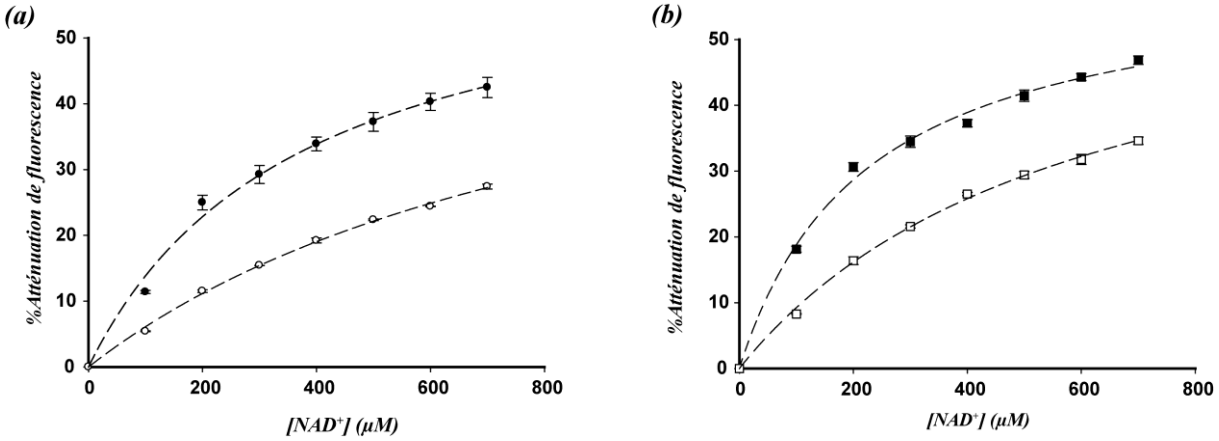


*Figure 46 : Atténuation de la fluorescence de la FDH (0,6 µM) et du mutant 60 (0,6 µM) par le NAD^+ en présence ou en absence de 30% (v/v) de LI. Atténuation de la fluorescence de la FDH sauvage (a) dans du tampon PBS (100 mM) pH 7,2 (●) ou en présence de 30% (v/v) de **LI-1** (○). Atténuation de la fluorescence du mutant 60 (b) dans du tampon PBS pH 7,2 (■) ou en présence de 30% (v/v) de **LI-1** (□). Les hyperboles à partir desquels les K_D^{NAD} sont déterminés sont représentées (R^2 > 0,99).*

	PBS pH 7,2 K_D^{NAD} (µM)	30% (v/v) LI-1 K_D^{NAD} (µM)
FDH	373 ± 55	952 ± 97
M60	221 ± 24	591 ± 50

*Tableau 18 : Constantes de dissociation de la FDH et du mutant 60 pour le NAD^+ en présence ou en absence de 30% (v/v) de **LI-1**.*

III. 3. 5. D. 2. Fixation du formiate

La fixation du formiate par la FDH sauvage et le mutant 60 a été analysée par atténuation de fluorescence en présence de différentes concentrations d'azide et d'une concentration constante de NAD^+ (500 µM) (figure 47). Les expériences sont réalisées en présence ou en absence de 30% (v/v) de **LI-1**. En absence de LI, l'enzyme sauvage fixe plus fortement l'azide que le mutant 60 d'un facteur de 1,53 (tableau 19) : la valeur de K_D^{N3} est de 0,52 ± 0,06 µM pour l'enzyme sauvage et de 0,8 ± 0,07 µM pour le mutant 60.

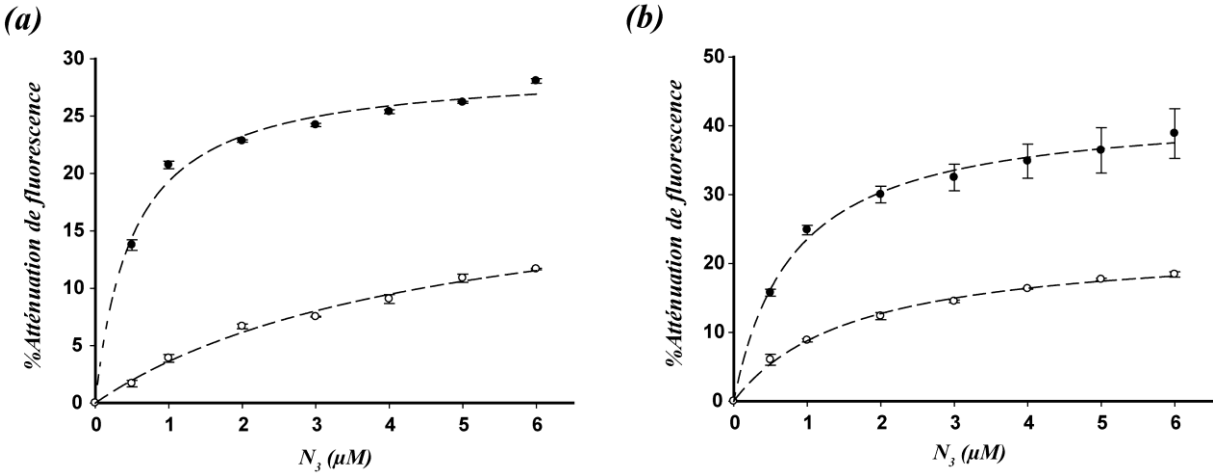


*Figure 47 : Atténuation de la fluorescence de la FDH et du mutant 60 (0,6 µM) par l'azide (N_3) en présence ou en absence de 30% (v/v) de **LI-1**. Les expériences sont réalisées en présence d'une concentration constante de NAD^+ (500 µM). Atténuation de la fluorescence de la FDH sauvage (a) dans du tampon PBS pH 7,2 (●) ou en présence de 30% de **LI-1** (○). Atténuation de la fluorescence du mutant 60 (b) dans du tampon PBS pH 7,2 (■) ou en présence de 30% (v/v) de **LI-1** (□). Les hyperboles à partir desquels les K_D^{N3} sont déterminés sont représentées (R^2 > 0,99)*

En présence de 30% (v/v) de **LI-1**, le K_D^{N3} est augmenté de 9 et 2 fois respectivement pour l'enzyme sauvage et le mutant 60. La valeur de K_D^{N3} est de 4,67 ± 0,87 µM pour l'enzyme sauvage et de 1,63 ± 0,13 µM pour le mutant 60. Le LI affecte de manière moins importante la fixation de l'azide par le mutant 60 que par l'enzyme sauvage. En présence de 30% (v/v) de **LI-1**, le K_D^{N3} du mutant 60 est 2,8 fois plus faible que le K_D^{N3} de l'enzyme sauvage (tableau 19).

	PBS pH 7,2 K_D^{N3} (µM)	**30% (v/v) LI-1 K_D^{N3} (µM)**
FDH	0,52 ± 0,06	4,67 ± 0,87
M60	0,8 ± 0,07	1,63 ± 0,13

Tableau 19 : Constantes de dissociations de la FDH et du mutant 60 par l'azide (N_3^-) en présence ou en absence de 30% (v/v) de LI.

La fixation du formiate joue probablement un rôle dans le fait que le mutant 60 soit plus actif que l'enzyme sauvage en présence de fortes concentrations de LIs. D'après le mécanisme réactionnel de l'enzyme, le formiate ne se fixe que lorsque le NAD^+ est déjà fixé (schéma 57). La meilleure fixation des substrats en présence de LIs, est vraisemblablement liée à un état structural se rapprochant de l'état natif.

III. 3. 6. Conclusions et perspectives de l'évolution dirigée de la FDH

L'évolution dirigée d'un paramètre spécifique d'une enzyme est une chose qui par principe paraît simple. Des mutations sont introduites de manière aléatoire au niveau génique et ces différents mutants sont testés pour le paramètre souhaité. Les résultats obtenus au cours de cette thèse confirment que cette approche fonctionne mais elle nécessite des outils performants.

En premier lieu, une fois la condition de PCR choisie, il faut disposer d'un système de transformation bactérienne efficace permettant l'obtention d'un nombre important de colonies. La transformation bactérienne par choc thermique a été utilisée lors des expériences et s'est avérée être fastidieuse en raison de la faible efficacité de transformation observée. Une alternative pourrait être l'électroporation. Les premiers résultats montrent que l'efficacité de transformation de l'electroporation de produits de ligations issus de la PCR de basse fidélité (18.10^3 cfu.μg^{-1}) est 4,5 fois plus importante que lors de la transformation par choc thermique (4.10^3 cfu.μg^{-1}).

En second lieu, les mutants doivent être criblés pour le paramètre désiré. L'efficacité du test de criblage joue un rôle primordial dans la réussite de la méthode d'évolution. Le test utilisé au cours de cette thèse, dans le but de cribler les mutants dont l'activité est améliorée en présence de fortes concentrations de [MMIm][Me_2PO_4], s'articule en deux étapes. Dans un premier temps, les bactéries contenant un vecteur codant pour une enzyme active sont directement sélectionnées sur boîte. La vérification du test, par le repiquage de 3 clones différents, montre que ce test est efficace. Cependant, lors du criblage de la banque de mutants en solution (en plaque 96 puits), un certain nombre de mutants considérés comme inactifs sur boîte s'avèrent être actifs en solution (1 clone sur 3 est un faux négatif). Inversement, 5,7 % des mutants considérés comme actifs sur boîte sont en réalité inactifs en solution (faux positifs). Dans un second temps, l'activité des extraits cellulaires bruts des mutants est mesurée en présence de 60% (v/v) de **LI-1** afin de d'observer la présence éventuelle de mutants dont l'activité est améliorée en présence de LI.

Les mutants sélectionnés, suite au criblage de leur activité en solution ou en présence de 60% (v/v) de **LI-1**, sont séquencés et les enzymes correspondantes sont purifiées par ATPS et sur hydroyapatite, afin de confirmer ou infirmer les résultats observés lors du criblage de l'activité des extraits cellulaires bruts. Sur les trois mutants sélectionnés (les mutants 34, 60 et 66), seul le

mutant 60 s'est avéré avoir une activité nettement améliorée en présence de 60-70% (v/v) de **LI-1**. Le séquençage du mutant 34 révèle que ce dernier est un faux positif, son vecteur ne codant que pour des protéines tronquées. Concernant le mutant 66, l'amélioration de son activité en présence de **LI-1** est discutable. Le fait que le criblage soit réalisé sur les extraits cellulaires bruts participe à l'observation de faux positifs et par conséquent nécessite l'analyse plus précise des mutants sélectionnés.

L'idée de cribler l'activité des mutants purifiés n'est pas envisageable car le protocole de purification nécessite un nombre important d'étapes et notamment le passage des échantillons sur une colonne d'hydroxyapatite. Malgré le fait que des expériences complémentaires soient nécessaires, le test de criblage est assez efficace car sur 924 clones criblés, 3 ont été sélectionnés à travers ce test.

L'amélioration de l'activité du mutant 60 en présence de fortes concentrations de LI est difficile à interpréter. Le remplacement de l'asparagine 187 et de la thréonine 321 par des résidus de sérine ne change pas la nature des acides aminés, les trois acides aminés étant polaires. Par analogie à l'idée de diminuer la polarité des résidus de surface des enzymes afin d'améliorer leur activité dans des solvants organiques non polaires (Martinez P et Arnold FH, 1991); une hypothèse serait que l'augmentation de la polarité des résidus de surface augmenterait l'activité de la FDH dans les LIs miscibles à l'eau. Le remplacement de la thréonine 321 en sérine augmente légèrement la polarité à proximité de la surface de la FDH tandis que le remplacement de l'asparagine 187 en sérine la diminue légèrement : l'effet résultant est donc difficile à apprécier.

En perspective, il serait intéressant de chercher à muter, par mutagenèse dirigée, les résidus de surface afin d'obtenir une enzyme plus stable en LI. Par exemple, en échangeant les résidus apolaires de surface par des résidus polaires afin d'augmenter le nombre de liaisons hydrogènes avec le solvant. Cependant, la stabilité structurale d'une protéine est en général régie par la somme des intéractions de faibles énergies inhérentes à la protéine (les liaisons hydrogènes, de van der Waals, les ponts salins…) et des intéractions de la protéine avec le milieu (effets hydrophobes ou hydratation des ions). L'effet résultant est difficile à anticiper. Les mutations conduisant à l'amélioration de l'activité d'un biocatalyseur donné, dans un milieu particulier, dépendront probalemnent à la fois des caractéristiques de l'enzyme et du milieu. Les mutations

bénéfiques ne seront pas nécessairement extrapôlables à différentes enzymes en présence de différents LIs.

En absence de **LI-1**, l'enzyme sauvage est plus active que le mutant 60, ce phénomène est lié à de meilleurs paramètres cinétiques (K_M^{NAD} et k_{cat}/K_M^{NAD}) et une fixation plus importante de l'azide (plus petit K_D^{N3}) : un inhibiteur compétitif du formiate. En présence de concentrations de **LI-1** supérieures à 50% (v/v), le mutant 60 est plus actif que l'enzyme sauvage. En présence de 30% (v/v) de **LI-1**, le mutant 60 présente de meilleurs paramètres cinétiques et fixe mieux les substrats en comparaison à l'enzyme sauvage.

En perspective, l'élargissement de la banque de mutants permettra éventuellement d'obtenir d'autres mutants actifs en présence de fortes concentrations de LI. L'analyse de la séquence de ces mutants, et notamment de la nature des acides aminés modifiés, aidera à la compréhension des mécanismes responsables de l'inactivation des biocatalyseurs en LI afin de pouvoir développer des méthodes rationnelles servant à préserver la structure/activité des enzymes en LI.

IV. Conclusion générale

Depuis les années 2000, les liquides ioniques ont trouvé un intérêt dans le domaine de la biocatalyse et sont proposés comme solvants de remplacement à la place des solvants organiques. Ces milieux, et notament les LIs miscibles à l'eau, sont capables de dissoudre des substrats tels que les carbohydrates, les acides gras, ou autres substances faiblement solubles dans l'eau. Cependant, les biocatalyseurs tendent à être inactifs en présence de fortes concentrations de LIs miscibles à l'eau et les causes exactes de cette inactivation sont toujours en cours d'étude.

Cette thèse avait pour but de mieux comprendre les phénomènes responsables de l'inactivation des biocatalyseurs en présence de LIs et de développer des stratégies permettant d'améliorer leur activité/stabilité dans ces milieux.

L'étude de protéines en présence de LIs nécessite l'évaluation de la structure de ces dernières à travers une méthode rapide et facile à mettre en œuvre. La majorité des LIs est basée sur des cations ayant un noyau imidazolium absorbant dans l'UV-visible et possédant un nombre non négligeable de liaisons ce qui rend difficile, voir impossible, l'utilisation de méthodes spectroscopiques telles que l'infrarouge ou le dichroïsme circulaire. La spectroscopie de fluorescence est une technique qui permet de contourner, dans une certaine mesure, l'absorption du LI car les imidazoliums ne fluorescent pas ou peu. L'analyse des structures protéiques en LIs est sujette à discussion dans la mesure où, en plus d'absorber dans l'UV-visible, les LIs à base d'imidazolium sont capables d'atténuer la fluorescence de tryptophanes en solution.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent que les propriétés d'absorption et d'atténuation des LIs ne suffisent pas à expliquer les variations des intensités de fluorescence des enzymes en présence de LIs. Lorsque la concentration de LI dans l'essai est inférieure à la concentration de LI donnant un signal de fluorescence d'égale intensité à celui de l'enzyme (CILc), seules des modifications structurales du biocatalyseur peuvent être à l'origine des variations du spectre de fluorescence. Cette concentration critique de LI dépend du couple enzyme/LI.

L'utilisation d'agents atténuateurs tels que l'iode ou l'acrylamide en présence de concentrations de LIs inférieures à la CILc permet de suivre plus précisément les variations structurales. Les LIs se comportent comme des agents dénaturants et déplient les protéines. L'utilisation de l'acrylamide montre que l'inactivation du biocatalyseur en LI correspond à des variations structurales. L'imidazole seul n'induit pas de grandes variations du spectre de fluorescence. Par conséquent, la charge du cation joue probablement un rôle dans le mécanisme de dénaturation protéique du LI. De plus le **[BMIm][CH_3COO]** (**LI-2**), composé d'un cation comportant un chaîne aliphatique hydrophobe, a un effet plus important que le **[MMIm][Me_2PO_4]** (**LI-1**) sur la structure de l'enzyme.

Le dépliement d'une enzyme en présence de LI fait donc intervenir deux types d'interaction entre le cation du LI et le biocatalyseur : des interactions ioniques avec le noyau imidazolium et des interactions hydrophobes avec la chaîne alkyle associée (schéma 60).

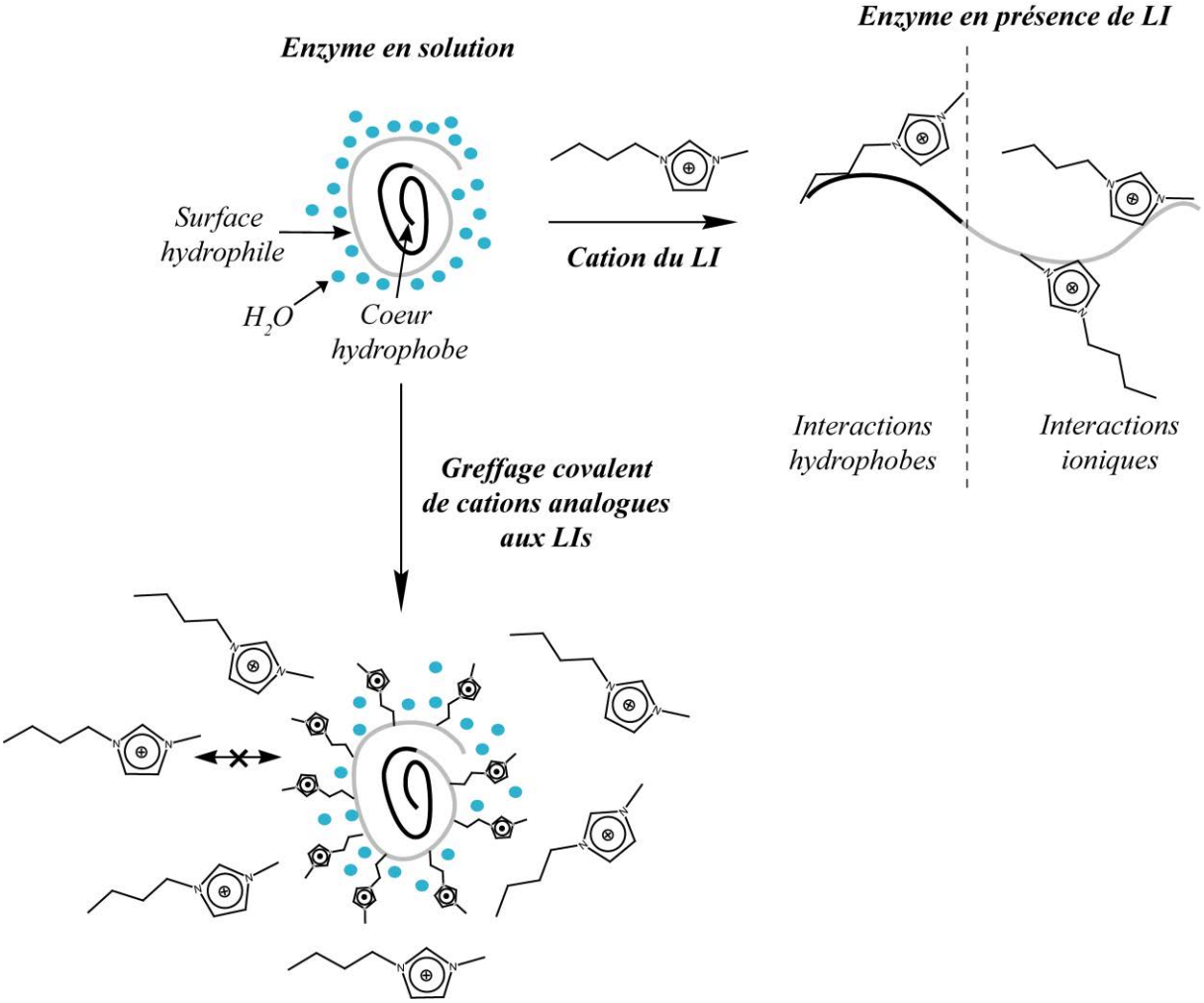


Schéma 60 : Représentation des interactions cations/enzyme intervenant lors de la dénaturation enzymatique par le LI et lors du greffage de cations à la surface du biocatalyseur.

Le greffage covalent de cations analogues aux LIs à la surface du biocatalyseur a été réalisé afin de préserver ce dernier des interactions directes avec le LI. Les enzymes modifiées sont actives en présence de 60-70% (v/v) de **LI-1** tandis que l'enzyme sauvage est inactive. Le greffage de cation améliore la stabilité structurale du biocatalyseur en présence de **LI-1** et le temps de demi-vie dans le tampon. L'effet stabilisant du cation est d'autant plus important que le cation greffé est de petite taille (faible coefficient de viscosité B). De plus, le greffage de cations, comportant une chaîne alkyle composée de plus de 3 carbones, inactive le biocatalyseur. Ces données soulignent l'importance de la taille de la chaîne alkyle et donc des interactions hydrophobes dans le mécanisme de dénaturation protéique en présence de LI. Le greffage covalent de cations à la surface du biocatalyseur préserve probablement cette dernière du contact direct avec le cation du LI et maintien la couche d'hydratation essentielle (schéma 60).

Parmi les perspectives, le remplacement des résidus de lysines 236 et 291, à proximité du site actif de la FDH, par des résidus non modifiables, tel que la leucine, permettra de déterminer le rôle des phénomènes de gènes stériques des cations greffés dans l'inactivation de la FDH modifiée en solution aqueuse.

L'approche d'évolution dirigée a également été utilisée afin d'améliorer l'activité de la FDH en LI. A ce jour, un mutant est actif en présence de 70% (v/v) de **LI-1**. Ce dernier porte deux mutations sur la surface de la protéine consistant au remplacement d'une thréonine et d'une asparagine en sérine. Ces mutations conduisent à l'augmentation de la polarité à la surface du biocatalyseur. L'amélioration de l'activité du mutant en présence de **LI-1** pourrait être due à la préservation de molécules d'eau au sein de la couche d'hydratation essentielle du biocatalyseur. L'obtention d'un plus grand nombre de mutants actifs en LIs et/ou le remplacement de résidus de surface apolaires par des résidus de sérine confirmerait ou infirmerait cette hypothèse.

L'inactivation des biocatalyseurs en LIs est probablement multiparamétrique. Lors des 2 approches utilisées au cours de cette thèse afin d'améliorer l'activité enzymatique en LI, moins de 50% de l'activité est récupérée à 70% (v/v) de **LI-1**. Par conséquent, d'autres phénomènes, tels que le pH ou la partition des molécules d'eau entre l'enzyme et le LI, pourraient également intervenir et conduire à l'inactivation du biocatalyseur.

L'élargissement de la banque de mutants permettra d'obtenir plus d'informations sur les propriétés physico-chimiques du biocatalyseur nécessaires à l'amélioration de son activité en présence de LI.

Une approche plus rationnelle serait de remplacer un certain nombre d'acides aminés polaires situés à la surface du biocatalyseur et exposés au solvant par des résidus apolaires et inversement. Ainsi, l'effet de la polarité de la surface du biocatalyseur sur son activité en LI pourra être étudiée. L'hypothèse étant que les biocatalyseurs dont la surface est polaire sont plus actifs en présence de LIs miscibles à l'eau.

Enfin, le greffage de cations pourrait être réalisé à la surface de mutants actifs en présence de LIs afin d'examiner l'aspect éventuellement cumulatif de ces deux approches.

Bibliographie

1 Abraham TE, Joseph JR, Bindhu LBV, Jayakumar KK. Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations. *Carbohydrate Research* 2004 ; **339** (6) : p. 1099-1104.

2 Affleck R, Haynes CA, Clark DS. Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992 ; **89** (11) : p. 5167-5170.

3 Ansorge-Schumacher MB, Slusarczyk H, Schumers J, Hirtz D. Directed evolution of formate dehydrogenase from Candida boidinii for improved stability during entrapment in polyacrylamide. *FEBS Journal* 2006 ; **273** (17) : p. 3938-3945.

4 Antikainen NM, Martin SF. Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; **13** (8) : p. 2701-2716.

5 Arnold FH. Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research* 1998 ; **31** (3) : p. 125-131.

6 Arnold FH. Engineering proteins for nonnatural environments. *FASEB Journal* 1993 ; **7** (9) : p. 744-749.

7 Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* 1996 ; **71** (4) : p. 2056-2063.

8 Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* 1996 ; **71** (4) : p. 2056-2063.

9 Batchelor JD, Olteanu A, Tripathy A, Pielak GJ. Impact of protein denaturants and stabilizers on water structure. *Journal of the American Chemical Society* 2004 ; **126** (7) : p. 1958-1961.

10 Bekhouche M, Blum LJ, Doumeche B. Ionic Liquid-Inspired Cations Covalently Bound to Formate Dehydrogenase Improve its Stability and Activity in Ionic Liquids. *ChemCatChem* 2011 ; **3** (5) : p. 875-882.

11 Bekhouche M, Doumeche B, Blum LJ. Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me2PO4]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2010 ; **65** (1-4) : p. 73-78.

12 Bindhu LV, Abraham TE. Preparation and kinetic studies of tensio-actif-horseradish peroxidase ion paired complex in organic media. *Biochemical Engineering Journal* 2003 ; **15** (1) : p. 47-57.

13 Biswas R, Pal SK. Caging enzyme function: alpha-chymotrypsin in reverse micelle. *Chemical Physics Letters* 2004 ; **387** (4-6) : p. 221-226.

14 Bommarius AS, Schwarm M, Drauz K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 1998 ; **5** (1-4) : p. 1-11.

15 Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, Kottenhahn M, Huthmacher K, Drauz K. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron Asymmetry* 1995 ; **6** (12) : p. 2851-2888.

16 Bose S, Armstrong DW, Petrich JW. Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose in Ionic Liquids: A Green Approach Toward the Production of Biofuels. *Journal of Physical Chemistry B* 2010 ; **114** (24) : p. 8221-8227.

17 Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976 ; **72** (1-2) : p. 248-254.

18 Brink LES, Tramper J, Luybent KCAM et Van 't Riet K. Biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 1988 ; **10** (12) : p. 736-743.

19 Brown L, Halling PJ, Johnston GA, Suckling CJ, Valivety RH. Water insoluble indicators for the measurement of pH in water immiscible solvents. *Tetrahedron Letters* 1990 ; **31** (40) : p. 5799-5802.

20 Bullen RA, Arnot TC, Lakeman JB, Walsh FC. Biofuel cells and their development. *Biosensors & Bioelectronics* 2006 ; **21** (11) : p. 2015-2045.

21 Cadwell RC, Joyce GF. Mutagenic PCR. *PCR-Methods and Applications* 1994 ; **3** (6) : p. S136-S140.

22 Camplo M, Wathier M, Chow J, Grinstaff MW. A versatile reagent to synthesize diverse ionic liquids ranging from small molecules and dendrimers to functionalized proteins. *Chemical Communications*

2011 ; **47** (7) : p. 2128-2130.

23 Chen KQ, Arnold FH. Enzyme engineering for nonaqueous solvents-random mutagenesis to enhance activity of subtilisin-E in polar organic media. *Bio-Technology* 1991 ; **9** (11) : p. 1073-1077.

24 Chen KQ, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993 ; **90** (12) : p. 5618-5622.

25 Ciaccafava A, Alberola M, Hameury S, Infossi P, Giudici-Orticoni MT, Lojou E. Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: From cytochrome c(3) redox behavior to hydrogenase activity. *Electrochimica Acta* 2011 ; **56** (9) : p. 3359-3368.

26 Clark DS. Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2004 ; **359** (1448) : p. 1299-1307.

27 Collins KD. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal* 1997 ; **72** (1) : p. 65-76.

28 Cowgill RW. Fluorescence and protein structure.17.On mechanism of peptide quenching. *Biochimica et Biophysica Acta* 1970 ; **200** (1) : p. 18-25.

29 Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting Low HDL-Cholesterol to Decrease Residual Cardiovascular Risk in the Managed Care Setting. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2009 ; **14** (8) : p. S3-S28.

30 Dabirmanesh B, Daneshjou S, Sepahi AA, Ranjbar B, Khavari-Nejad RA, Gill P, Heydari A, Khajeh K. Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related alpha-amylases. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011 ; **48** (1) : p. 93-97.

31 De Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the alpha-chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnology and Bioengineering* 2004 ; **88** (7) : p. 916-924.

32 De Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Understanding structure - Stability relationships of Candida antartica lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* 2005 ; **6** (3) : p. 1457-1464.

33 de Gonzalo G, Lavandera I, Durchschein K, Wurm D, Faber K, Kroutil W. Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalised water-miscible ionic liquids as solvents. *Tetrahedron Asymmetry* 2007 ; **18** (21) : p. 2541-2546.

34 de Maria PD, Maugeri Z. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Current Opinion in Chemical Biology* 2011 ; **15** (2) : p. 220-225.

35 De Temino DM, Hartmeier W, Ansorge-Schumacher MB. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from Lactobacillus kefir in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 2005 ; **36** (1) : p. 3-9.

36 Delinck DL, Margolin AL. Enzyme-catalyzed acylation of castanospermine and 1-deoxynojirimycin. *Tetrahedron Letters* 1990 ; **31** (22) : p. 3093-3096.

37 DeSantis G, Jones JB. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion In Biotechnology* 1999 ; **10** (4) : p. 324-330.

38 Distel KA, Zhu GY, Wang P. Biocatalysis using an organic-soluble enzyme for the preparation of poly(lactic acid) in organic solvents. *Bioresource Technology* 2005 ; **96** (5) : p. 617-623.

39 Dong A, Huang P, Caughey WS. Protein secondary structures in water from 2nd-derivative amide-I-infrared-spectra. *Biochemistry* 1990 ; **29** (13) : p. 3303-3308.

40 Dordick JS, Marletta MA, Klibanov AM. Peroxidases depolymerize lignin in organic media but not in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986 ; **83** (17) : p. 6255-6257.

41 Dordick JS. Enzymatic catalysis in monophasic organic-solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 1989 ; **11** (4) : p. 194-211.

42 Dube DK, Loeb LA. Manganese as a mutagenic agent during in-vitro DNA-synthesis. *Biochemical and*

Biophysical Research 1975 ; **67** (3) : p. 1041-1046.

43 Dutta AK, Kamada K, Ohta K. Spectroscopic studies of rouge du Nil in organic solvents and polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* 1996 ; **93** (1) : p. 57-64.

44 Dzyuba SV, Bartsch RA. Expanding the polarity range of ionic liquids. *Tetrahedron Letters* 2002 ; **43** (26) : p. 4657-4659.

45 Earle MJ, Engel BS, Seddon KR. Keto-enol tautomerism as a polarity indicator in ionic liquids. *Australian Journal of Chemistry* 2004 ; **57** (2) : p. 149-150.

46 Earle MJ, Seddon KR. Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure and Applied Chemistry* 2000 ; **72** (7) : p. 1391-1398.

47 Eckstein M, Sesing M, Kragl U, Adlercreutz P. At low water activity alpha-chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnology Letters* 2002 ; **24** (11) : p. 867-872.

48 Eftink MR, Ghiron CA. Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* 1981 ; **114** (2) : p. 199-127.

49 Eftink MR, Hagaman KA. Viscosity dependence of the solute quenching of the tryptophanyl fluorescence of proteins. *Biophysical Chemistry* 1986 ; **25** (3) : p. 277-282.

50 Erbeldinger M, Mesiano AJ, Russell AJ. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnology Progress* 2000 ; **16** (6) : p. 1129-1131.

51 Fang D, Cheng H, Gong K, Shi QR, Zhou XL, Liu ZL. A green and novel procedure for the preparation of ionic liquid. *Journal of Fluorine Chemistry* 2008 ; **129** (2) : p. 108-111.

52 Feher E, Major B, Belafi-Bako K, Gubicza L. On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochemical Society Transactions* 2007 ; **35** : p. 1624-1627.

53 Fujita K, Forsyth M, MacFarlane DR, Reid RW, EIliott GD. Unexpected improvement in stability and utility of cytochrome c by solution in biocompatible ionic liquids. *Biotechnology and Bioengineering* 2006 ; **94** (6) : p. 1209-1213.

54 Fujita K, MacFarlane DR, Forsyth M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. *Chemical Communications* 2005 ; **38** : p. 4804-4806.

55 Gale RJ, Osteryoung RA. Potentiometric investigation of dialuminium heptachloride formation in aluminium chloride 1-butylpyridinium chloride mixtures. *Inorganic Chemistry* 1979 ; **18** (6) : p. 1603-1605.

56 Guo YZ, Dong SJ. Organic phase enzyme electrodes based on organohydrogel. *Analytical Chemistry* 1997 ; **69** (10) : p. 1904-1908.

57 Gupta MN. Enzyme function in organic-solvents. *European Journal of Biochemistry* 1992 ; **203** (1-2) : p. 25-32.

58 Halling PJ. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme an Microbial Technology* 1994 ; **16** (3) : p. 178-206.

59 Hapiot P, Lagrost C. Electrochemical reactivity in room-temperature ionic liquids. *Chemical Reviews* 2008 ; **108** (7) : p. 2238-2264.

60 Hartmeier W. Immobilized biocatalysts: An introduction. *Springer-Verlag* 1988 ; Berlin, Heidelberg.

61 Heinemann M, Wagner T, Doumeche B, Ansorge-Schumacher M, Buchs J. A new approach for the spatially resolved qualitative analysis of the protein distribution in hydrogel beads based on confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 2002 ; **24** (10) : p. 845-850.

62 Hinckley G, Mozhaev VV, Budde C, Khmelnitsky YL. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnology Letters* 2002 ; **24** (24) : p. 2083-2087.

63 Hribar B, Southall NT, Vlachy V, Dill KA. How ions affect the structure of water. *Journal of the American Chemical Society* 2002 ; **124** (41) : p. 12302-12311.

64 Hudson EP, Eppler RK, Clark DS. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Current Opinion in Biotechnology* 2005 ; **16** (6) : p. 637-643.

65 Hummel W, Kula MR. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry* 1989 ; **184** (1) : p. 1-13.

66 Hussain W, Pollard DJ, Truppo M, Lye GJ. Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2008 ; **55** (1-2) : p. 19-29.

67 Iregren A. Behavioral methods and organic solvents: Questions and consequences. *Environmental Health Perspectives* 1996 ; **104** : p. 361-366.

68 Isowa Y, Ohmori M, Ichikawa T, Mori K, Nonaka Y, Kihara K, Oyama K, Satoh H, Nishimura S. Thermolysin-catalyzed condensation-reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl esters. *Tetrahedron Letters* 1979 ; **28** : p. 2611-2612.

69 Ito M, Oda K. An organic solvent resistant tyrosinase from Streptomyces sp REN-21: Purification and characterization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2000 ; **64** (2) : p. 261-267.

70 Jones G and Dole M. Viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride. *Journal of the American Chemical Society* 1929 ; **51** : p. 2950–2964.

71 Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society* 2003 ; **125** (14) : p. 4125–4131.

72 Kaftzik N, Wasserscheid P, Kragl U. Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the beta-galactosidase catalysed synthesis of N-acetyllactosamine. *Organic Process Research and Development* 2002 ; **6** (4) : p. 553-557.

73 Kamal JKA, Xia TB, Pal SK, Zhao L, Zewail AH. Enzyme functionality and solvation of Subtilisin Carlsberg: from hours to femtoseconds. *Chemical Physics Letters* 2004 ; **387** (4-6) : p. 209-215.

74 Kamiya N, Murakami E, Goto M, Nakashio F. Effect of using a co-solvent in the preparation of tensio-actif-coated lipases on catalytic activity in organic media. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1996 ; **82** (1) : p. 37-41.

75 Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 2005 ; **1751** (2) : p. 119-139.

76 Khmelnitsky YL, Rich JO. Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999 ; **3** (1) : p. 47-53.

77 Khmelnitsky YL, Welch SH, Clark DS, Dordick JS. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic-solvents. *Journal of the American Chemical Society* 1994 ; **116** (6) : p. 2647-2648.

78 Kimura Y, Muraya K, Araki Y, Matsuoka H, Nakanishi K, Matsuono R. Synthesis of peptides consisting of essential amino-acids by a reactor system using 3 proteinases and an organic solvent. *Agricultural and Biological Chemistry* 1990 ; **54** (12) : p. 3331-3333.

79 Klahn M, Lim GS, Seduraman A, Wu P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemistry Physics* 2011 ; **13** (4) : p. 1649-1662.

80 Klibanov AM. Enzymatic catalysis in anhydrous organic-solvents. *Trends in Biochemical Sciences* 1989 ; **14** (4) : p. 141-144.

81 Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001 ; **409** (6817) : p. 241-246.

82 Klibanov AM. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* 1997 ; **15** (3) : p. 97-101.

83 Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007 ; **39** (8) : p. 549-559.

84 Krell T, Horsburgh MJ, Cooper A, Kelly SM, Coggins JR. Localization of the active site of type II dehydroquinases - Identification of a common arginine-containing motif in the two classes of dehydroquinases. *Journal of Biological Chemistry* 1996 ; **271** (40) : p. 24492-24497.

85 Krishna SH. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances* 2002 ; **20** (3-4) : p. 239-267.

86 Kuhl P, Halling PJ, Jakubke HD. Chymotrypsin suspended in organic-solvents with salt hydrates is a good catalyst for peptide-synthesis from mainly undissolved reactants. *Tetrahedron Letters* 1990 ; **31** (36) : p. 5213-5216.

87 Kuhl P, Halling PJ. Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin-catalyzed peptide-synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991 ; **1078** (3) : p. 326-328.

88 Kvittingen L, Sjursnes B, Anthonsen T, Halling P. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media – a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron* 1992 ; **48** (13) : p. 2793-2802.

89 Kvittingen L. Some aspects of biocatalysis in organic solvents. *Tetrahedron* 1994 ; **50** (28) : p. 8253-8274.

90 Labrou NE, Rigden DJ. Active-site characterization of Candida boidinii formate dehydrogenase. *Biochemical Journal* 2001 ; **354** : p. 455-463.

91 Lamzin VS, Aleshin AE, Strokopytov BV, Yukhnevich MG, Popov VO, Harutyynyan EH, Wilson KS. Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 1992 ; **206** (2) : p. 441-452.

92 Langat J, Bellayer S, Hudrlik P, Hudrlik A, Maupin PH, Gilman JW, Raghavan D. Synthesis of imidazolium salts and their application in epoxy montmorillonite nanocomposites. *Polymer* 2006 ; **47** (19) : p. 6698-6709.

93 Laszlo JA, Compton DL. alpha-chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology and Bioengineering* 2001 ; **75** (2) : p. 181-186.

94 Latala A, Stepnowski P, Nedzi M, Mrozik W. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae Oocystis submarina and Cyclotella meneghiniana. *Aquatic Toxicology* 2005 ; **73** (1) : p. 91-98.

95 Lau RM, van Rantwijk F, Seddon KR, Sheldon RA. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* 2000 ; **2** (26) : p. 4189-4191.

96 Lee JM, Prausnitz JM. Polarity and hydrogen-bond-donor strength for some ionic liquids: Effect of alkyl chain length on the pyrrolidinium cation. *Chemical Physics Letters* 2010 ; **492** (1-3) : p. 55-59

97 Lehrer SS. Solute perturbation of protein fluorescence – quenching of tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry* 1971 ; **10** (17) : p. 3254-3263

98 Lesk AM. NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology* 1995 ; **5** (6) : p. 775-783.

99 Liu QB, Janssen MHA, van Rantwijk F, Sheldon RA. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chemistry* 2004 ; **7** (1) : p. 39-42.

100 Lopes JNAC, Padua AAH. Nanostructural organization in ionic liquids. *Journal of Physical Chemistry B* 2006 ; **110** (7) : p. 3330-3335.

101 Lozano P, De Diego T, Carrie D, Vaultier M, Iborra JL. Over-stabilization of Candida antarctica lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters* 2001 ; **23** (18) : p. 1529-1533.

102 Marcus Y. Viscosity B-coefficients, structural entropies and heat-capacities, and the effects of ions on the structure of water. *Journal of Solution Chemistry* 1994 ; **23** (7) : p. 831-848.

103 Martinez P, Arnold FH. Surface charge substitutions increase the stability of alpha-lytic protease in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 1991 ; **113** (16) : p. 6336-6337.

104 Maruyama T, Nagasawa S, Goto M. Poly(ethylene glycol)-lipase complex that is catalytically active for alcoholysis reactions in ionic liquids. *Biotechnology Letters* 2002 ; **24** (16) : p. 1341-1345.

105 Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009 ; **20** (5) : p. 513-557.

106 Matyus L, Szollosi J, Jenei A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2006 ; **83** (3) : p. 223-236.

107 Micaelo NM, Soares CM. Protein structure and dynamics in ionic liquids. Insights from molecular dynamics simulation studies. *Journal of Physical Chemistry B* 2008 ; **112** (9) : p. 2566-2572.

108 Moniruzzaman M, Kamiya N, Goto A. Biocatalysis in Water-in-Ionic Liquid Microemulsions: A Case Study with Horseradish Peroxidase. *Langmuir* 2009 ; **25** (2) : p. 977-982.

109 Moniruzzaman M, Kamiya N, Nakashima K, Goto M. Water-in-ionic liquid microemulsions as a new medium for enzymatic reactions. *Green Chemistry* 2008 ; **10** (5) : p. 497-500.

110 Moniruzzaman M, Nakashima K, Kamiya N, Goto M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal* 2010 ; **48** (3) : p. 295-314.

111 Munro AW, Lindsay JG, Coggins JR, Kelly SM, Price NC. Structural and enzymological analysis of the interaction of isolated domains of cytochrome-P-450 BM3. *FEBS Letters* 1994 ; **343** (1) : p. 70-74.

112 Nakanichi K, Takeuchi A, Matsuno R. Long-term continuous synthesis of aspartame precursor in a column reactor with an immobilized thermolysin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990 ; **32** (6) : p. 633-636.

113 Nakashima K, Kamiya N, Koda D, Maruyama T, Goto M. Enzyme encapsulation in microparticles composed of polymerized ionic liquids for highly active and reusable biocatalysts. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2009 ; **7** (11) : p. 2353-2358.

114 Nakashima K, Maruyama T, Kamiya N, Goto M. Homogeneous enzymatic reactions in ionic liquids with poly(ethylene glycol)modified subtilisin. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2006a ; **4** (18) : p. 3462-3467.

115 Nakashima K, Okada J, Maruyama T, Kamiya N, Goto M. Activation of lipase in ionic liquids by modification with comb-shaped poly(ethylene glycol). *Science and Technology of Advanced Materials* 2006b ; **7** (7) : p. 692-698.

116 Okazaki SY, Kamiya N, Goto M, Nakashio F. Enantioselective esterification of glycidol by tensio-actif-lipase complexes in organic media. *Biotechnology Letters* 1997 ; **19** (6) : p. 541-543.

117 Page TA, Kraut ND, Page PM, Baker GA, Bright FV. Dynamics of Loop 1 of Domain I in Human Serum Albumin When Dissolved in Ionic Liquids. *Journal of Physical Chemistry B* 2009 ; **113** (38) : p. 12825-12830.

118 Palmore GTR, Bertschy H, Bergens SH, Whitesides GM. A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD^+-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1998 ; **443** (1) : p. 155-161.

119 Pantoliano MW, Whitlow M, Wood JF, Dodd SW, Hardman KD, Rollence ML, Bryan PN. Large increases in general stability fro subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding. *Biochemistry* 1989 ; **28** (18) : p. 7205-7213.

120 Pantoliano MW. Proteins designed for challenging environments and catalysis in organic solvents. *Current Opinion in Structural Biology* 1992 ; **2** : p. 559-568.

121 Park S, Kazlauskas RJ. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Journal of organic chemistry* 2001 ; **66** (25) : p. 8395-8401.

122 Patel RN, McNamee CM, Szarka LJ. Enantioselective enzymatic acetylation of racemic [4-[4α,6β (E)]]-6-[4,4-bis(4-fluorophenyl)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,3-butadienyl]-tetrahydro-4-hydroxy-2H-pyran-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992 ; **38** (1) : p. 56-60.

123 Pavlidis IV, Gournis D, Papadopoulos GK, Stamatis H. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: Structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2009 ; **60** (1-2) : p. 50-56.

124 Peacock D, Boulter D. Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase. *Biochemical Journal* 1970 ; **120** : p. 763-769.

125 Persson M, Bornscheuer UT. Increased stability of an esterase from Bacillus stearothermophilus in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2003 ; **22** (1-2) : p. 21-27.

126 Petoukhov MV, Svergun DI. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Current Opinion in Structural Biology* 2007 ; **17** (5) : p. 562-571.

127 Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology* 2007 ; **25** (2) : p. 66-73.

128 Ranke J, Molter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczobutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute Vibrio fischeri and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004 ; **58** (3) : p. 396-404

129 Ranke J, Muller A, Bottin-Weber U, Stock F, Stolte S, Arning J, Stormann R, Jastorff B. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007 ; **67** (3) : p. 430-438.

130 Reshetnyak YK, Koshevnik Y, Burstein EA. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophysical Journal* 2001 ; **81** (3) : p. 1735-1758.

131 Retama JR, Lopez-Ruiz B, Lopez-Cabarcos E. Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. *Biomaterials* 2003 ; **24** (17) : p. 2965-2973.

132 Rodakiewicz-Nowak J, Ito M. Effect of AOT on enzymatic activity of the organic solvent resistant tyrosinase from Streptomyces sp REN-21 in aqueous solutions and water-in-oil microemulsions. *Journal of Colloid and Interface* 2005 ; **284** (2) : p. 674-679.

133 Ru MT, Hirokane SY, Lo AS, Dordick JS, Reimer JA, Clark DS. On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: Effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. *Journal of the American Chemical Society* 2000 ; **122** (8) : p. 1565-1571.

134 Ruiz JL, Ferrer J, Pire C, Llorca FI, Bonete MJ. Denaturation studies by fluorescence and quenching of thermophilic protein NAD(+)-glutamate dehydrogenase from Thermus thermophilus HB8. *Journal of Protein Chemistry* 2003 ; **22** (3) : p. 295-301.

135 Salminen J, Papaiconomou N, Kumara RA, Lee JM, Kerr J, Newman J, Prausnitz JM. Physicochemical properties and toxicities of hydrophobic piperidinium and pyrrolidinium ionic liquids. *Fluid Phase Equilibria* 2007 ; **261** (1-2) : p. 421-426.

136 Schirwitz K, Schmidt A, Lamzin VS. High-resolution structures of formate dehydrogenase from Candida boidinii. *Protein Science* 2007 ; **16** (6) : p. 1146-1156

137 Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 2001 ; **409** (6817) : p. 258-268.

138 Schulze B, Wubbolts MG. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* 1999 ; **10** (6) : p. 609-615.

139 Schutte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from Candida boidinii. *European Journal of Biochemistry* 1976 ; **62** (1) : p. 151-160.

140 Sellek GA, Chaudhuri JB. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology* 1999 ; **25** (6) : p. 471-482.

141 Serdakowski AL, Dordick JS. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology* 2008 ; **26** (1) : p. 48-54.

142 Shah S, Solanki K, Gupta MN. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal* 2007 ; **1** : article number 30.

143 Sieffert N, Wipff G. The [BMI][Tf2N] ionic liquid/water binary system: A molecular dynamics study of phase separation and of the liquid-liquid interface. *Journal of Physical Chemistry B* 2006 ; **110** (26) : p. 13076-13085.

144 Singer SJ. The properties of proteins in nonaqueous solvents. *Advances in Protein Chemistry* 1962 ; **17** : p. 1-68.

145 Somogyi B, Lakos Z. Protein dynamics and fluorescence quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 1993 ; **18** (1) : p. 3-16.

146 Song HY, Yao JH, Liu JZ, Zhou SJ, Xiong YH, Ji LN. Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase stability and structure. *Enzyme and Microbial Technology* 2005 ; **36** (4) : p. 605-611.

147 Stemmer WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly – In-vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994 ; **91** (22) : p. 10747-10751.

148 Svergun DI, Koch MHJ. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Current Opinion in Structural Biology* 2002 ; **12** (5) : p. 654-660.

149 Sym EA. Action of esterase in the presence of organic solvents. *Biochemical Journal* 1936 ; **30** (part 1) : p. 609-617.

150 Sym EA. Lipase and its action. I. The synthetic action of pancreatic lipase in the system: Oleic acid-glycerol-water dissolved lipase. *Biochemical Journal* 1930 ; **24** (5) : p. 1265-1281.

151 Tanford C, De PK. Unfolding of beta-lactoglobulin at pH 3 by urea, formamide, and other organic substances. *Journal of Biological Chemistry* 1961 ; **263** (6) : p. 1711-1715.

152 Taylor DL, Kang MS, Brennan TM, Bridges CG, Sunkara PS, Tyms AS. Inhibition of alpha-glucosidase-I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-O-butanoyl castanosperrmine (MDL-28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T-cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994 ; **38** (8) : p. 1780-1787.

153 Thi PTP, Cho CW, Yun YS. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research* 2010 ; **44** (2) : p. 352-372.

154 Tishkov VI, Matorin AD, Rojkova AM, Fedorchuk VV, Savitsky PA, Dementieva LA, Lamzin VS, Mezentzev AV, Popov VO. Site-directed mutagenesis of the formate dehydrogenase active centre: Role of the His(332)-G1n(313) pair in enzyme catalysis. *FEBS Letters* 1996 ; **390** (1) : p. 104-108.

155 Tishkov VI, Popov VO. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry-Moscow* 2004 ; **69** (11) : p. 1252-1267.

156 Tishkov VI, Popov VO. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering* 2006 ; **23** (2-3) : p. 89-110.

157 Tobin MB, Gustafsson C, Huisman GW. Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Current Opinion in Structural Biology* 2000 ; **10** (4) : p. 421-427.

158 Tramper J. Immobilizing biocatalysts for use in syntheses. *Trends in Biotechnology* 1985 ; **3** (2) : p. 45-50.

159 Turner MB, Spear SK, Huddleston JG, Holbrey JD, Rogers RD. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from Trichoderma reesei. *Green Chemistry* 2003 ; **5** (4) : p. 443-447.

160 Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. Reaction-rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic-solvents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992 ; **1118** (3) : p. 218-222.

161 Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media – effects of supports, loading and enzyme preparation. *European Journal of Biochemistry* 1994 ; **222** (2) : p. 461-466.

162 van der Donk WA, Zhao HM. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology* 2003 ; **14** (4) : p. 421-426.

163 van Rantwijk F, Lau RM, Sheldon RA. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology* 2003 ; **21** (3) : p. 131-138.

164 van Rantwijk F, Sheldon RA. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews* 2007 ; **107** (6) : p. 2757-2785.

165 Vazquez-Duhalt R, Fedorak PM, Westlake DWS. Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic-solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 1992 ; **14** (10) : p. 837-841.

166 Verger R, Rietsch J, Vandammieras MCE, Haas GHD. Comparative studies of lipase and phospholipase A2 acting on substrate monolayers. *Journal of Biological Chemistry* 1976 ; **251** (10) : p. 3128-3133.

167 Vinals C, Depiereux E, Feytmans E. Prediction of structurally conserved regions of D-specific hyfroxy acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993 ; **192** (1) : p. 182-188.

168 Vitz J, Erdmenger T, Haensch C, Schubert US. Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. *Green Chemistry* 2009 ; **11** (3) : p. 417-424.

169 Wakai C, Oleinikova A, Ott M, Weingartner H. How polar are ionic liquids? Determination of the static dielectric constant of an imidazolium-based ionic liquid by microwave dielectric spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 2005 ; **109** (36) : p. 17028-17030.

170 Walker AJ, Bruce NC. Cofactor-dependent enzyme catalysis in functionalized ionic solvents. *Chemical Communications* 2004 ; **22** : p. 2570-2571.

171 Wangikar PP, Michels PC, Clark DS, Dordick JS. Structure and function of subtilisin BPN' solubilized in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 1997 ; **119** (1) : p. 70-76.

172 Wehofsky N, Wespe C, Cerovsky V, Pech A, Hoess E, Rudolph R, Bordusa F. Ionic liquids and proteases: A clean alliance for semisynthesis. *ChemBioChem* 2008 ; **9** (9) : p. 1493-1499.

173 Wei D, Ivaska A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. *Analytica Chimica Acta* 2008 ; **607** (2) : p. 126-135.

174 Weingaertner H. Understanding ionic liquids at the molecular level: Facts, problems, and controversies. *Angewandte Chemie-International Edition* 2008 ; **47** (4) : p. 654-670.

175 Wilkes JS, Levisky JA, Wilson RA, Hussel CL. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-tempreature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy, and synthesis. *Inorganic Chemistry* 1982 ; **21** (3) : p. 1263-1264.

176 Wilkes JS, Zaworotko MJ. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1992 ; **13** : p. 965-967.

177 Willaert K, Engelborghs Y. The quenching of tryptophan fluorescence by protonated and unprotonated imidazole. *European Biophysics Journal* 1991 ; **20** (3) : p. 177-182.

178 Wohlgemuth R. Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* 2010 ; **21** (6) : p. 713-724.

179 Wong TS, Roccatano D, Zacharias M, Schwaneberg U. A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *Journal of Molecular Biology* 2006 ; **355** (4) : p. 858-871.

180 Yagasaki M, Hashimoto S. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008 ; **81** (1) : p. 13-22.

181 Yang L, Dordick JS, Garde S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical Journal* 2004 ; **87** (2) : p. 812-821.

182 Yang Z, Pan WB. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 2005 ; **37** (1) : p. 19-28.

183 Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology* 2009 ; **144** (1) : p. 12-22.

184 You L, Arnold FH. Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Engineering* 1996 ; **9** (1) : p. 77-83.

185 Zaccai G, Jacrot B. Small angle neutron scattering. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 1983 ; **12** : p. 139-157.

186 Zaks A, Dodds DR. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today* 1997 ; **2** (12) : p. 513-531.

187 Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic Catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry* 1988a ; **263** (7) : p. 3194-3201.

188 Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100-degrees-C. *Science* 1984 ; **224** (4654) : p. 1249-1251.

189 Zaks A, Klibanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985 ; **82** (10) : p. 3192-3196.

190 Zaks A, Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry* 1988b ; **263** (17) : p. 8017-8021.

191 Zaks A, Russell AJ. Enzymes in organic solvents : properties and applications. *Journal of Biotechnology* 1988 ; **8** (4) : p. 259-270.

192 Zhang LY, Yang Y, Kao YT, Wang LJ, Zhong DP. Protein hydration dynamics and molecular mechanism of coupled water-protein fluctuations. *Journal of the American Chemical Society* 2009 ; **131** (30) : p. 10677-10691.

193 Zhao H, Campbell S, Solomon J, Song ZY, Olubajo O. Improving the enzyme catalytic efficiency using ionic liquids with kosmotropic anions. *Chinese Journal of Chemistry* 2006b ; **24** (4) : 580-584.

194 Zhao H, Jones CL, Cowins JV. Lipase dissolution and stabilization in ether-functionalized ionic liquids. *Green Chemistry* 2009 ; **11** (8) : p. 1128-1138.

195 Zhao H, Olubajo O, Song ZY, Sims AL, Person TE, Lawal RA, Holley LA. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorganic Chemistry* 2006 ; **34** (1) : p. 15-25.

196 Zhao H. Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006d ; **81** (6) : 877-891.

197 Zhou GP, Zhang Y, Huang XR, Shi CH, Liu WF, Li YZ, Qu YB, Gao PJ. Catalytic activities of fungal oxidases in hydrophobic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate-based microemulsion. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2008 ; **66** (1) : p. 146-149.

Annexes

Annexe I : Séquence de la construction de la FDH synthétisée.

Annexe II : Séquence de la FDH clonée dans le vecteur pET-28b et pUC57.

Annexe III : Liste des fragments peptidiques attribués après digestion de la FDH sauvage et de la FDH modifiée par les cations **3**, **1a** et **1b** après digestion avec la trypsine.

Annexe IV : Liste des fragments peptidiques attribués après digestion de la FDH sauvage et de la FDH modifiée par les cations **3**, **1a** et **1b** après digestion avec la chymotrypsine.

Annexe V : Alignement des séquences nucléotidiques de la FDH sauvage et du mutant 34.

Annexe VI : Alignement des séquences géniques issues du séquençage du mutant 60.

Annexe VII : Alignement des séquences géniques issues du séquençage du mutant 66.

Annexe VIII : Contrôle de la purification de la FDH sur hydroxyapatite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Annexe IX : Publications.

Annexe I : Séquence de la construction de la FDH synthétisée.

BamHI -1 extra ntd -stop-SD-extra ntds – ORF – stop - XhoI - XbaI

ntd(s) : nucléotide(s)

SD : sequence de Shine et Dalgarno

ORF : Open Reading Frame ; phase ouverte de lecture

```
GGATCCATAAAAGGAGATATACCatgaagattgtcttagttctttatgatgctggtaagcacgctgctgatgaaga
aaaattatatggttgtactgaaaataaattaggtattgccaattggttaaaagatcaaggtcatgaactaattact
acttctgataaagaaggtgaaacaagcgaattggataaacatatcccagatgctgatattatcatcaccactcctt
tccatcctgcttatatcactaaggaaagacttgacaaggctaagaacttaaaattagtcgttgtcgctggtgttgg
ttctgatcacattgatttagattatattaatcaaacaggtaagaaaatctcagtcctggaagttacaggttctaat
gttgtctctgttgctgaacacgttgtcatgaccatgcttgtcttggttagaaatttcgttccagcacatgaacaaa
ttattaaccacgattgggaggttgctgctatcgctaaggatgcttacgatatcgaaggtaaaactatcgctaccat
tggtgctggtagaattggttacagagtcttggaaagattactcccatttaatccaaaagaattattatactacgat
tatcaagctttaccaaaagaagctgaagaaaaagttggtgctagaagagttgaaaatattgaagaattagttgctc
aagctgatatcgttacagttaatgctccattacacgcaggtacaaaaggtttaattaataaggaattattatctaa
atttaaaaaaggtgcttggttagtcaataccgcaagaggtgctatttgtgttgctgaagatgttgcagcagcttta
gaatctggtcaattaagaggttacggtggtgatgtttggttcccacaaccagctccaaaggatcacccatggagag
atatgagaaataaatatggtgctggtaatgccatgactcctcactactctggtactactttagacgctcaaacaag
atacgctgaaggtactaaaaatattttggaatcattctttaccggtaaatttgattacagaccacaagatattatc
ttattaaatggggaatacgttactaaagcttacggtaaacacgataagaaatagCTCGAGTCTAGA
```

Taille de l'insert : 1130 pb

Annexe II : Séquence de la FDH clonée dans le vecteur pET-28b et pUC57.

Annexe II – a : Séquence dans le vecteur pET-28b : pET-28b-FDH

Seules les séquences du vecteur pET-28b bordant la séquence de la FDH sont représentées. Les séquences des sites de restriction de BamHI et de XhoI sont respectivement surlignées en gris et en bleu. Les sites d'hybridation des amorces T7 Pro. (5'-ttaatacgactcactatagg-3') et T7 ter. (5'-ccaaggggttatgctag-3') sont respectivement surlignés en bleu et en noir.

```
CCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCC
CATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGC
GTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
TCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAC
AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCATA
AAAGGAGATATACCATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATA
TGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGAT
AAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTG
CTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCA
CATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCT
GTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACC
ACGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGG
TAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCT
TTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATA
TCGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAAAAA
AGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGT
CAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAA
ATAAATATGGTGCTGGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAAACAAGATACGCTGA
AGGTACTAAAAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGATTACAGACCACAAGATATTATCTTATTAAAT
GGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGA
TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCC
TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT
```

Taille des fragments d'ADN plasmidique :

- pET-28b : 5368 pb
- pET-28b-FDH : 6446 pb
- pET-28b-FDH digéré par BamHI/XhoI : 5328 pb + 1118 pb

Taille du produit de PCR : 1416 pb

Annexe II – b : Séquence dans le vecteur pUC57 : pUC57-FDH

Seule une partie de la séquence du vecteur pUC57 bordant la séquence de la FDH est représentée. La séquence du site de restriction de BamHI est surlignée en gris, celle de XhoI en bleu et celle de XbaI en vert. Les sites d'hybridation des amorces 5'-ggcccgggatccataa-3' et 5'-atgcatctagactcgagct-3' sont respectivement surlignés en bleu et en noir.

```
GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCT
CCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC
GCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAGGCCTCT
GCAGTCGACGGGCCCGGGATCCATAAAAGGAGATATACCATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATGCTGGT
AAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATC
AAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGA
TATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTA
GTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCC
TGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTT
CGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAA
GGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCCAA
AAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAA
TATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATT
AATAAGGAATTATTATCTAAATTTAAAAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTG
AAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCC
AAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAATAAATATGGTGCTGGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACT
ACTTTAGACGCTCAAACAAGATACGCTGAAGGTACTAAAAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGATT
ACAGACCACAAGATATTATCTTATTAAATGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAGCT
CGAGTCTAGATGCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
CGCACCGATCGCCCTTC
```

Taille des fragments d'ADN plasmidique :

- pUC57 : 2710 pb
- pUC57-FDH : 3824 pb
- pUC57-FDH digéré par BamHI/XhoI : 2706 pb + 1118 pb
- pUC57-FDH digéré par BamHI/XbaI : 2712 pb + 1124 pb

Taille du produit de PCR : 1141 pb

Annexe III : Liste des fragments peptidiques attribués après digestion de la FDH sauvage et de la FDH modifiée par les cations **3**, **1a** et **1b** après digestion avec la trypsine.

K sont les lysines potentiellement modifiables et **C** sont les cystéines acétylées. Le nombre de site de clivage où l'enzyme n'a pas agit est entre parenthèses et le nombre de modification est indiqué par X/Xmax où X est le nombre de résidus lysine modifié et Xmax est le nombre total de lysine du peptide.

		séquence	$[M+H]^+$ attendu[b]	$[M+H]^+$ trouvé[a]
FDH	13-27	HAADEE**K**LYGCTEN**K** (1)	1707.7642	1708.91
	77-83	ERLD**K**A**K**	859.4996	859.49
	137-165	NFVPAHEQIINHDWEVAAIA**K**DAYDIEG**K** (1)	3293.6225	3292.70
	166-174	TIATIGAGR	859.4996	859.49
	175-182	IGYRVLER (1)	1005.5840	1005.57
	190-201	ELLYYDYQALP**K** (1)	1515.7729	1516.75
	190-210	ELLYYDYQALP**K**EAEE**K**VGA R (2)	2485.2609	2484.30
	183-210	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**EAEE**K**VGAR (3)	3294.7408	3294.68
	211-236	RVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGT**K** (1)	2787.4999	2787.43
	211-246	RVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGT**K**GLIN**K**ELLS**K** (3)	3883.1650	3884.19
	237-258	GLIN**K**ELLS**K**F**KK**GAWLVNTAR (4)	2486.4605	2486.30
	247-258	F**KK**GAWLVNTAR (2)	1390.7953	1390.80
	249-258	**K**GAWLVNTAR (1)	1115.6320	1115.63
	250-258	GAWLVNTAR	987.5370	987.54
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR	1872.9483	1873.03
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR	1930.9538	1931.06
	278-291	GYGGDVWFPQPAP**K**	1518.7375	1518.76
	292-296	DHPWR	710.3369	710.33
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1)	2210.0566	2210.22
	302-322	YGAGNAMTPHYSGTTLDAQTR (0)	2212.0087	2212.19
	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDAQTR (1)	2454.1466	2454.15
FDH-3	20-35	LYGCTEN**K**LGIANWL**K** (1) 1/2	1952,0310	1953.23
	20-47	LYGCTEN**K**LGIANWL**K**DQGHELITTSD**K** (2) 1/3	3334,6623	3334.59
	20-47	LYGCTEN**K**LGIANWL**K**DQGHELITTSD**K** (2) 2/3	3463,7413	3464.43
	48-83	EGETSELD**K**HIPDADIIITTPFHPAYIT**K**ERLD**K**A**K** (4) 4/4	4608.4447	4609.11
	57-81	HIPDADIIITTPFHPAYIT**K**ERLD**K** (2) 1/2	3033.6407	3034.44
	77-86	ERLD**K**A**K**NL**K** (3) 3/3	1601,9585	1600.98
	79-86	LD**K**A**K**NL**K** (2) 2/3	1187,7358	1187.61
	79-86	LD**K**A**K**NL**K** (2) 3/3	1316.8148	1316.12
	137-157	NFVPAHEQIINHDWEVAAIA**K** (0) 0/1	2402.2251	2402.28
	158-174	DAYDIEG**K**TIATIGAGR (1) 0/1	1750.8969	1751.95
	166-182	TIATIGAGRIGYRVLER (2) 0/3	1846.0657	1846.00
	179-206	VLERLLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**EAEE**K** (3) 0/3	3408.8089	3408.25
	183-201	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K** (1) 0/2	2325.2529	2326.38
	183-201	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K** (1) 1/2	2454,3319	2454.15
	183-201	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K** (1) 2/2	2583.4109	2583.18
	183-210	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**EAEE**K**VGAR (3) 1/3	3423,8198	3423.59
	190-201	ELLYYDYQALP**K** (0) 1/1	1644.8519	1644.99
	190-206	ELLYYDYQALP**K**EAEE**K** (1) 1/2	2231,1118	2230.21
	190-210	ELLYYDYQALP**K**EAEE**K**VGAR (0) 0/2	2485.2609	2485.27
	207-241	VGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGT**K**GLIN**K** (3) 2/2	3954.2134	3954.66
	211-236	RVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGT**K** (1) 0/1	2787.4999	2787.41
	211-241	RVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGT**K**GLIN**K** (2) 1/2	3441,9063	3441.73
	237-246	GLIN**K**ELLS**K** (1) 1/2	1243.7620	1243.74
	237-248	GLIN**K**ELLS**K**F**K** (2) 3/3	1777.0834	1777.12
	237-249	GLIN**K**ELLS**K**F**KK** (3) 1/4	1647,0203	1647.87
	237-258	GLIN**K**ELLS**K**F**KK**GAWLVNTAR (4) 1/4	2615,5395	2615.21
	242-248	ELLS**K**F**K** (1) 0/2	1244,7110	1245.69
	242-249	ELLS**K**F**KK** (2) 2/3	1250,7719	1251.49

	247-258	F**KK**GAWLVNTAR (2) 0/2	1390.7953	1390.78
	249-258	**K**GAWLVNTAR (0) 0/1	1115.6320	1115.60
	249-258	**K**GAWLVNTAR (1) 1/1	864.5189	864.46
	250-258	GAWLVNTAR (0) 0/1	987.5370	987.54
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR (0) 0/0	1872.9483	1873.02
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR (0) 0/0	1930.9538	1930.03
	278-291	GYGGDVWFPQPAP**K** (0) 1/1	1647,8165	1647.87
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1) 0/1	2210.0566	2210.20
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1) 1/1	2339,1356	2339.21
	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDAQTR (1) 0/1	2454.1466	2454.15
	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDAQTR (1) 1/1	2583.2256	2583.18
	302-322	YGAGNAMTPHYSGTTLDAQTR (0) 0/0	2212.0087	2212.15
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 0/2	1804.9115	1805.02
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 1/2	1933,9905	1934.07
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 2/2	2063,0695	2064.17
	323-356	YAEGT**K**NILESFFTG**K**FDYRPQDIILLNGEYVT**K** (2) 0/3	3970.0272	3971.56
	339-356	FDYRPQDIILLNGEYVT**K** (1) 0/1	2184,1335	2183.24
	357-363	AYG**K**HD**KK** (2) 2/3	1204,6685	1204.66
FDH-1a	20-35	LYGCTEN**K**LGIANWL**K** (1) 1/2	2033.0160	2034.19
	48-56	EGETSELD**K** (0) 1/1	1159.5113	1158.98
	57-81	HIPDADIIITTPFHPAYIT**K**ERLD**K** (2) 0/2	2904.5617	2903.37
	57-86	HIPDADIIITTPFHPAYIT**K**ERLD**K**A**K**NL**K** (4) 3/4	3915.0915	3916.10
	57-86	HIPDADIIITTPFHPAYIT**K**ERLD**K**A**K**NL**K** (4) 4/4	4067,1501	4068.91
	77-86	ERLD**K**A**K**NL**K** (3) 1/3	1366.7801	1366.78
	77-86	ERLD**K**A**K**NL**K** (3) 3/3	1670.8973	1670.90
	79-83	LD**K**A**K** (1) 1/2	726.4145	726.45
	79-86	LD**K**A**K**NL**K** (2) 3/3	1385.7536	1385.82
	158-174	DAYDIEG**K**TIATIGAGR (1) 1/1	1902.9555	1902.20
	158-178	DAYDIEG**K**TIATIGAGRIGY R (2) 0/1	2240.1669	2240.17
	183-189	LLPFNP**K** (0) 0/1	828.4978	829.47
	183-201	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K** (1) 1/2	2477.3115	2477.37
	183-210	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**E AEE**K**VGAR (3) 1/3	3446.7994	3446.74
	183-206	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**E AEE**K** (2) 1/3	3063.5713	3063.55
	190-206	ELLYYDYQALP**K**EAEE**K** (1) 0/2	2102.0328	2101.05
	202-210	EAEE**K**VGAR (1) 1/1	1140,5644	1141.68
	211-241	RVENIEELVAQADIVTVNAP LHAGT**K**GLIN**K** (2) 1/2	3464.8859	3464.83
	237-246	GLIN**K**ELLS**K** (1) 1/2	1266.7416	1266.79
	237-258	GLIN**K**ELLS**K**F**KK**GAWLVNT AR (4) 0/4	2486.4605	2487.07
	237-277	GLIN**K**ELLS**K**F**KK**GAWLVNT ARGAICVAEDVAAALESGQL R (0) 0/4	4340.3910	4340.75
	242-249	ELLS**K**F**KK** (2) 3/3	1448.7897	1447.91
	247-258	F**KK**GAWLVNTAR (2) 1/2	1542.8539	1542.92
	247-258	F**KK**GAWLVNTAR (2) 2/2	1694.9125	1695.04
	249-258	**K**GAWLVNTAR (1) 1/1	1267.6906	1267.76
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR (0) 0/0	1872.9483	1872.17
	278-291	GYGGDVWFPQPAP**K** (0) 1/1	1670.7961	1670.90
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1) 1/1	2362.1152	2362.26
	292-301	DHPWRDMRN**K** (2) 1/1	1506.7019	1507.83
	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDA QTR (1) 1/1	2606.2052	2606.16
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 1/2	1956.9701	1956.16
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 2/2	2109.0287	2109.44
	357-363	AYG**K**HD**KK** (2) 2/3	1122.5327	1123.73
	357-364	AYG**K**HD**KK** (2) 3/3	1402.6863	1403.87
FDH-1b	1-12	M**K**IVLVLYDAG**K** (1) 0/2	1349.7861	1349.75
	20-35	LYGCTEN**K**LGIANWL**K** (1) 1/2	1989,0268	1988.97
	77-83	ERLD**K**A**K** (2) 0/2	859.4996	859.41
	84-109	NL**K**LVVVAGVGSDHIDLDYI NQTG**KK** (2) 3/3	3294,7497	3459.47
	137-157	NFVPAHEQIINHDWEVAAIA **K** (0) 0/1	2402,2251	2402.07
	137-165	NFVPAHEQIINHDWEVAAIA **K**DAYDIEG**K** (1) 1/2	3459,6973	3459.59
	166-174	TIATIGAGR (0) 0/0	859,4996	859.41
	183-201	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K** (1) 1/2	2491,3277	2491.17
	183-210	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**E AEE**K**VGAR (3) 0/3	3294,7408	3294.47
	183-206	LLPFNP**K**ELLYYDYQALP**K**E AEE**K** (2) 1/3	3077,5875	3077.46
	190-206	ELLYYDYQALP**K**EAEE**K** (1) 1/2	2268,1076	2267.98
	211-241	RVENIEELVAQADIVTVNAP LHAGT**K**GLIN**K** (2) 1/2	3478,9021	3478.73
	211-236	RVENIEELVAQADIVTVNAP LHAGT**K** (1) 0/1	2787,4999	2787.41
	237-248	GLIN**K**ELLS**K**F**K** (2) 1/3	1555,9212	1555.86
	237-246	GLIN**K**ELLS**K** (1) 1/2	1280,7578	1280.72
	242-248	ELLS**K**F**K** (1) 1/2	1030,5937	1030.56
	249-258	**K**GAWLVNTAR (1) 1/1	1281,7068	1281.69
	250-258	GAWLVNTAR (0) 0/0	987,5370	987.51
	259-277	GAICVAEDVAAALESGQLR (0) 0/0	1872.9483	1872.88
	259-277	GAI**C**VAEDVAAALESGQLR (0) 0/0	1930,9538	1929.88
	278-291	GYGGDVWFPQPAP**K** (1) 1/1	1684,8123	1684.76
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1) 0/1	2210,0566	2209.96
	278-296	GYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR (1) 1/1	2376,1314	2376.00

	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDA QTR (1) 0/1	2454,1466	2454.11
	300-322	N**K**YGAGNAMTPHYSGTTLDA QTR (1) 1/1	2620,2214	2620.09
	323-338	YAEGT**K**NILESFFTG**K** (1) 1/2	1970,9863	1970.91
	329-338	NILESFFTG**K** (0) 1/1	1321,6792	1321.60
	361-364	HD**KK** (1) 2/2	859,4432	859.41

Séquence protéique:
MKIVLVLYDGKHAADEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDKEGETSELDKHIPDADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGSDHIDLDYI
NQTGKKISVLEVTGSNVVSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAE
EKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMRNKY
GAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK
[a] Masse prenant compte de l'adduit acétate
[b] determiné avec peptidemass

Annexe IV : Liste des fragments peptidiques attribués après digestion de la FDH sauvage et de la FDH modifiée par les cations **3**, **1a** et **1b** après digestion avec la chymotrypsine.

K sont les lysines potentiellement modifiables et **C** sont les cystéines acétylées. Le nombre de site de clivage où l'enzyme n'a pas agit est entre parenthèses et le nombre de modification est indiqué par X/Xmax où X est le nombre de résidus lysine modifié et Xmax est le nombre total de lysine du peptide.

		séquence	$[M+H]^+$ attendu[b]	$[M+H]^+$ trouvé[a]
FDH	2-21	**K**IVLVLYDAG**K**HAADEE**K**LY (4)	2275.2332	2275.13
	22-41	G**C**TEN**K**LGIANWL**K**DQGHEL (3)	2284.1026	2285.15
	35-69	**K**DQGHELITTSD**K**EGETSEL D**K**HIPDADIIITTPF (2)	3893.9290	3893.89
	55-73	D**K**HIPDADIIITTPFHPAY (1)	2164.1073	2163.16
	103-134	INQTG**KK**ISVLEVTGSNVVS VAEHVVMTMLVL (4)	3395.8640	3395.34
	132-150	LVLVRNFVPAHEQIINHDW (3)	2300.2298	2299.07
	133-138	VLVRNF (1)	774.4512	774.46
	178-183	RVLERL (1)	785.4992	784.43
	195-218	DYQALP**K**EAEE**K**VGARRVEN IEEL (1)	2786.4318	2787.42
	248-271	**KK**GAWLVNTARGAICVAEDV AAAL (2)	2427.3176	2428.25
	254-284	VNTARGAICVAEDVAAALES GQLRGYGGDVW (3)	3148.5479	3148.90
	277-295	RGYGGDVWFPQPAP**K**DHPW (2)	2210.0566	2209.04
	277-317	RGYGGDVWFPQPAP**K**DHPWR	4632.184	4632.68
	280-295	DMRN**K**YGAGNAMTPHYSGTT L (7)	1833.8707	1834.04
	280-298	GGDVWFPQPAP**K**DHPW (1)	2236.0392	2236.01
	285-295	GGDVWFPQPAP**K**DHPWRDM (2)	1319.6531	1319.72
	303-335	FPQPAP**K**DHPW (0)	3548.6750	3548.39
	318-335	GAGNAMTPHYSGTTLDAQTR YAEGT**K**NILESFF (6)	2090.0189	2090.05
	318-339	DAQTRYAEGT**K**NILESFF (3)	2523.2514	2523.26
	336-348	DAQTRYAEGT**K**NILESFFTG **K**F (4)	1565.8322	1566.82
	340-348	TG**K**FDYRPQDIIL (2)	1132.5997	1131.55
	340-349	DYRPQDIIL (1)	1245.6837	1245.70
	340-353	DYRPQDIILL (2)	1708.8540	1708.96
		DYRPQDIILLNGEY (3)		
FDH-3	2-21	**K**IVLVLYDAG**K**HAADEE**K**LY (4) 0/3	2275.2332	2275.13
	6-20	VLYDAG**K**HAADEE**K**L (2) 2/2	1916,9964	1917.01
	6-21	VLYDAG**K**HAADEE**K**LY (3) 0/2	1821.9017	1821.99
	9-21	DAG**K**HAADEE**K**LY (1) 1/2	1575.7649	1575.77
	9-21	DAG**K**HAADEE**K**LY (1) 2/2	1704,8439	1704.88
	35-69	**K**DQGHELITTSD**K**EGETSEL D**K**HIPDADIIITTPF (2) 1/3	4023.0080	4022.72
	55-73	D**K**HIPDADIIITTPFHPAY (1) 0/1	2164.1073	2163.97
	55-73	D**K**HIPDADIIITTPFHPAY (1) 1/1	2293.1863	2293.08
	80-87	D**K**A**K**NL**K**L (1) 0/3	929.5778	930.48
	114-132	EVTGSNVVSVAEHVVMTML (5) 0/0	2001.9983	2002.88
	178-192	RVLERLLPFNP**K**ELL (4) 1/1	1966,1848	1967.00
	184-191	LPFNP**K**EL (1) 1/1	1086.6194	1086.56
	184-192	LPFNP**K**ELL (2) 1/1	1199.7073	1199.66
	184-196	LPFNP**K**ELLYYDY (5) 1/1	1803,9203	1803.93
	232-238	HAGT**K**GL (0) 1/1	812,4625	812.40
	232-244	HAGT**K**GLIN**K**ELL (2) 1/2	1522,8951	1522.82
	239-244	IN**K**ELL (1) 1/1	858,5295	858.46
	280-295	GGDVWFPQPAP**K**DHPW (1) 0/1	1833.8707	1833.98
	280-295	GGDVWFPQPAP**K**DHPW (1) 1/1	1962.9497	1962.97
	280-308	GGDVWFPQPAP**K**DHPWRDMR N**K**YGAGNAM (4) ½	3427.6211	3427.15
	285-295	FPQPAP**K**DHPW (0) 0/1	1319,6531	1319.60
	285-295	FPQPAP**K**DHPW (0) 1/1	1448.7321	1448.69
	303-323	GAGNAMTPHYSGTTLDAQTR Y (3) 0/0	2212.0087	2211.91
	318-335	DAQTRYAEGT**K**NILESFF (3) 0/1	2090.0189	2089.95

	324-335	AEGT**K**NILESFF (2) 0/1	1355,6841	1355.64
	340-349	DYRPQDIILL (2) 0/0	1245.6837	1245.70
	350-364	NGEYVT**K**AYG**K**HD**KK** (5) 3/4	2125.1288	2125.88
FDH-1a	8-20	YDAG**K**HAADEE**K**L (1) 1/2	1598,7445	1598.82
	22-28	GCTEN**K**L (0) 1/1	916.4193	916.43
	22-41	G**C**TEN**K**LGIANWL**K**DQGHEL (3) 1/2	2436,1612	2437.21
	42-69	ITTSD**K**EGETSELD**K**HIPDA DIIITTPF (1) 1/2	3238,6001	3238.51
	34-69	L**K**DQGHELITTSD**K**EGETSE LD**K**HIPDADIIITTPF (3) 1/3	4159,0717	4159.90
	55-69	D**K**HIPDADIIITTPF (0) 1/1	1847.9538	1848.09
	133-138	VLVRNF (1) 0/0	774.4512	774.46
	184-191	LPFNP**K**EL (1) 1/1	1109.5990	1109.59
	184-192	LPFNP**K**ELL (2) 1/1	1222,683	1222.68
	187-194	NP**K**ELLYY (3) 1/1	1191,6044	1191.60
	219-238	VAQADIVTVNAPLHAGT**K**GL (1) 0/1	1975.0970	1976.17
	232-238	HAGT**K**GL (0) 1/1	835.4421	835.42
	232-244	HAGT**K**GLIN**K**ELL (2) 1/2	1545.8747	1545.93
	232-247	HAGT**K**GLIN**K**ELLS**K**F (3) 0/3	1756.0115	1756.11
	232-247	HAGT**K**GLIN**K**ELLS**K**F (3) 1/3	1908.0701	1908.22
	239-244	IN**K**ELL (1) 1/1	881.5091	881.48
	248-252	**KK**GAW (0) 1/2	741,4042	741.37
	280-295	GGDVWFPQPAP**K**DHPW (1) 1/1	1985.9293	1986.02
	285-295	FPQPAP**K**DHPW (0)	1471.7117	1471.74
	324-339	AEGT**K**NILESFFTG**K**F (3) 1/2	1940.9752	1940.04
	336-353	TG**K**FDYRPQDIILLNGEY (4) 1/1	2294,1451	2293.18
	340-349	DYRPQDIILL (2) 0/0	1245.6837	1245.70
	340-353	DYRPQDIILLNGEY (3) 0/0	1708.8540	1708.96
	354-364	VT**K**AYG**K**HD**KK** (1) 1/4	1426,7801	1425.72
	359-364	G**K**HD**KK** (0) 0/3	712.4100	711.40
	359-364	G**K**HD**KK** (0) 2/3	1016.5272	1016.50
FDH-1b	1-7	M**K**IVLVL (2) 1/1	981,6171	981.73
	1-8	M**K**IVLVLY (3) 1/1	1144,6804	1144.68
	1-20	M**K**IVLVLYDAG**K**HAADEE**K**L (4) 1/3	2409,2851	2409.23
	1-21	M**K**IVLVLYDAG**K**HAADEE**K**LY (5) 1/3	2572,3485	2571.32
	6-20	VLYDAG**K**HAADEE**K**L (2) 2/2	1990,988	1990.14
	6-21	VLYDAG**K**HAADEE**K**LY (3) 1/2	1987,9765	1987.97
	9-33	DAG**K**HAADEE**K**LYGCTEN**K**LGIANW (3) 1/3	2957,3739	2957.34
	21-33	YGCTEN**K**LGIANW (2) 0/1	1468,6889	1468.80
	22-33	GCTEN**K**LGIANW (1) 1/1	1471,7004	1471.73
	22-41	G**C**TEN**K**LGIANWL**K**DQGHEL (3) 1/2	2450,1774	2451.22
	55-73	RGYGGDVWFPQPAP**K**DHPW (2) 0/1	2164,1073	2163.21
	80-87	D**K**A**K**NL**K**L (1) 3/3	1427,8022	1427.86
	86-100	**K**LVVVAGVGSDHIDL (1) 0/1	1521,8635	1521.78
	178-191	RVLERLLPFNP**K**EL (3) 1/1	1890,0965	1890.16
	178-192	RVLERLLPFNP**K**ELL (4) 1/1	2003,1806	2004.11
	178-193	RVLERLLPFNP**K**ELLY (5) 0/1	2000,1691	1999.97
	181-191	ERLLPFNP**K**EL (2) 1/1	1521,8429	1521.78
	181-192	ERLLPFNP**K**ELL (3) 0/1	1468,8522	1468.80
	184-192	LPFNP**K**ELL (2) 1/1	1236,6992	1236.74
	184-194	LPFNP**K**ELLYY (4) 1/1	1562,8259	1563.86
	232-247	HAGT**K**GLIN**K**ELLS**K**F (3) 1/3	1922,0863	1922.06
	244-253	LS**K**F**KK**GAWL (3) 3/3	1675,9335	1675.91
	245-252	S**K**F**KK**GAW (1) 1/3	1117,6158	1117.60
	248-252	**KK**GAW (0) ½	755,4204	755.44
	248-253	**KK**GAWL (1) 1/2	868,5045	868.54
	277-295	RGYGGDVWFPQPAP**K**DHPW (2) 1/1	2376,1314	2376.12
	280-295	GGDVWFPQPAP**K**DHPW (1) 1/1	1999,9455	1999.97
	296-302	RDMRN**K**Y (1) 1/1	1148,5635	1148.58
	303-323	GAGNAMTPHYSGTTLDAQTRY (3) 0/0	2212,0087	2211.99
	318-335	DAQTRYAEGT**K**NILESFF (3) 0/1	2090,0189	2090.06
	324-335	AEGT**K**NILESFF (2) 1/1	1521,7589	1521.78
	324-339	AEGT**K**NILESFFTG**K**F (3) ½	1954,9914	1955.00
	335-339	FTG**K**F (1) 1/1	765,3935	765.41
	342-349	RPQDIILL (1) 0/0	967.5935	967.53
	350-358	NGEYVT**K**AY (1) 0/1	1044,4996	1044.57
	359-364	G**K**HD**KK** (0) 2/3	1044,5596	1044.57

Annexe V : Alignement des séquences nucléotidiques de la FDH sauvage et du mutant 34. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence nucléotidique ClustalW2. Les étoiles en dessous des séquences géniques correspondent à une identité et les tirets à des insertions/délétions.

```
Wt              --ATGAAGAT-TGTCTTAGT---------TCTTTATGATGCTGGTA--AGCACGCTGCTG 46
M_34            AGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTG 60
                  * * **** *  * * *          ** * ** **  *   *  ***   *** **

Wt              ATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAG 106
M_34            CCGCGCGGCAGCCATATGGCTA-----------------GCATGACTGGT-GGACAGCAA 102
                  *      *   ****** *                  * **  *   * **  *  *

Wt              ATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATA 166
M_34            AT--GGGTCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA-----------CAAGC---TTG--CG 144
                **   ****  ** *  * * * *  ** *   *           *****   ***

Wt              AACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTA 226
M_34            GCCGCACTCGAG-------CACCACCACCACCACCACTGAG-ATCCGGCT------GCTA 190
                  *  *  * **        *  * ** ******  **    **** ***       ***

Wt              AGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTG 286
M_34            AC--AAAGCCCGA-AAGG----AAGCT--GAGTTGGCTGCTGCCACCGCTG--AGCAATA 239
                *   **  *  ** ****     * **   * ** *  * ** * * * **   *   *

Wt              ATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGT---AAGAAAATCTCAGTCCTGGAAG 343
M_34            ACTAGCATAACCCC--TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG--CTGAAAG 295
                *  *   * *      **         **** ***    **    * *  *  *** ***

Wt              TTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAA-------CACGTTGTCATGAC-CAT--- 392
M_34            G---AGGAACTA----TATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAA 348
                    ***  ***    * **    ***  ***       * *  ***   * * ***

Wt              GCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCA-CGATTGGG 451
M_34            GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGC-AGC--GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAG 405
                **  * *  *  * *   ** **  * ***   *** *     * *  *** **     *

Wt              AGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTG 511
M_34            CGCCCGCTCCTTTCGCT-----TTCTTCCCTTCCT----------TTCTCGCCAC-GTT- 448
                 *   *** ** *****     * *** *  *              * **** **  **

Wt              GTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAA---TCCAAAAG 568
M_34            -CGCCGGCT---TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC-TTTAGGGTTCC----G 499
                  ** **     **        **   *  *  *    ***** ****    ***    *

Wt              AATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTA 628
M_34            ATTTAGTGCTTTACGGC-----ACCTCGACCCCAAAAAACTT--GATTAGGGTGATG--- 549
                * *** *    ****       * **  ***  ** ** **   **  * * ** **

Wt              GAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATGCTC 688
```

```
M_34            -----GTTCACG----TAGTGGGCCA-TCGCCC----TGATAG----ACGGTTTTCGCC 591
                     *** *      *   *    * * ** *    *****     ** ***  *   *

Wt              CATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTAT-CTAAATTTAAAAAA 747
M_34            CTTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT--TTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAA 649
                * **  ***  **     * * * *  ******  * * * ** * * *** *  ** **

Wt              GGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGCAGCA 807
M_34            --CACTCAACCC-----TATCTCGGTCTATTCT-TTTGATTTATAAGGGATTTTGC--CC 699
                    **           ** * *      * ** ****  **      *** ****  *

Wt              GCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCT 867
M_34            GATTTCGG--CCTATTGGTTAAAAAATGA----GCTGAT--TTAA--------------- 736
                * *** *   *   *   **** *  * *    * ****  **

Wt              CCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAATAAATATGGTGCTGGTAATGCCATGACT 927
M_34            -CAAAAATTTAAC----GCGAAATTTAACAA---AATAT--------TAA----ACG--- 773
                 ****   * * *    * ** ** * * **   *****        ***    * *

Wt              CCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAAACAAG-ATACGCTGAAGGTACTAAAAA 986
M_34            -CTTACAATTTAGGTGGCACTTT------TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCCTAT--T 824
                 ** ** * *  ***   *****      **    **   * *** ***    ***

Wt              TATTTTGGAATCATTCT---TTACCGGTAAATTTGATTACAGACCACAAGATATTATCTT 1043
M_34            TGTTTT---ATTTTTCTAAATTACATTCAAATATGTATCC-GCTCATGAATTAAT-TCTT 879
                * ****   **  ****   ****    **** **  * * *  **  *  ** * ****

Wt              ATTAAA---TGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAG 1095
M_34            AGAAAAACTCATCGAGCAT-CAAATGAAACTGGC----AATTTAATTCATAAT-- 927
                *  ***       **  *    * * ** **  *    **    **    ***
```

Annexe VI : Alignement des séquences géniques issues du séquençage du mutant 60 par les amorces T7Pro et T7ter avec la séquence de la FDH. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence nucléotidique ClustalW2. Les étoiles en dessous correspondent à un alignement strict et les mutations sont colorées en rouge. Les pb sont numérotées selon la séquence du gène de la FDH de *Candida boidinii*; entrée EMBL : AJ245934. Les insertions/délétions ne sont pas considérées car elles se situent en bordure de la séquence dans des régions non résolues du chromatogramme. Les mutations sont colorées en rouge.

```
FDH             ------------------------------------------------------------
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCA 60

FDH             ------------------------------------------------------------
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        TCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACA 120

FDH             -----------------------------------ATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATG 25
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        GCAAATGGGTCGGGATCCATAAAAGGAGATATACCATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATG 180

FDH             ATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAG 85
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        ATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAG 240

FDH             GTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAG 145
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        GTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAG 300

FDH             GTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTT 205
60_T7term       ------------------------------------------------------------
```

```
60_T7Pro        GTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTT 360

FDH             TCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCG 265
60_T7term       ------------------------------------------------------------
60_T7Pro        TCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCG 420

FDH             TTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGA 325
60_T7term       -------------TGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGA 47
60_T7Pro        TTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGA 480
                             **********************************************

FDH             AAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCA 385
60_T7term       AAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCA 107
60_T7Pro        AAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCA 540
                ************************************************************

FDH             TGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACG 445
60_T7term       TGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACG 167
60_T7Pro        TGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACG 600
                ************************************************************

FDH             ATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTA 505
60_T7term       ATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTA 227
60_T7Pro        ATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTA 660
                ************************************************************

FDH             CCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCCAA 565
60_T7term       CCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAGTCCAA 287
60_T7Pro        CCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAGTCCAA 720
                ***************************************************** *****

FDH             AAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTG 625
60_T7term       AAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTG 347
60_T7Pro        AAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTG 780
                ************************************************************

FDH             CTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATG 685
60_T7term       CTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATG 407
60_T7Pro        CTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATG 840
                ************************************************************

FDH             CTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAA-TTTAAA 744
60_T7term       CTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAA-TTTAAA 466
60_T7Pro        CTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAAATTTAAA 900
                ***************************************************** ******

FDH             AAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTG-TGTTGCTGAAGATGTTGC 803
60_T7term       AAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTG-TGTTGCTGAAGATGTTGC 525
60_T7Pro        AAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGGTGTTGCT----------- 949
                **************************************** *******

FDH             AGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACC 863
60_T7term       AGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACC 585
60_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             AGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAATAAATATGGTGCTGGTAATGCCAT 923
60_T7term       AGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAATAAATATGGTGCTGGTAATGCCAT 645
60_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             GACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAAACAAGATACGCTGAAGGTACTAA 983
60_T7term       GACTCCCCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAATCAAGATACGCTGAAGGTACTAA 705
60_T7Pro        ------------------------------------------------------------
```

```
FDH             AAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGATTACAGACCACAAGATATTATCTT 1043
60_T7term       AAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGATTACAGACCACAAGATATTATCTT 765
60_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             ATTAAATGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAG-------- 1095
60_T7term       ATTAAATGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAGCTCGAGCA 825
60_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             --------------------------------------------
60_T7term       CCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA 870
60_T7Pro        --------------------------------------------
```

Annexe VII : Alignement des séquences géniques issues du séquençage du mutant 66 par les amorces T7Pro et T7ter avec la séquence de la FDH. Les alignements des séquences obtenues en présence des amorces T7Pro et T7ter sont présentés séparément. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme d'alignement de séquence nucléotidique ClustalW2. Les étoiles en dessous correspondent à un alignement strict et les mutations considérées sont colorées en rouge. Les pb sont numérotées selon la séquence du gène de la FDH de *Candida boidinii*; entrée EMBL : AJ245934. Les insertions/délétions ainsi que les mutations non résolues sur le chromatogramme ne sont pas considérées.

<u>Séquençage en présence de l'amorce T7 Pro</u>

```
FDH             ------------------------------------------------------------
66_T7Pro        AGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTG 60

FDH             ------------------------------------------------------------
66_T7Pro        CCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCATAA 120

FDH             --------------ATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGA 47
66_T7Pro        AAGGAGATATACCATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGA 180
                             **********************************************
```

```
FDH             TGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGA 107
66_T7Pro        TGAAGAAAAATTATATGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGA 240
                ************************************************************

FDH             TCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATAA 167
66_T7Pro        TCAAGGTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATAA 300
                ************************************************************

FDH             ACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAA 227
66_T7Pro        ACATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAA 360
                ************************************************************

FDH             GGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGA 287
66_T7Pro        GGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGA 420
                ************************************************************

FDH             TCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTAC 347
66_T7Pro        TCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTAC 480
                ************************************************************

FDH             AGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAG 407
66_T7Pro        AGGTTCTAATGTTGCCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAG 540
                ************** *********************************************

FDH             AAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGC 467
66_T7Pro        AAATTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTTGCTGCTATTGC 600
                ******************************************************** **

FDH             TAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGGTAGAATTGG 527
66_T7Pro        TAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGGTAGAATTGG 660
                ************************************************************

FDH             TTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTA 587
66_T7Pro        TTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTA 720
                ************************************************************

FDH             TCAAGCTTTACCAAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGA 647
66_T7Pro        TCAAGCTTTACCAA------------------------------GAG------------- 737
                **************                              ***

FDH             AGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAA 707
66_T7Pro        --------------AAGC------------------------------------------ 741
                              ****

FDH             AGGTTTAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAAAAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATAC 767
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             CGCAAGAGGTGCTATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATT 827
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             AAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCCAAAGGATCACCCATGGAG 887
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             AGATATGAGAAATAAATATGGTGCTGGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTAC 947
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             TTTAGACGCTCAAACAAGATACGCTGAAGGTACTAAAAATATTTTGGAATCATTCTTTAC 1007
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------

FDH             CGGTAAATTTGATTACAGACCACAAGATATTATCTTATTAAATGGGGAATACGTTACTAA 1067
66_T7Pro        ------------------------------------------------------------
```

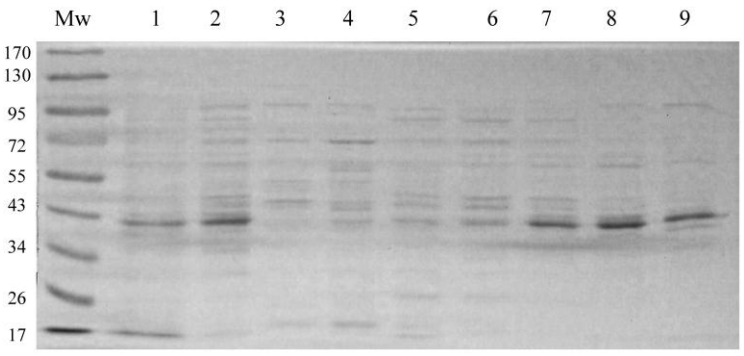
```
FDH             AGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAG 1095
66_T7Pro        ----------------------------
```

Séquençage en présence de l'amorce T7 ter

```
FDH             ATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAATTA 60
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             TATGGTTGTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGTCATGAA 120
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             CTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGCGAATTGGATAAACATATCCCAGAT 180
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             GCTGATATTATCATCACCACTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGACTTGAC 240
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             AAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTTGGTTCTGATCACATTGATTTA 300
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             GATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCCTGGAAGTTACAGGTTCTAATGTT 360
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             GTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTCGTTCCA 420
66_T7ter        ------------------------------------------------------------

FDH             GCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTAC 480
66_T7ter        ----A--AACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTTGCTGCTATTGCTAAGGATGCTTAC 54
                    *  ************************************ ***************

FDH             GATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTG 540
66_T7ter        GATATCGAAGGTAAAACTATCGCTACCATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTG 114
                ************************************************************

FDH             GAAAGATTACTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCA 600
66_T7ter        GAAAGATTACTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCA 174
                ************************************************************

FDH             AAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCT 660
66_T7ter        AGAGAAGCAGAAGAAAAGGTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCT 234
                * ****** ******** ******************************************

FDH             CAAGCTGATATCGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAAT 720
66_T7ter        CAAGCTGATATCGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAATTAAT 294
                ************************************************************

FDH             AAGGAATTATTATCTAAATTTAAAAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCT 780
66_T7ter        AAGGAATTATTATCTAAATTTAAAAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCT 354
                ************************************************************

FDH             ATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGT 840
66_T7ter        ATTTGTGTTGCTGAAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGT 414
                ************************************************************

FDH             GGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAAT 900
66_T7ter        GGTGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAAT 474
                ************************************************************

FDH             AAATATGGTGCTGGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAA 960
66_T7ter        AATTATGGTGCTGGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGACGCTCAA 534
```

```
                ** ******************************************************

FDH             ACAAGATACGCTGAAGGTACTAAAAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGAT 1020
66_T7ter        ACAAGATACGCTGAAGGTACTAAAAATATTTTGGAATCATTCTTTACCGGTAAATTTGAT 594
                ********************************************************

FDH             TACAGACCACAAGATATTATCTTATTAAATGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAA 1080
66_T7ter        TACAGACCACAAGATATTATCTTATTAAATGGGGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAA 654
                ********************************************************

FDH             CACGATAAGAAATAG-------------------------------------------- 1095
66_T7ter        CACGATAAGAAATAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAA 714
                ***************

FDH             ------------
66_T7ter        GCCCGAAAGAAA 726
```

Annexe VIII : Contrôle de la purification de la FDH sur hydroxyapatite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).



Pistes:

MW : marqueur de poids moléculaire en kDa
1 : extrait cellulaire brut
2 : ATPS
3 : 5 mM KH_2PO_4
4 : 10 mM KH_2PO_4
5 : 20 mM KH_2PO_4
6 : 30 mM KH_2PO_4
7 : 40 mM KH_2PO_4
8 : 50 mM KH_2PO_4
9 : 60 mM KH_2PO_4

Annexe IX : Publications

Mourad Bekhouche, Loïc J. Blum and Bastien Doumèche. Enzyme structure in ionic liquids studied by fluorescence spectroscopy : How to proceed. Soumise à "*The Journal of Physical Chemistry B"*

Mourad Bekhouche, Loïc J. Blum and Bastien Doumèche. Ionic liquid-inspired cations covalently bound to FDH improve its stability and activity in IL. *ChemCatChem* 2011 ; **3** (5) : p. 875-882.

Mourad Bekhouche, Bastien Doumèche and Loïc J. Blum. Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me_2PO_4]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010 ; **65** (1-4) : p. 73-78.

Modifications chimiques et évolution dirigée de la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* : vers une compréhension de la relation structure/fonction d'une déshydrogénase en liquide ionique.

Les déshydrogénases sont faiblement actives en présence de fortes concentrations (> 50 % (v/v)) de liquides ioniques (LIs) miscible à l'eau et les raisons précises de cette inactivation ne sont pas connues. La structure de la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* (FDH) en présence de ces LIs miscibles à l'eau a été étudiée par atténuation de fluorescence par de l'iode ou de l'acrylamide. Une concentration critique, la CILc ("Critical Ionic Liquid concentration"), au dessus de laquelle la fluorescence n'est pas exploitable, est déterminée. Elle se situe entre 30 et 40 % (v/v) des LIs de cette étude. Les LIs s'avèrent être de forts agents dénaturants : les constantes d'atténuation de fluorescence en présence de LI sont de 1,4 à 2 fois plus importantes qu'en présence d'urée. La FDH a été modifiée chimiquement par des cations analogues aux cations des LIs afin de la préserver de l'interaction avec les LIs. Les enzymes modifiées par des cations de plus petite taille présentent une importante activité résiduelle (30-45%) en présence de 70% (v/v) de LI tandis que l'enzyme sauvage est inactive. En présence de 30% (v/v) de LI, l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) des enzymes modifiées augmente de 1,3 à 3,6 fois et la constante de Michaelis (K_M) diminue de 1,7 à 4,6 fois suivant le cation utilisé. Selon la taille du cation greffé, le temps de demi-vie des enzymes modifiées augmente de 3 à 5 fois en solution tamponnée. Enfin, la structure des enzymes modifiées est préservée en présence de 40% (v/v) de LI tandis que l'enzyme native commence à se dénaturer. La technique d'évolution dirigée a également été utilisée. A ce jour, 987 mutants ont été criblés. Un mutant (M60) présente une activité résiduelle de 35% à 70% (v/v) de LI tandis que l'enzyme sauvage est inactive. Ce dernier porte deux mutations, N187S et T321S, situées à la surface de la structure protéique. En présence de 30 % (v/v) de LI, le mutant 60 fixe les substrats avec des valeurs de de K_M^{NAD} et de K_D^{N3} (N_3 est l'azide, un inhibiteur compétitif du formiate) 2 fois plus faibles que celles de l'enzyme sauvage.

Chemical modifications and directed evolution of the formate dehydrogenase of *Candida boidinii* : toward the understanding of the link structure/function of a dehydrogenase in ionic liquids.

The dehydrogenases are weakly active in the presence of high concentration (> 50% (v/v)) of water-miscible ionic liquids (ILs) and the mechanism of enzyme inactivation in ILs is not fully understood. The structure of the formate dehydrogenase *Candida boidinii* (FDH) in ILs has been studied by quenching of fluorescence experiments in the presence of iodide or acrylamide. A critical concentration, the CILc ("Critical Ionic liquid concentration"), is defined as the concentration of IL above which the fluorescence is not relevant. In this work, the CILc is comprised between 30 and 40 % (v/v) of the ILs. The ILs have revealed to be denaturing agents which increase the quenching of fluorescence efficiency by 1.4 to 2 times more than in urea. The FDH is chemically modified by analogous cations found in ILs in order to preserve the biocatalyst from the direct interaction with ILs. The enzymes modified by the smaller cations shown 30 45% residual activity at 70% (v/v) of ILs while the native enzyme is fully inactive. In the presence of 30% (v/v) of ILs, the kinetic efficiency (k_{cat}/K_M) of the grafted enzymes is improved by a 1.3-3.6 fold factor and the constant of Michaelis (K_M) is reduced by a 1.7-4.6 fold factor depending on the grafted cations. In aqueous solution, the half-lives of modified enzymes are 3 to 5 fold higher than the native FDH depending on the size of the cation grafted. Finally, the structure of the grafted enzymes is somehow maintained in the presence of 40% (v/v) of ILs while the native FDH begins to unfold. We also used directed evolution to improve the FDH activity in the presence of ILs. At this stage, 987 mutants have been screened and one mutant (M60) shows 35% of residual activity at 70% (v/v) of ILs. In the presence of 30% (v/v) of ILs, the mutant binds the substrates in a greater extent than the native FDH, the values of K_M^{NAD} and the K_D^{N3} (N3 is the azide, a competitive inhibitor of formate) are reduced by a 2 fold factor by comparison to the native enzyme.

Biochimie

Liquides ioniques, formiate déshydrogénase, spectroscopie de fluorescence, génie enzymatique, évolution dirigée

---

Laboratoire de Génie Enzymatique Membrane Biomimétique et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS). UMR-CNRS 5246