



HAL
open science

Bases moléculaires de l'adaptation piézophile: études structurales et biochimiques d'enzymes clés du métabolisme provenant d'archées et de bactéries isolées dans les fonds marins

Louise Lassalle

► To cite this version:

Louise Lassalle. Bases moléculaires de l'adaptation piézophile: études structurales et biochimiques d'enzymes clés du métabolisme provenant d'archées et de bactéries isolées dans les fonds marins. Bactériologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY085 . tel-01344039

HAL Id: tel-01344039

<https://theses.hal.science/tel-01344039>

Submitted on 11 Jul 2016

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Louise LASSALLE

Thèse dirigée par **Eric GIRARD** et **Bruno FRANZETTI**

préparée au sein du **Institut de Biologie Structurale**
Groupe Extrêmophiles et Grands Assemblages Moléculaires
dans l'**École Doctorale de Physique**

Bases moléculaires de l'adaptation piézophile : études structurales et biochimiques d'enzymes clés du métabolisme provenant d'archées et de bactéries isolées dans les fonds marins

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2014**,
devant le jury composé de :

Mme. Mirjam CZJZEK

Directrice de Recherche, CNRS de Roscoff, Rapportrice

Mme. Magali REMAUD-SIMEON

Professeur, INSA de Toulouse, Rapportrice

M. Mohamed JEBBAR

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Membre

M. Florian NACHON

Directeur de recherche, IRBA de Grenoble, Membre

M. Stéphane MARCHAL

Chargé de recherche, INSERM de Montpellier, Membre



Glossaire

APS Persulfate d'ammonium

DL Dimmerisation Loop ou boucle de dimm risation

DLS Dynamic Light Scattering ou Diffusion dynamique de la lumière

DMSO Diméthylsulfoxyde

DO Densité Optique

ESRF European Synchrotron Radiation Facility ou Installation européenne de rayonnement synchrotron

GRHPR Glyoxylate Reductase Hydroxypyruvate Reductase

HCl Acide Chloridrique

HEPES Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPMX High-Pressure Macromolecular Crystallography ou biocristallographie sous haute pression

HPR Hydroxypyruvate Reductase

IPTG Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside

LLG log-likelihood gain

MAD Multiple-wavelength Anomalous Diffraction

MDH Malate Déshydrogénase

MgCl₂ Chlorure de Magnésium

MPD 2- Methyl-2,4-pentanediol

MR Moleculare Replacement ou remplacement moléculaire

NaCl Chlorure de Sodium

NAD Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADP Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NBD NADH Binding Domain ou domaine de fixation du NADH

PEG Polyéthylène Glycol

RMSD déviation de la racine de la moyenne des carrés

SAD Single-wavelength Anomalous Diffraction

SAXS Small-angle X-ray scattering ou Diffusion des rayons X aux petits angles

SBD Substrate Binding Domain ou domaine de fixation du substrat

SDS Dodécylsulfate de sodium

SIRAS Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering

SOLEIL Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE

TRIS 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

TZF translation function Z-score

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Eric Girard et Bruno Franzetti qui m'ont accompagné durant ces trois années de thèse. Vous m'avez encadré et aidé durant ces trois ans de thèse. J'ai particulièrement apprécié que vous m'ayez considéré dès le début comme une chercheuse à part entière tout en étant là à chaque fois que j'en avais besoin. Eric, je garde de très bon souvenir de nos expéditions synchrotron. Grâce toi, le monde de la cristallographie m'a ouvert ses portes.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui ont pris le temps de lire et de discuter de mes travaux de thèse. Je souhaite remercier plus particulièrement mes rapportrices les Docteurs Mirjam Czjzek et Magali Remaud-Siméon.

Je souhaiterais ensuite remercier ceux qui m'ont fait connaître le monde synchrotron. Merci à Mohamed Mezouar pour les apéros sur la ligne, son soutien, et la très bonne qualité de la ligne ID27. Merci à Pierre Fertey de nous avoir accueilli sur la ligne CRISTAL et de nous avoir souvent dépanner le weekend end. Enfin, un peu de SAXS pour changer, merci à Javier Perez pour avoir cru à la haute pression en solution pour nos chères mallates. Cette pompe motorisée est vraiment une merveille !

Je souhaite remercier toutes les personnes présentes à l'IBS qui ont permis de conduire à bien cette thèse. Merci aux secrétaires, plus particulièrement Dominique Ribeiro, pour avoir géré en urgence toutes mes demandes de mission, remboursement ect... Merci à Sylvie pour sa bonne humeur et coup de gueule, à Aurianne pour m'avoir fait découvrir la qualité, et à toute l'équipe de direction.

Je souhaite remercier l'équipe ELMA pour son accueil chaleureux, plus particulièrement Dominique Madern pour m'avoir enseigné la biochimie des malades. Mylène pour m'avoir enseigné les bonnes pratiques de laboratoires (la blouse !!!), merci pour ta bonne humeur et tes coups de gueule et Alex pour m'avoir initié aux mystères des akta... Je remercie également Pierre pour m'avoir initié au métabolisme des archées et Franck pour les explications de SAXS et les superbes sorties de groupe en raquette. Je remercie également tous les postdoc et thésards ELMA, Matteo, Ziad, Henri, Hind, pour la bonne ambiance au labo.

Un remerciement tout spécial à Sylvain Engilberge qui a effectué son stage de master I et II sur mon sujet. Je n'aurais pas pu finir ma thèse sans ton aide (quoique tu en dises). Ta

bonne humeur mais aussi ton enthousiasme et tes bonnes idées ont été d'une aide précieuse durant tout ce temps, particulièrement durant les mois de rédaction.

Alex... que dire... Merci pour avoir répondu à mes nombreuses questions, aux soirées, à ta bonne humeur quotidienne. Michel, que dire... Merci pour tes conseils biochimiques, culinaires et pédestres !

Je souhaite remercier les thésards de l'IBS spécialement ceux de la TEAM PORQUEROLLES devenu le groupe H2. Ces années en votre compagnie ont été géniales. Je ne sais pas par où commencer. Merci à Jules pour les moments à rédiger ensemble et à sa bonne humeur quotidienne, merci à Gianluca pour le café du matin, j'en profite pour te dédier toutes les images pymol de ma thèse, merci à Didier pour m'avoir ouvert les yeux sur la pâleur de la vie sexuel d'un hétéro ;) merci à Yann dit « Fichou » pour la french attitude, merci à Hicham pour ses déhanchements et ses péripéties toujours renouvelés, merci à Mathieu pour ces longues pauses en commun et ton humour unique, enfin à la meilleure, Wiwi, ma colocatrice trop vite perdue, merci d'avoir été là aux moments difficiles et aux bons, tes supers idées de déguisement.

Je souhaite remercier tous ceux que j'ai connus par la suite, à travers des amis ou à l'IBS. Merci Vanessa pour m'avoir enseigné la class attitude, le rapport fragile entre longueur de la jupe, épaisseur des collants et hauteur des talons. Grâce à toi je suis presque une « vraie » fille. Merci à Marie et Pierre pour les soirées et les après midi jeux. Merci à Coraline, pour ces soirées pleines de folies.

Je voudrais remercier mes copiiiiines qui me suivent depuis tant d'année. Merci à Alice, tant d'énergie en une seule personne c'est pas possible, à Charlotte, superbes discussions thé et chocolat, et à Marie, une thèse ne suffirait pas pour expliquer tout ce que je te dois. Sans vous j'aurais abandonné depuis longtemps mais grâce à vous je suis debout avec tous mes vices !

Je souhaiterais remercier ma famille pour m'avoir épauler bien avant le début de cette thèse, et m'avoir permis de découvrir le monde. Aux Staumont, pour leur soutiens inébranlables et les Noël joyeux, merci à ma tante Catherine pour son parrainage dans le monde de la recherche. Merci à Jef, Catherine et Nico pour les week end au cube, les gaufres, la piscine, la pétanque, minecraft, et j'en passe. Merci à Octavie, merci à Pablo pour ces parenthèses Toulousaines et discussions acharnées. Merci à Virginie, ma maman, pour les virées shopping, les longues discussions, les escapades à Perpignan.

Last but not least, merci à Yann pour avoir été là tout au long de ma thèse. Tu as été un soutien indéfectible pour ces longs mois de rédaction. Merci pour ton calme imperturbable, pour ton humour de dingue, tes discussions passionnées et d'autres choses que rigoureusement ma mère m'a défendu de nommer ici.

1. INTRODUCTION	9
1.1. La vie dans les fonds marins	11
1.1.1. Les sources hydrothermales profondes	12
1.1.2. Les extrémophiles	14
1.2. Effet de la pression sur les micro-organismes piézosensibles	18
1.3. Effets de la pression sur les micro-organismes piézophiles	20
1.3.1. Diversité des micro-organismes piézophiles	20
1.3.2. Réponse des micro-organismes piézophiles à la pression	22
1.4. Effet de la pression sur les macromolécules biologiques	24
1.4.1. Considérations générales	24
1.4.2. Les lipides membranaires	25
1.4.3. Les acides nucléiques	25
1.4.4. Les protéines	26
1.4.4.1. Volume des protéines	26
1.4.4.2. Le paysage conformationnel	28
1.4.4.3. Stabilité des protéines	29
1.4.4.4. L'activité spécifique	34
1.4.5. Comportement des protéines issues d'organismes piézophiles	35
1.5. Choix des enzymes modèles pour étudier l'adaptation à la pression	38
1.6. Objectifs du travail de recherche	40
2. Matériels et méthodes	42
2.1. Production des protéines	44
2.1.1. Expression des protéines	44
2.1.2. Purification	44
2.2. Théorie de l'enzymologie	47
2.2.1. Théorie enzymologie	47
2.2.2. Conditions expérimentales	49
2.3. Détermination des structures de protéines par cristallographie des rayons X	51
2.3.1. Obtention d'un cristal de protéine	51
2.3.2. Diffraction des rayons X par un cristal	52
2.3.3. Traitement des données de diffraction	54
2.3.4. Analyse des structures	59

3. Méthodologie et développement des instruments sous haute pression hydrostatique	62
3.1. Introduction	64
3.2. Spectrophotomètre couplé à une cellule haute pression	65
3.2.1. Instrumentation	65
3.2.2. Conditions expérimentales	66
3.2.3. Contrôle de la température	67
3.2.4. Effets des paramètres physicochimiques	68
3.3. Cristallographie des rayons X sous hautes pressions hydrostatiques	70
3.3.1. L'instrumentation : la cellule à enclumes diamant (CED)	70
3.3.2. Conditions expérimentales	72
3.3.3. Lignes de lumière adaptées à la cristallographie sous haute pression	74
3.3.4. Déroulement d'un enregistrement en HPMX	74
4. Etude structurale et fonctionnelle à pression ambiante des glyoxylate hydroxypyruvate réductases : rôle dans le métabolisme et mode d'action.	77
4.1. Introduction	79
4.2. Détermination des paramètres cinétiques et de la spécificité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de <i>Thermococcales</i>	82
4.3. Détermination de la structure cristalline des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de <i>P. furiosus</i> et <i>P. yayanosii</i> .	91
4.3.1. Cristallogenèse des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases	91
4.3.2. Enregistrement et traitement des données de diffraction des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases	93
4.3.3. Détermination et affinement de la structure de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductase de <i>P. furiosus</i>	95
4.3.4. Détermination et affinement de la structure de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductase de <i>P. yayanosii</i>	97
4.4. Analyse des structures	100
4.4.1. Description du repliement des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases	100
4.4.2. Thermostabilité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductase des espèces de <i>Pyrococcus</i>	102
4.4.3. Analyse du mécanisme d'action des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases	104
4.5. La place des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases dans le métabolisme des <i>Thermococcales</i>	112

4.6. Discussion	114
5. Etude comparative des effets de pression sur les glyoxylate hydroxypyruvate réductases provenant de archées isolées à diverses profondeurs	118
5.1. Introduction.....	120
5.2. Effets de la pression sur l'activité spécifique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases.....	122
5.2.1. Effet du choix du cofacteur sur l'activité spécifique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases en conditions de hautes pressions	123
5.2.2. Comportement particulier de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de <i>P. horikoshii</i>	124
5.2.3. Comparaison du comportement vis-à-vis de la pression entre enzymes issues d'organismes de surfaces et abyssaux	125
5.2.4. Effet des basses températures sur l'activité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases sous hautes pression	129
5.3. Détermination de la structure cristalline sous hautes pressions hydrostatique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de <i>P. furiosus</i> et <i>P. yayanosii</i>	131
5.3.1. Enregistrement et traitement des données de diffraction obtenues en cellule à enclumes diamant	131
5.3.2. Détermination et affinement des structures obtenues en cellule à enclumes diamant	133
5.4. Analyse structurale.....	138
5.4.1. Mouvement de domaine dans la structure de PyaGRHPR.....	141
5.4.2. Structure du site actif.....	143
5.4.3. Fixation du cofacteur.....	144
5.4.3.1. Accessibilité du site actif.....	145
5.5. Discussion	147
6. Etude comparative des effets de la pression sur les malate déshydrogénases provenant de bactéries isolées à diverses profondeurs	149
6.1. Introduction.....	152
6.2. Analyse de la composition en acides aminés des malate déshydrogénases	156
6.3. Effets de la pression sur l'activité spécifique des différentes malate déshydrogénases	158
6.3.1. Caractérisation des malate déshydrogénases à pression ambiante	158

6.3.2. Caractérisation de l'activité spécifique des MDH à haute pression.....	160
6.3.2.1. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	161
6.3.2.2. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	166
6.3.2.3. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	170
6.3.2.4. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	172
6.3.2.5. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter marianensis</i>	174
6.3.2.6. Caractérisation de la malate déshydrogénase de <i>Geobacillus kaustophilus</i>	177
6.3.3. Analyse du comportement spécifique des malate déshydrogénases face à la pression	180
6.4. Détermination des structures cristallographiques des différentes malate déshydrogénases.....	185
6.4.1. Obtention des cristaux – conditions de cryo-conservation.....	185
6.4.1.1. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	186
6.4.1.2. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	187
6.4.1.3. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	188
6.4.1.4. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	189
6.4.1.5. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter marianensis</i>	190
6.4.1.6. Cristallisation de la malate déshydrogénase de <i>Geobacillus kaustophilus</i>	191
6.4.2. Détermination des structures par cristallographie conventionnelle à 100 K.....	191
6.4.2.1. Structure de la malate déshydrogénase de <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	191
6.4.2.2. Acquisition et traitement des données de diffraction	192
6.4.2.2.1. Intégration des données de la malate déshydrogénase de <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	192
6.4.2.2.2. Intégration des données de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	193
6.4.2.2.3. Intégration des données de la malate déshydrogénase de <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	194

6.4.2.2.4. Intégration des données de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter marianensis</i>	195
6.4.2.2.5. Intégration des données de la malate déshydrogénase de <i>Geobacillus kaustophilus</i>	196
6.4.2.3. Détermination des structures et affinement des modèles obtenus	197
6.4.2.3.1. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	197
6.4.2.3.2. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	198
6.4.2.3.3. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	202
6.4.2.3.4. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de <i>Thermaerobacter marianensis</i>	204
6.4.3. Détermination des structures par cristallographie sous hautes pressions hydrostatique	205
6.4.3.1. Acquisition et traitement des données de diffraction de la malate déshydrogénase de <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	205
6.4.3.2. Affinement de la structure de CauMDH	208
6.5. Une approche moléculaire des effets de la pression	210
6.5.1. Description du repliement des malate déshydrogénases	210
6.5.2.	212
6.5.3. Analyse des effets moléculaires de la pression	213
6.6. Discussion	225
7. Discussion générale	229
8. Conclusions et perspectives	235
9. Bibliographie	239
1. Annexe	249
9.1. Annexe chapitre 4 : Alignement des séquences de glyoxylate-hydroxypyruvate réductases	251
9.2. Annexe chapitre 5 : Courbes d'activités spécifiques des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases en fonction de la pression	255
9.3. Annexe chapitre 6 : Alignement des séquences des malate déshydrogénases	260
9.4.	261
9.4. Annexe chapitre 6 : Arbre phylogénétique des MDH tétramériques présentes chez les <i>Firmicutes</i>	262

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. La vie dans les fonds marins

La biosphère dite profonde correspond aux êtres vivants présents en deçà de 1000 m de profondeur (Figure 1.1). Elle constitue 60 % de la biosphère totale (Jannasch & Taylor, 1984). A ces profondeurs, les écosystèmes sont nécessairement indépendants de la photosynthèse et tirent leur source d'énergie des autres micro-organismes chimiosynthétiques et de la dégradation de la matière organique provenant de la surface.

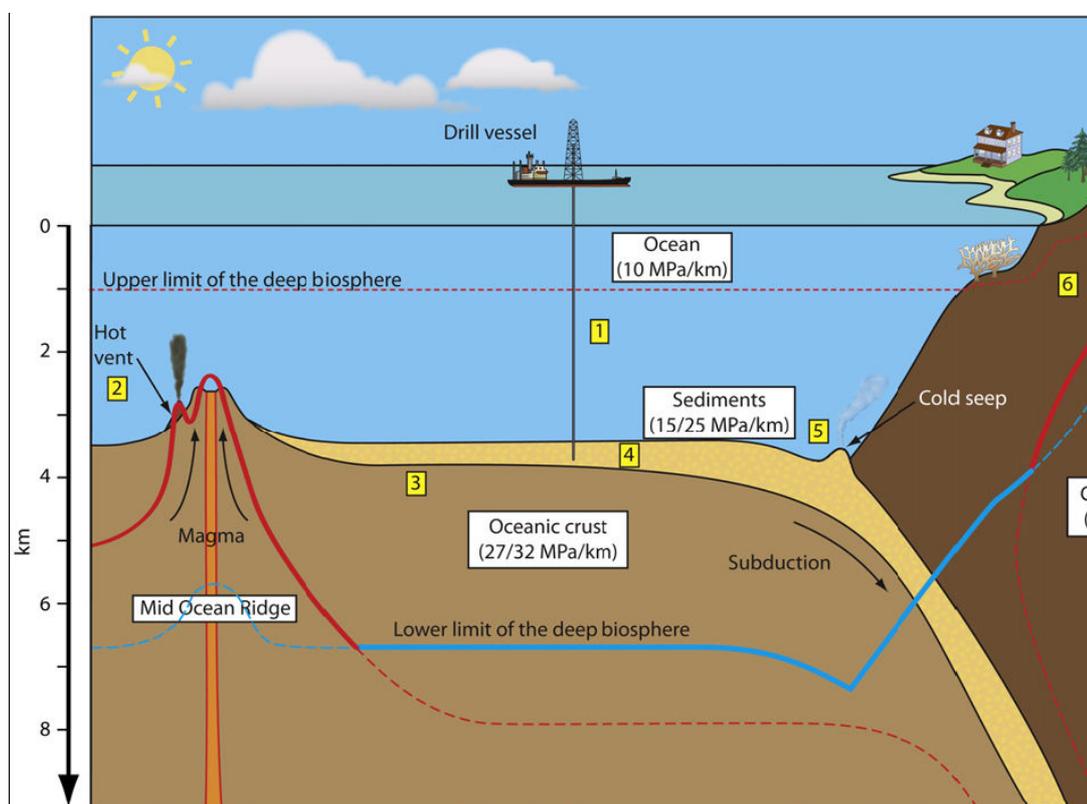


Figure 1.1. Schéma de la coupe transversale de la Terre. D'après (Oger & Jebbar, 2010).

Les trois domaines du vivant sont toutefois représentés dans cette biosphère profonde, avec une prédominance des procaryotes: bactéries et archées. Cependant, des organismes eucaryotes peuplent également les abysses. Ainsi les sources hydrothermales et la chimiosynthèse associée sont à la base d'écosystèmes qui

comprennent toute la taxonomie des eucaryotes: des nématodes aux crustacés ainsi que plusieurs espèces de poissons (Jamieson, Fujii, Mayor, Solan, & Priede, 2010).

1.1.1. Les sources hydrothermales profondes

Les sources hydrothermales ont été découvertes dans les années 70 par l'équipe américaine de Corliss (Corliss et al., 1979). Elles sont le résultat de l'activité volcanique aux niveaux des dorsales océaniques. Le mouvement des plaques tectoniques dans ces zones provoque une remontée du magma à quelques kilomètres de profondeur. Lors de son refroidissement, le magma se rétracte et provoque des fissures dans le plancher océanique. L'eau de mer s'infiltré par ces fissures et se réchauffe à proximité du magma. Sous l'effet de la pression, cette eau chaude remonte vers le plancher océanique en lessivant les roches rencontrées ; cet effet est accentué par les fortes températures et pressions qui augmentent le pouvoir solubilisant de l'eau. Elle s'acidifie (pH avoisinant les 2-3) et s'enrichit en éléments métalliques (Fe(II) et Mn(II)). Ces sources forment des points chauds où l'eau jaillit de cheminées à une température avoisinant les 400 °C. Au contact de l'eau de mer (à 2-3 °C), les composés minéraux (Fe(II) et Mn(II)) précipitent et forment des cheminées hydrothermales appelées aussi fumeurs noirs (Figure 1.2). Le fluide hydrothermal est aussi riche en gaz dissous (CO₂, H₂S, H₂ et CH₄). Ces composés réduits représentent une source d'énergie pour les écosystèmes présents au niveau des sources hydrothermales (Jannasch & Taylor, 1984).

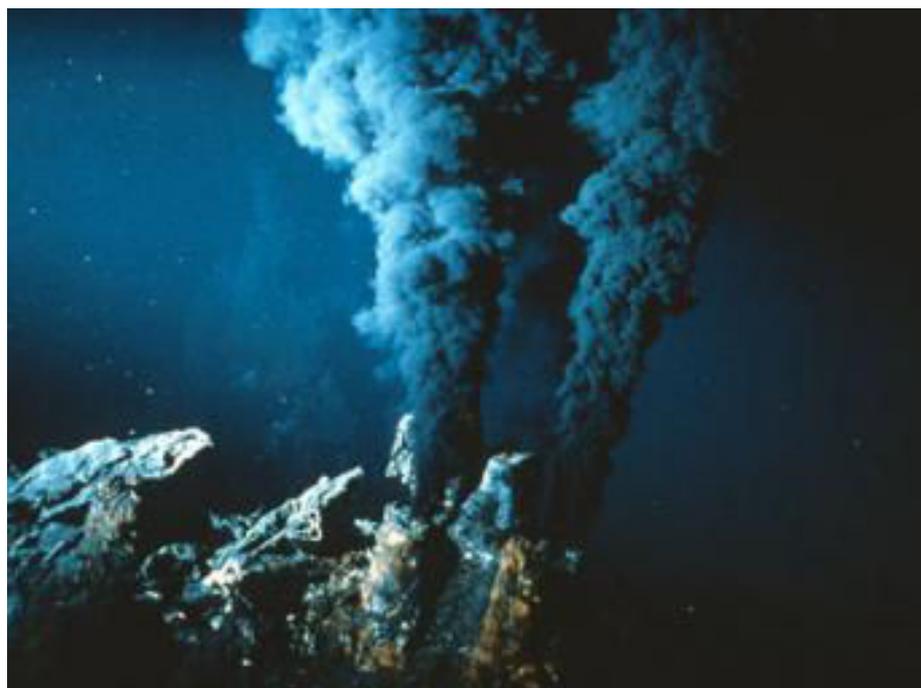


Figure 1.2. Geysier sous-marin. Fosse des Caïmans, près de la Jamaïque, à 5000 mètres sous les mers. © [CNRS Photothèque](#)/ Jean-Louis Cheminée

Les sources hydrothermales sont des « oasis de vie » car elles concentrent une forte biomasse contrastant avec celles normalement rencontrées dans les océans profonds. La géochimie particulière de ces environnements fournit un ensemble de couples redox exploités par des micro-organismes chimiosynthétiques. Ceux-ci contribuent à l'apport du carbone nécessaire au développement des communautés microbiennes. Celles-ci s'organisent en cercles concentriques autour des sources hydrothermales en fonction du gradient de température.

L'étude des sources hydrothermales est cruciale car cet écosystème possède des caractéristiques uniques : sa source d'énergie provient uniquement des fluides géochimiques ; la production de carbone organique repose sur des organismes chimiotrophiques et anaérobiques ; c'est un des seuls écosystèmes indépendants de la photosynthèse et de ses produits tel que le carbone organique ou l'oxygène. Abrisé des irradiations dans le fond des océans, cet écosystème est un candidat idéal pour comprendre le développement des premières formes de vies sur Terre. De plus, les sources hydrothermales abritent une biodiversité luxuriante ainsi qu'un nombre important d'espèces endémiques. Les données génomiques et métagénomiques ainsi que des mesures d'activités réalisées sur les communautés microbiennes abyssales révèlent l'existence de voies métaboliques inconnues. La connaissance des processus

spécifiques issus de ces organismes représente donc une source de nouveaux biocatalyseurs.

1.1.2. Les extrémophiles

Les extrémophiles sont des organismes qui se développent dans des conditions *à priori* incompatibles avec la vie. La notion d'extrémophilie est très différente selon que l'on se place un point de vue anthropomorphique ou dans un contexte plus global qui prend en compte l'évolution et la biodiversité (Rothschild & Mancinelli, 2001). De plus, il est aussi important de faire la distinction entre des organismes qui « aiment » leur environnement, et ceux qui le tolère. Les organismes adaptés à leur environnement vont ressentir un environnement non-extrémophile comme un stress. Pour finir, il faut aussi considérer les formes de vie en sommeil (spore, germe) qui sont capables de survivre dans des conditions extrêmes attendant des conditions plus favorables (Sallon et al., 2008). Il en ressort que la limite entre organismes extrémophiles et non extrémophiles est floue et peut être entendue de différentes manières. Dans la présentation qui suit, nous considérerons comme extrémophiles les organismes qui se développent dans des conditions physicochimiques extrêmes c'est à dire à la limite de la gamme tolérée par le vivant du paramètre considéré.

Les océans profonds sont caractérisés par une température de 2-3 °C. Les organismes capables de se développer à des températures proches de zéro sont appelés psychrophiles (Figure 1.3). La basse température diminue fortement la vitesse des réactions chimiques. Pour maintenir une efficacité spécifique équivalente aux organismes mésophiles, les enzymes provenant d'organismes psychrophiles ont un site actif particulièrement flexible pour permettre les mouvements nécessaires au processus catalytique (Feller & Gerday, 2003). Le froid impacte aussi la fluidité de la membrane ; la composition lipidique de la membrane est modifiée en présence d'un stress résultant d'une exposition au froid, ce qui permet de garder une fluidité compatible avec le bon fonctionnement de la cellule même à basse température (Feller & Gerday, 2003).

Les sources hydrothermales ont été colonisées par un ensemble de micro-organismes adaptés aux hautes températures. Les organismes dits thermophiles se développent à des températures entre 40 et 60 °C (Figure 1.3). Les bactéries et archées ayant un optimum de croissance supérieur à 80 °C sont qualifiées

d'hyperthermophiles. Curieusement, les organismes se développant à des températures au-dessus de 100 °C sont dans une grande majorité des archées.

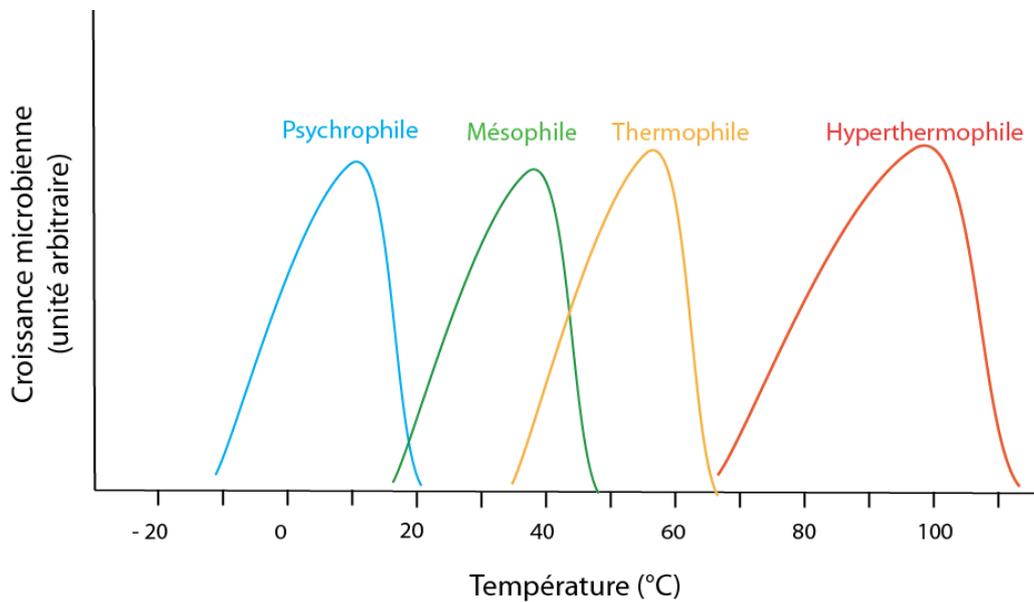


Figure 1.3. Croissance microbienne en fonction de la température. La gamme de croissance des organismes psychrophiles est représentée en bleu, celle des mésophiles en vert, celle des thermophiles en orange et celle des hyperthermophiles en rouge. D'après (Gottschal & Prins, 1991)

Ces organismes sont adaptés à leur environnement. A titre d'exemple, les organismes hyperthermophiles ne sont pas seulement capables de survivre à des températures avoisinant la température d'ébullition de l'eau, mais ils ont besoin de hautes températures pour se développer (Figure 1.3). L'adaptation des organismes à la température se reflète dans l'ensemble des processus cellulaires et affecte les biomolécules qui constituent la cellule (Imanaka, 2011). En particulier, l'adaptation des protéines à la température a été largement étudiée avec de larges applications dans l'industrie et la biotechnologie (Unsworth, Van Der Oost, & Koutsopoulos, 2007). De plus, les homologues archéens hyperthermophiles sont de plus en plus utilisés pour des études structurales impliquant de grands assemblages car tout en ayant une structure quaternaire similaire, ils sont plus stables que leurs homologues eucaryotes et se purifient en plus grande quantité (Park et al., 2014).

L'adaptation des protéines à la température a été largement étudiée aussi bien au niveau moléculaire qu'à travers l'analyse des génomes. L'équipe de Manolo Gouy a développé des méthodes robustes afin de reconstruire des génomes ancestraux et ainsi discuter des caractéristiques écologiques des ancêtres de bactéries

et des archées et du dernier ancêtre commun universel (DACU ou LUCA en anglais)(Boussau, Blanquart, Necsulea, Lartillot, & Gouy, 2008). Les auteurs proposent que l'ancêtre universel soit un organisme mésophile. Par la suite, la thermotolérance augmente jusqu'aux ancêtres thermophiles des bactéries et archées-eucaryotes et pour diminuer dans un second temps. L'adaptation aux très hautes températures des bactéries et archées actuelles se serait donc déroulée en parallèle (Groussin & Gouy, 2011).

Dans les océans profonds, la pression due à la colonne d'eau augmente de 1 bar tous les 10 mètres lorsqu'on s'enfonce dans les fonds marins (1 bar = 0,1 MPa = 1 atm). Dans la plaine abyssale qui possède une profondeur moyenne de 3800 mètres, la pression est autour de 38 MPa. Elle peut atteindre 110 MPa (1000 fois supérieure à la pression ambiante) au point le plus profond des océans, Challenger Deep, dans la Fosse des Mariannes située au large des Philippines à 11 km de profondeur.

Les organismes piézophiles se caractérisent par une pression optimale de croissance supérieure à la pression atmosphérique (Figure 1.4). Certains piézophiles sont incapables de se développer à pression ambiante et sont qualifiés de piézophiles stricts. Parmi les organismes ayant une croissance optimale à pression ambiante, certains supportent mieux le stress pression et sont qualifiés de piézotolérant comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La bactérie *Escherichia coli*, dont la croissance est abolie à une pression de 50 MPa, fait partie des organismes piézosensibles.

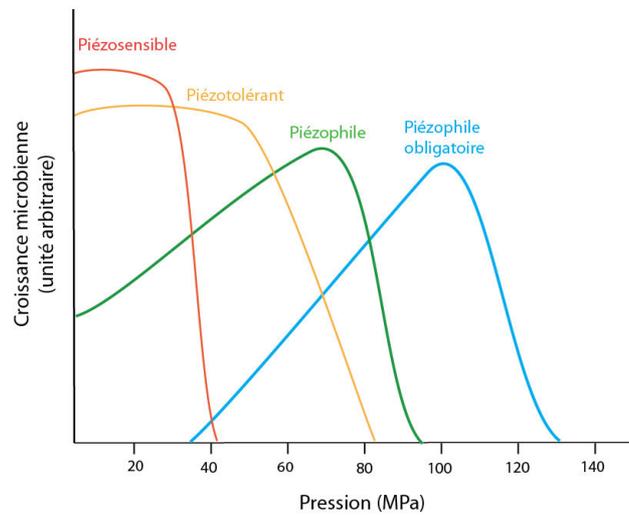


Figure 1.4. Croissance microbienne en fonction de la pression. La gamme de croissance des organismes piézosensibles est représentée en rouge, celle des piézotolérants en orange, celle des piézophiles en vert et celle des piézophiles obligatoires en bleu.

Les organismes piézophiles se développent de façon optimale à hautes pressions hydrostatiques (HPH), alors qu'à pression équivalente, la croissance des organismes de surface est abolie. La pression est responsable d'effets délétères, réversibles ou irréversibles, sur les macromolécules biologiques, altérant ainsi leur fonction et par conséquent le fonctionnement de la cellule (Balny, Masson, & Heremans, 2002; Meersman et al., 2013). Les effets de la pression sur les fonctions cellulaires sont détaillés dans le paragraphe suivant.

1.2. Effet de la pression sur les micro-organismes piézosensibles

La majorité des études sur les effets des HPH sur les processus cellulaires des organismes vivants à pression atmosphérique repose principalement sur les données obtenues pour la bactérie piézosensible *E. coli* ou la levure piézotolérante *S. cerevisiae*. Les principales fonctions cellulaires sont affectées dès la dizaine de MPa (Tableau 1.1, (Abe, 2007; G. J. Bartlett, Porter, Borkakoti, & Thornton, 2002).

Processus cellulaires	Pression inhibitrice (MPa)
Motilité	10
Division cellulaire	20 - 50
Transport des substrats	26
Croissance	50
Réplication de l'ADN	50
Traduction	50-60
Transcription	50-100
Viabilité	100-200

Tableau 1.1. Principales fonctions altérées par la pression chez les organismes piézosensibles. D'après (Abe, 2007; G. J. Bartlett et al., 2002)

La motilité de la cellule est impactée dès 10 MPa. Les effets de la pression sur la mobilité des flagelles ont été étudiés *in vivo* grâce à une chambre sous haute pression utilisable avec un microscope commercial. A 80 MPa, les cellules de *E. coli* perdent leur capacité de déplacement. Pourtant, la vitesse de rotation des moteurs flagellaires n'est diminuée que de 60 % (Nishiyama & Sowa, 2012). En augmentant la pression jusqu'à 120 MPa, les auteurs observent une inversion dans le sens de rotation. Cette inversion existe aussi à des pressions plus basses en diminuant la température (Nishiyama et al., 2013). L'effet de la pression est comparable aux

effets induits par des mutations ponctuelles sur le moteur du flagelle (Togashi, Yamaguchi, Kihara, Aizawa, & Macnab, 1997).

L'impact de la pression sur la synthèse des protéines pourrait être lié à la dissociation des ribosomes non chargés en ARN car la pression de dissociation identifiée *in vitro* correspond à la pression inhibitrice de la synthèse protéique (Abe, 2007; Gross, Lehle, Jaenicke, & Nierhaus, 1993).

La synthèse des protéines nécessite un approvisionnement constant en acides aminés. Des études sur *S. cerevisiae* suggèrent que l'apport de tryptophane serait vital pour la croissance des levures sous HPH (Abe & Horikoshi, 2000). En effet, la surexpression de la protéine transmembranaire TAT2, responsable de l'apport de tryptophane dans la cellule, conférerait à la levure la capacité de pousser à 15 et 25 MPa (Abe & Horikoshi, 2000). Par ailleurs, cette protéine aurait aussi des effets positifs sur la croissance à basses températures (10 et 15 °C).

Un changement rapide de pression (de 0,1 à 50 MPa) induit, chez la bactérie *E. coli*, la production de chaperonnes associée au stress chaud (Heat-shock proteins, HSP) et au stress froid (Cold-Shock proteins, CSP) (Welch, Farewell, Neidhardt, & Bartlett, 1993). Cette réponse au stress de pression permettrait de maintenir la structure des protéines déstabilisées par les HPH (cf. 1.4.4.3).

Chez *E. coli*, les protéines agrégées sont rassemblées en un seul agrégat situé proche du nucléole permettant ainsi qu'une seule cellule fille contienne des agrégats après division. En conséquence, la poursuite de la croissance à partir de la cellule « nettoyée » est possible (Govers, Dutré, & Aertsen, 2014). L'application de 300 MPa pendant 15 min induit une dispersion des agrégats et un arrêt du cycle cellulaire. La reprise du cycle cellulaire intervient après le réassemblage des agrégats même si un lien de cause à effet n'a pas encore été clairement établi. Le processus de réassemblage des agrégats est intimement lié aux processus énergétiques de la cellule.

Une pression au-delà de 200 MPa provoque l'inactivation des microorganismes (D. H. Bartlett, 2002). Cette propriété est largement employée dans l'agroalimentaire pour stériliser les aliments tout en préservant leur goût et leur qualité nutritionnelle (Knorr, Heinz, & Buckow, 2006).

1.3. Effets de la pression sur les micro-organismes piézophiles

1.3.1. Diversité des micro-organismes piézophiles

La découverte et la caractérisation des premières souches isolées d'organismes piézophiles remontent aux années 70. Aujourd'hui, les optima de pression de ces organismes couvrent toute la gamme de pression existant dans la biosphère profonde, allant jusqu'à 103 MPa pour une bactérie du genre *Colwellia* (Yayanos, 1986). Cette bactérie psychrophile est le premier organisme piézophile strict isolé. Par la suite, deux autres piézophiles stricts ont été isolés dans la Fosse des Mariannes à -11 000 mètres de profondeur, *Moritella yayanosii* DB21MT-5 et *Shewanella benthica* D21MT-2 (Kato et al., 1998). L'ensemble des organismes piézophiles cultivés en laboratoire est repris dans le tableau 1.2 (Cario, 2013). Il convient de noter qu'aucun organisme mésophile et piézophile n'a été isolé à ce jour. La majorité des piézophiles font partie des psychrophiles et appartiennent au domaine Bacteria. Les genres *Moritella* et *Shewanella* sont les plus représentés. Ils font partie des *Gamma-proteobacteria* et sont apparentés au genre *Psychromonas* (Nogi, Hosoya, Kato, & Horikoshi, 2007). La souche SS9 de *Photobacterium profundum* est le modèle bactérien de la piézophilie (El-Hajj et al., 2010).

Les sources hydrothermales, découvertes en 1979 par l'équipe de Corliss (Corliss et al., 1979), abritent des écosystèmes luxuriants et ont permis d'isoler de nombreux micro-organismes piézophiles mais aussi thermophiles (gamme de température comprise entre 45 et 70 °C) et hyperthermophiles (température de croissance optimale supérieure à 80 °C) (Tableau 1.2). Les archées sont les représentantes majeures des piézo-(hyper)-thermophiles (Tableau 1.2). L'ordre des *Thermococcales* est largement représenté et comporte le seul organisme hyperthermophile et piézophile strict isolé à ce jour, *Pyrococcus yayanosii* (Zeng et al., 2009). Cette archée est incapable de se développer à des pressions inférieures à 20 MPa. Son optimum de pression se situe à 52 MPa et elle détient le record de piézophilie chez les hyperthermophiles (130 MPa) (Birrien et al., 2011). Le genre *Pyrococcus* comprend aussi des espèces piézosensibles et piézotolérantes (Fiala & Stetter, 1986; González et al., 1998).

Souches (hyper)thermophiles cultivées en laboratoire

Ordre	Espèce	Souche	Origine (profondeur)	Gamme de pression	Gamme de température	Référence
Rhodobacterales	<i>Piezobacter thermophilus</i>	108 [†]	Atlantique, MAR, TAG (3626 m)	5-65 MPa, opt 36 MPa autotrophie	30-55°C, opt 50°C *	Takai et al. 2009
Chromatiales	<i>Thiopropinquium lithotrophica</i>	106 [†]	Atlantique, MAR, TAG (3626 m)	0,2-36 MPa, opt 16 MPa	30-55°C, opt 50°C	Takai et al. 2009
Thermotogales	<i>Martinitopha piezophila</i>	KA3 [†]	Pacifique, EPR PPS2 (2630 m)	0,1-50 MPa, opt 40 MPa	45-70°C, opt 65°C	Alain et al. 2002
	<i>Thermotopha japonica</i>	IHB1 [†]	Iheya, Okinawa (972 m)	0,1-80 MPa, opt 20 MPa	45-80°C, opt 72°C	Takai and Honkoshi 2000
	<i>Thermococcus</i> sp.	ES1	Ver Polyçète, Juan de Fuca Ridge (2200m)	0,1-80 MPa	54-91°C, opt 82°C	Pledger 1994
Thermococcales	<i>Thermococcus barophilus</i>	MP [†]	Atlantique, Snake Pit (3550 m)	0,1-80 MPa, opt 40 MPa	48-100°C, 85°C *	Martinson et al. 1999
	<i>Thermococcus rufus</i>	ST557 [†]	White Lady hydrothermal site, Fiji Bassin (2000 m)	0,1-98 MPa, opt 7	73-103°C, opt 85°C	Godfrey 1996 Edgcomb, 2007
	<i>Thermococcus peptonophilus</i>	DSM 10343 [†]	Izu-Bonin forearc (1380 m)	0,1-60 MPa, opt 45 MPa	60-100°C, opt 90°C *	Gonzalez 1995 Cinganelia 1997
	<i>Palaecoccus ferrophilus</i>	DMJ [†]	Cheminée, Guaymas Basin (1338 m)	0,1-60 MPa, opt 30 MPa	60-88°C, opt 83°C	Takai 2000
	<i>Pyrococcus</i> sp.	GB-4	Sédiment, Guaymas Basin (2020 m)	0,1-98 MPa, opt 7	65-103°C, opt 104°C	Jannisch (1992) (2007)
		MAR-7C	Atlantique, MAR (3650 m)	0,1-20 MPa	55-92°C, opt 90°C	Jannisch 1992
	<i>Pyrococcus abyssi</i>	GE5	Fiji Basin (2000 m)	0,1-30 MPa, opt 10	max 88°C à 10MPa	Jannisch 1992
	<i>Pyrococcus andrewarvti</i>	ES4	Juan De Fuca Ridge (2200 m)	0,1-50 MPa, opt 20 MPa	67-102°C, opt 96°C	Martinson (1997) Zeng 2009
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	DSM 3638 [†]	Ile Vulcano, Italie (source de surface)	0,1-67 MPa	80-108°C, opt 98°C	Pledger 1994
	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	OT3 [†]	Okinawa Trough (1395 m)	0,1-30 MPa, 10 MPa	70-103°C, opt 100°C	Fiala 1986, Zeng 2009
	<i>Pyrococcus yayanosii</i>	CHI [†]	Atlantique, Ashadze (4100 m)	0,1-40 MPa, opt 10 MPa	80-102°C, opt 98°C	Gonzalez 1998, Zeng 2009
Methanococcales	<i>Methanococcus jamae</i>	DSM 2661	Pacifique, EPR (2600 m)	20-120 MPa, opt 52 MPa	60-110°C, opt 98°C	Zeng et al. 2009, Birrien 2011
	<i>Methanococcus thermolithothrophicus</i>	DSM 2095 [†]	Iheya, Okinawa (972 m)	(CH4 ++ 75 MPa)	50-86°C, opt 85°C	Jones 1983, Miller 1988
Methanopyrales	<i>Methanopyrus kandleri</i>	116	Ride Centrale Indienne (2415-2460 m)	0,1-100 MPa, opt 50 MPa	56-75°C, opt 65°C	Bernhardt (1988) Huber (1982)
				opt 20 MPa	opt 105°C	Takai 2008

Souches psychrophiles cultivées en laboratoire

Ordre	Espèce	Souche	Origine (profondeur)	Gamme de pression	Gamme de température	Référence
Roseobacterales	<i>Rhodobacteriales bacterium</i>	PRT1	Fosse de Puerto Rico PRT (8350 m)	min testé 60 MPa, opt 80 MPa	-4-10°C, opt 10°C	Eloe 2011 AEM
Alteromonadales	<i>Colwellia</i> sp.	MTL-41	Fosse des Mariannes, amphipode (10 476 m)	30-120 MPa, opt 103 MPa	opt 10°C	Yayanos 1986
	<i>Colwellia hadalensis</i>	BNL-1 [†]	Fosse de Puerto Rico, PRT (7410 m)	40-80 MPa, opt 90 MPa	2-15°C, opt 10°C	Denning 1998
	<i>Colwellia piezophila</i>	Y223G [†]	Pacifique, amphipode (3584m)	0,1-70 MPa, opt 30 MPa	minus 2 - 14°C, opt 10°C	Yayanos 1986
Moritellaceae	<i>Moritella</i> sp.	PE36	Atlantique, sédiment (2815 m)	0,1-50 MPa, opt 30 MPa	2-14°C, opt 10°C	Xu 2003 IJSEM
	<i>Moritella abyssi</i>	2693 [†]	Atlantique, sédiment (2815 m)	0,1-50 MPa, opt 20-30 MPa	2-12°C, opt 6°C	Xu 2003 IJSEM
	<i>Moritella profunda</i>	2674 [†]	Atlantique, sédiment (2815 m)	0,1-70 MPa, opt 50 MPa	4-15°C, opt 15°C	Nogi 1998
	<i>Moritella japonica</i>	DSK1 [†]	Fosse du Japon, sédiment (6356 m)	60-100 MPa, opt 80 MPa	opt 10°C	Kato 1998 AEM
Psychromonadales	<i>Moritella yayanosii</i>	DB21MT-5 [†]	Fosse des Mariannes, sédiment (10898 m)	0,1-110 MPa, opt 52 MPa	minus 2 - 15°C, opt 12°C	Yayanos 1986
	<i>Psychromonas sp.</i>	CNPT3	Pacifique, amphipode (5800 m)	20-100 MPa, opt 60 MPa	2-12°C, opt 6°C	Nogi 2007
	<i>Psychromonas hadalis</i>	K41G [†]	Fosse du Japon, sédiment (7542 m)	30-70 MPa, opt 50 MPa*	opt 10°C	Nogi 2002
	<i>Psychromonas kaikoe</i>	JT7304 [†]	Fosse du Japon, sédiment (7434 m)	0,1-50 MPa, opt 25 MPa	2-13°C, opt 10°C	Xu 2003 IJSEM
	<i>Psychromonas profunda</i>	2825 [†]	Atlantique, sédiment (2770 m)	opt 98 MPa	opt 2°C	Latro 2007
Shewanellaceae	<i>Shewanella</i> sp.	KT99	Fosse de Kermadec, amphipode (9856 m)	0,1-80 MPa, opt 30 MPa	max 13°C, opt 8°C	Wirsens 1987 J
	<i>Shewanella benthica</i>	F1A	Atlantique, colonne d'eau (4900 m)	0,1-70 MPa, opt 50 MPa	opt 10°C	Kato 1995
	<i>Shewanella benthica</i>	DB5501	Bate de Suruga, sédiment (2485 m)	0,1-70 MPa, opt 50 MPa	opt 10°C	Kato 1995
	<i>Shewanella benthica</i>	DB6101	Fosse de Ryukyu, sédiment (5110 m)	0,1-70 MPa, opt 50 MPa	opt 15°C	Kato 1995
	<i>Shewanella benthica</i>	DB6705	Fosse du Japon, sédiment (6356 m)	0,1-70 MPa, opt 50-60 MPa	opt 15°C	Kato 1996
	<i>Shewanella benthica</i>	DB6906	Fosse du Japon, sédiment (6269 m)	20-80 MPa, opt 60 MPa	opt 10°C	Kato 1996
	<i>Shewanella benthica</i>	DB172R	Fosse de Izu-Bonin, sédiment (6499 m)	50-100 MPa, opt 70 MPa	opt 10°C	Nogi Kato 1999
	<i>Shewanella benthica</i>	DB172F	Fosse de Izu-Bonin, sédiment (6499 m)	opt 62 MPa	opt 8°C	Delong Yayanos 1986
	<i>Shewanella benthica</i>	DB21MT-2	Fosse des Mariannes, sédiment (10898 m)	0,1-50 MPa, opt 20 MPa	0-20°C, opt 10-15°C	Delong Yayanos 1986
	<i>Shewanella benthica</i>	PT48	Fosse des Philippines, amphipode (16163 m)	0,1-50 MPa, opt 20 MPa	0-28°C, opt 15-20°C	Xiao 2007 IJSEM
	<i>Shewanella benthica</i>	PT99	Fosse des Philippines, amphipode (8600 m)	opt 30 MPa	opt 10°C	Nogi 1998
	<i>Shewanella psychrophila</i>	WP2 [†]	Pacifique Ouest, sédiment (1914 m)	0,1-70 MPa, opt 10 MPa	4-18°C, opt 10°C	Nogi 1998
	<i>Shewanella piezotolerans</i>	WP3 [†]	Pacifique Ouest, sédiment (1914 m)			
	<i>Shewanella violacea</i>	DSS12	Fosse de Ryukyu, sédiment (5110 m)			
Vibrionales	<i>Photobacterium profundum</i>	DSJ4 [†]	Fosse de Ryukyu, sédiment (5110 m)			

Tableau 1.2 Souches piézophiles cultivées en laboratoire. Les organismes piézophiles stricts sont annotés en rouge. D'après (Cario, 2013)

1.3.2. Réponse des micro-organismes piézophiles à la pression

L'étude de l'adaptation des micro-organismes piézophiles n'en est encore qu'à ses débuts. Les premières études ont porté sur la croissance des micro-organismes sous pression avec la découverte des premiers piézophiles stricts. Par la suite, le caractère strict de la piézophilie a été confirmé par l'analyse du comportement de ces organismes à des pressions sous ou sub-optimales. A pression ambiante, la bactérie psychrophile et piézophile *Photobacterium profundum* SS9 surexprime des chaperonnes (El-Hajj et al., 2010) comme l'archée hyperthermophile et piézophile *Thermococcus barophilus* (Marteinsson, Reysenbach, Birrien, & Prieur, 1999). Celle-ci produit en plus des osmolytes comme lors d'un stress salin (Cario, 2013). Ces observations suggèrent que les organismes piézophiles ressentent la pression ambiante comme un stress et que celle-ci impacte une grande partie de leur protéome.

Des études comparatives de transcriptomique et protéomique sur des archées piézosensibles (*Thermococcus kodakarensis*) et piézophiles (*Thermococcus barophilus*) pression optimale 40 MPa) ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes d'adaptation aux HPH. L'archée piézosensible *T. kodakarensis* met en place une réponse multiple de stress lorsqu'elle est soumise aux HPH. En revanche, en réponse au stress induit par une pression sous ou supra-optimale (0,1 et 70 MPa respectivement), *T. barophilus* module principalement l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'assimilation des acides aminés, des sucres et dans la production d'énergie (Vannier, 2012).

Les archées ont la particularité de posséder des lipides membranaires spécifiques avec une liaison éther entre la tête hydrophile et la chaîne carbonée (au lieu d'ester dans le cas des bactéries et eucaryotes). De plus, chez les archées, la condensation de deux lipides di-éther donne des tétra-éthers ayant deux têtes polaires et formant une monocouche lipidique. Une augmentation du ratio di-/tétraéthers ainsi que du degré d'insaturation a été identifiée chez *T. barophilus* en corrélation avec l'augmentation de la pression. Il semblerait donc que cette archée régule sa composition membranaire en réponse au stress induit par une pression supra-optimale (70 MPa) ou sous-optimale (0,1 MPa) (Cario, 2013). L'effet de la pression sur la composition des lipides membranaires de *T. barophilus* est semblable à celle observée chez les psychrophiles.

Les enzymes impliquées dans la transcription ont été étudiées *in vitro*. L'ARN polymérase de *E. coli* perd 30 % de son activité après une incubation sous pression à 100 MPa alors que l'ARN polymérase de la bactérie piézophile *Shewanella violacea* maintient 100 % de son activité. De plus, la stabilité de l'enzyme de *S. violacea* n'est pas affectée par une pression de 140 MPa qui induit la dissociation de l'ARN polymérase de *E. coli* (Kawano et al., 2004).

Comme l'atteste les exemples précédents, les effets de la pression visibles sur la cellule sont directement en lien avec la réponse des macromolécules à la pression. L'impact des hautes pressions hydrostatiques sur les macromolécules biologiques présentes dans la cellule est résumé dans le schéma suivant (Figure 1.5).

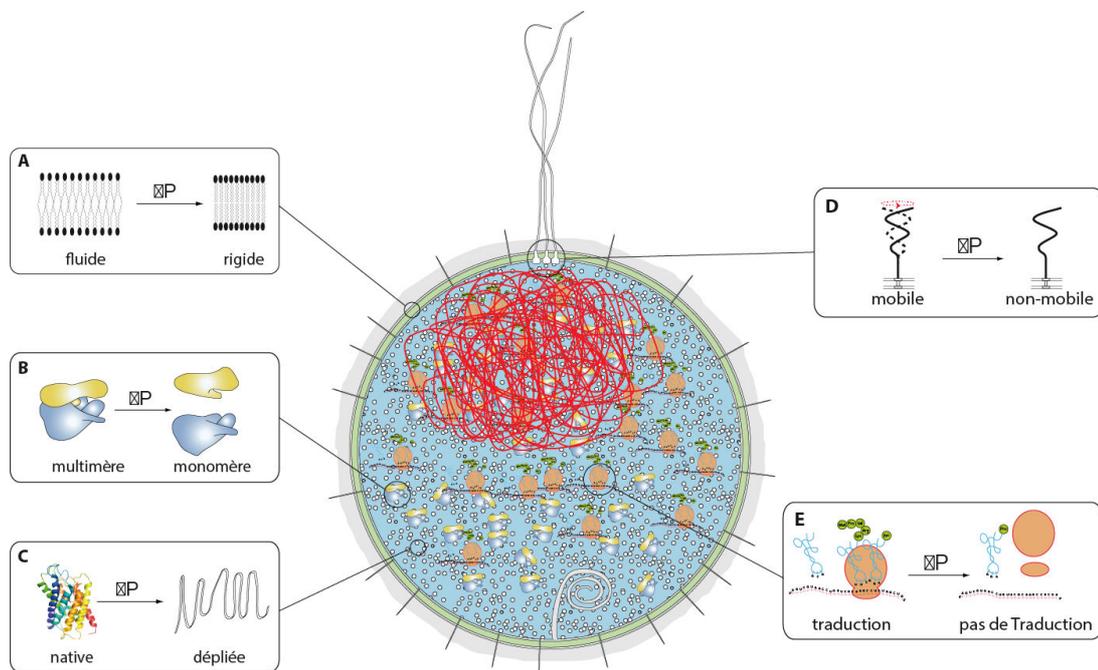


Figure 1.5. Effets généraux de la HPH sur les composants cellulaires. Adapté de (Oger & Jebbar, 2010).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis orientée vers l'étude des effets des HPH sur les protéines. Toutefois, je présenterai brièvement l'effet général de la pression sur les macromolécules biologiques d'un point de vue thermodynamique. Je citerai, par la suite, quelques exemples de travaux effectués sur les effets des HPH sur les lipides membranaires et les acides nucléiques. Finalement, je détaillerai les effets des HPH sur la stabilité et l'activité des protéines.

1.4. Effet de la pression sur les macromolécules biologiques

1.4.1. Considérations générales

Les effets de la pression sur les macromolécules biologiques reposent sur le principe de Le Chatelier (Le Chatelier, 1884). Un système soumis à une augmentation de la pression hydrostatique va tendre vers un état de plus faible volume. La pression va donc favoriser les réactions associées à une variation de volume négatif alors qu'elle va limiter celles associées à une variation de volume positif. La pression déplace un équilibre vers l'état occupant un volume moindre.

Les systèmes moléculaires reposent sur des équilibres thermodynamiques dont les différents états sont influencés par les conditions physico-chimiques environnantes. L'équilibre d'un système entre deux états est décrit par la constante d'équilibre K en lien avec la différence d'énergie libre ΔG entre les deux états (Equation 1.1).

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (1.1)$$

avec R la constante universelle des gaz parfaits et T la température en Kelvin. L'énergie libre de Gibbs est définie selon l'équation suivante :

$$\Delta G = \Delta U + P\Delta V - T\Delta S \quad (1.2)$$

avec U l'énergie interne en Joule, P la pression en Pascal, V le volume en m^3 et S l'entropie du système en Joule par Kelvin. L'équation 1.2 définit la relation entre la pression et le volume alors que la température est reliée à l'entropie du système. L'impact de la pression sur un système est principalement déterminé par le changement de volume ΔV à température constante comme explicité dans l'équation suivante :

$$\left(\frac{\partial(\Delta G)}{\partial P} \right)_T = \Delta V \quad (1.3)$$

Cette équation peut aussi être exprimée en fonction de la constante d'équilibre. Dans ce cas, à partir des équations 1.1 et 1.3, on obtient :

$$\left(\frac{\partial(\ln K)}{\partial P} \right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1.4)$$

1.4.2. Les lipides membranaires

Nous avons vu précédemment que les lipides membranaires sont impliqués dans l'adaptation des micro-organismes aux HPH. En effet, la structure de la bicouche lipidique est particulièrement sensible aux changements de température et de pression. L'augmentation de la pression ou la diminution de la température modifient l'organisation des chaînes hydrocarbonées et diminuent la fluidité de la membrane (Winter & Jeworrek, 2009).

Les HPH ont tendance à mimer les effets des basses températures sur les lipides membranaires. Cependant, l'application de HPH peut amener à la formation de nouvelles phases ordonnées (Meersman et al., 2013).

1.4.3. Les acides nucléiques

L'effet de la pression sur l'ADN ou l'ARN est relativement modeste comparé à celui sur les protéines ou les lipides. En effet, le ΔV associé à la stabilisation de l'ADN est 10 fois inférieur à celui des protéines. La structure en double brin de l'ADN est stabilisée par la pression sur une large gamme de conditions physicochimiques (Macgregor, 1998). Cependant, la stabilisation de la structure en double brin de l'ADN sous pression pourrait perturber les activités de réplication et de transcription en s'opposant à la transition double brins vers simple brin (Macgregor, 2002). Une étude structurale par cristallographie des rayons X réalisée dans l'équipe ELMA à l'IBS a suivi le comportement d'un octanucléotide jusqu'à 1,39 GPa (Girard et al., 2007). Le duplexe agit comme un ressort moléculaire se comprimant axialement de l'ordre de 10 % mais tout en conservant intacte la géométrie des appariements de Watson-Crick. En accord avec ce résultat, les études sur les interactions protéines-ADN semblent indiquer que la composante protéique est majoritairement impactée par la pression (Takahashi & Sugimoto, 2013).

Au contraire des formes en duplexe de l'ADN, les formes non canoniques sont sensibles à la pression. La forme G-quadruplexe, impliquée dans la régulation

des télomères (Palumbo, Ebbinghaus, & Hurley, 2009), est déstabilisée par la pression. La valeur du ΔV associée à sa déstabilisation est 10 fois plus importante que celle déterminée pour le duplexe et s'apparente aux valeurs associées à la déstabilisation de protéines (Takahashi & Sugimoto, 2013).

1.4.4. Les protéines

Les protéines sont des objets dynamiques. Elles ont besoin d'une certaine flexibilité pour réaliser les mouvements moléculaires nécessaires à leur fonction. D'autre part, leur structure quaternaire doit rester suffisamment rigide pour maintenir leur stabilité. L'adaptation des protéines à des conditions extrêmes est le résultat d'un ensemble de mutations accumulées durant l'évolution. Ces mutations modifient la dynamique de la protéine dans le but d'éviter sa dénaturation dans des conditions extrêmes, tout en facilitant les mouvements qui lui permettent de conserver sa fonction.

A titre d'exemple, l'adaptation à la température de l'ensemble du protéome a été démontrée par des expériences de diffusion de neutrons sur des cellules entières de bactéries (Tehei et al. 2002). L'adaptation à la température ne modifie pas en profondeur l'agencement tridimensionnel des protéines mais induit une augmentation des interactions intramoléculaires, une réduction des boucles et un cœur hydrophobe plus important (Struvay, Negro, Matagne, & Feller, 2013; Tehei et al., 2004). Ainsi, un nombre restreint de mutations peut expliquer les différences de comportement de protéines provenant d'organismes mésophiles et thermophiles (Colletier et al., 2012).

1.4.4.1. Volume des protéines

Pour comprendre le changement de volume induit par la pression, nous devons définir le volume d'une protéine. Kauzmann propose de considérer le volume partiel molaire d'une protéine comme la somme de trois contributions (Kauzmann, 1959):

$$V_T = V_{\text{atomes}} + V_{\text{cavités}} + \Delta V_{\text{hydratation}}$$

V_{atomes} représente la somme du volume des atomes composants la protéine, $V_{\text{cavités}}$ représente le volume des vides structuraux dans le cœur de la protéine inaccessible au solvant et $\Delta V_{\text{hydratation}}$ correspond au changement de volume associé

aux interactions protéine-solvant. Le volume des atomes ne varie pas sur la gamme de pression biologique, les changements de volume induit par la pression impliquent donc les cavités et les interactions avec le solvant.

En moyenne, la diminution de volume mesurée expérimentalement lors de la dénaturation d'une protéine par la pression est autour de 1-2 % de son volume total (Royer, 2002). La valeur négative du changement de volume est en accord avec la première observation de Bridgman, qui remarqua la coagulation de l'œuf sous pression (Bridgman, 1914). Depuis, il est établi que la pression favorise l'état déplié c'est à dire que la pression induit la dénaturation des protéines (Royer, 2002).

Dans le cas de la dénaturation par la température, les protéines suivent le modèle hydrocarbure-liquide qui soutient le concept de la formation d'un cœur hydrophobe qui participe à la stabilité des protéines globulaires. Cependant, dans le cas de la dénaturation par la pression, le ΔV largement positif prédit par ce modèle n'est pas observé expérimentalement sur les protéines (Chalikian & Bresiauer, 2002). Ce phénomène a été décrit par Kauzmann comme le paradoxe du volume des protéines (« protein volume paradox ») (Kauzmann, 1987). De plus, la majorité des protéines dénaturées par la pression conserve des zones structurées. Il semblerait donc que la dénaturation par la pression soit le fait d'entrée de molécules d'eau à l'intérieur de la protéine et non pas à l'exposition de résidus hydrophobes au solvant comme suggéré par le modèle hydrocarboné-liquide (Hummer, Garde, García, Paulaitis, & Pratt, 1998).

Néanmoins, l'entrée de molécule d'eau ainsi que l'élimination des cavités internes devraient entraîner un changement de volume important. Or comme indiqué précédemment, le changement de volume associé à la dénaturation induite par la pression ne correspond qu'à 1-2 % du volume total de la protéine. Il doit donc exister une composante avec un volume positif qui viendrait compenser l'effet de l'hydratation et de la perte des cavités internes. Il a été proposé que le volume thermique (« thermal volume »), associé aux mouvements thermiques entre la protéine et le solvant, soit à l'origine de la contribution positive au ΔV (Chalikian & Filfil, 2003). D'autres proposent que l'exposition de résidus hydrophobes conduise en fait à une augmentation du volume (Royer, 2002). La nature de la contribution positive au ΔV est encore source de débat.

1.4.4.2. Le paysage conformationnel

Les protéines peuvent adopter un large ensemble de conformations différentes qualifiées de sous-états conformationnels (Frauenfelder, 2005; Henzler-Wildman & Kern, 2007). Ces fluctuations existent, même à très basse température. Les différents états conformationnels ont des structures, des dynamiques et même parfois des fonctions différentes (Frauenfelder, Fenimore, & Young, 2007). En effet, le paysage conformationnel englobe les différents états de l'enzyme lors de la catalyse (forme apo, holo, activée) mais aussi les différentes étapes de son repliement (Figure 1.6).

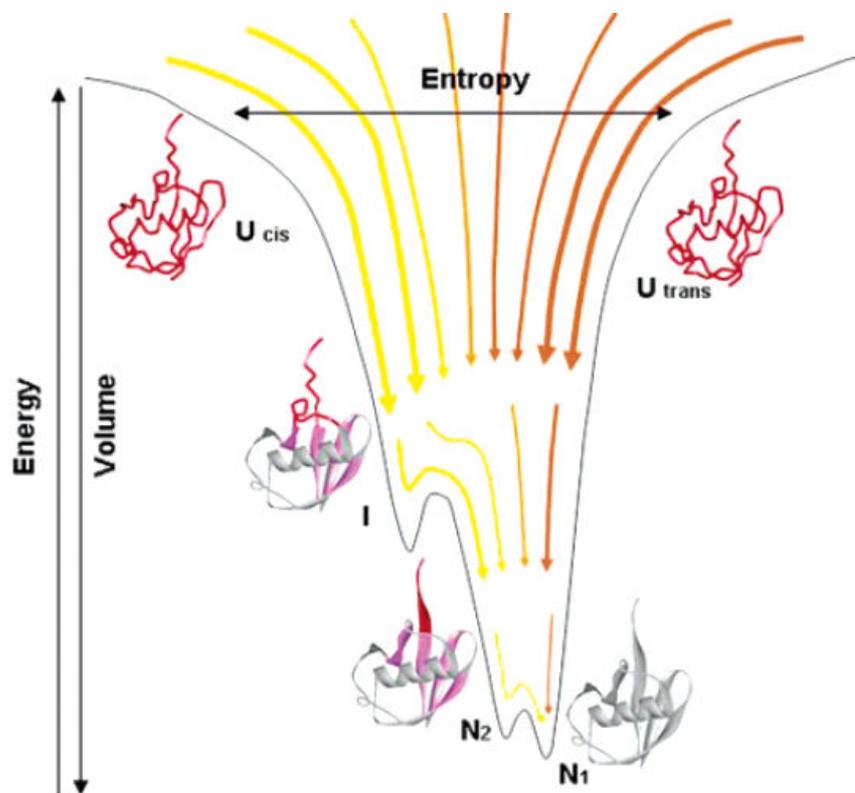


Figure 1.6. Paysage conformationnel de l'ubiquitine. Les états natifs sont nommés N₁ et N₂, l'état intermédiaire I et les états dépliés U_{cis} et U_{trans}. D'après (Akasaka, 2006).

Il existe plusieurs moyens de parcourir le paysage conformationnel des protéines par des méthodes expérimentales. Il est admis que la conformation native, celle souvent obtenue par des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou de cristallographie des rayons X, correspond à la conformation de plus faible énergie. Le changement de température, pH ou l'ajout de substrat peut permettre de changer l'équilibre entre les conformations présentes en solution et de

privilégier une conformation différente. Lors d'un changement de pression, l'énergie récupérée par la protéine est faible, de l'ordre de quelques kilocalories par moles. Ce gain énergétique se produit de manière mécanique à travers la variation de volume. A l'inverse, la variation de température induit un gain énergétique pour la protéine de quelques dizaines voire centaines de kilocalories par moles affectant l'énergie interne et l'entropie. La pression est donc un outil de choix pour parcourir le paysage conformationnel (Akasaka, 2006).

1.4.4.3. Stabilité des protéines

Comme discuté précédemment, le ΔV accompagnant la dénaturation des protéines est négatif dans la grande majorité des cas à l'exception des très hautes températures. La pression est donc un outil pour sonder le chemin entre l'état natif et l'état déplié et renseigner sur les forces en présence qui régissent le repliement des protéines.

Dans le cas des protéines oligomériques, la dénaturation suit le processus suivant : dissociation de l'oligomère, transition vers l'état monomérique (souvent sous la forme d'un globule fondu ou « molten globule ») suivi d'une dénaturation plus ou moins complète (Figure 1.7).

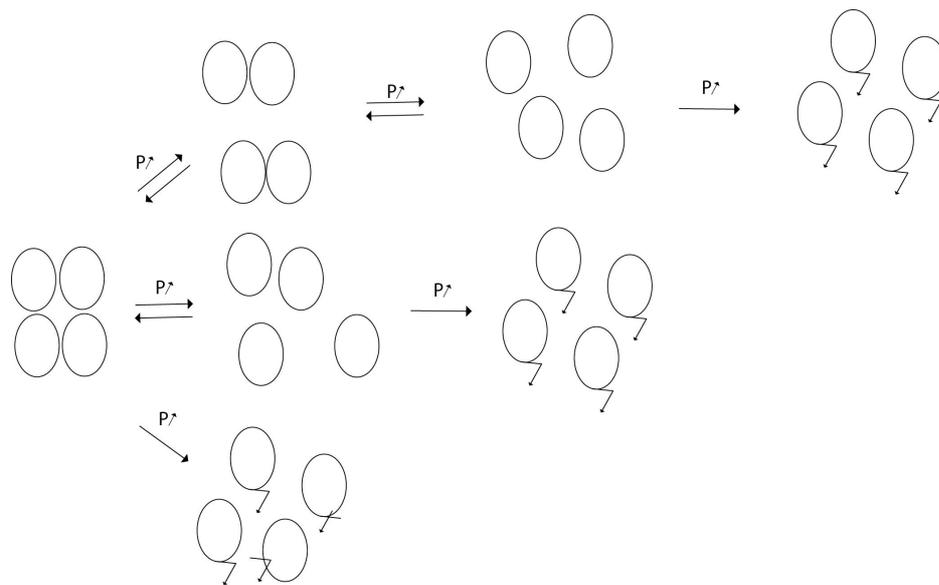


Figure 1.7. Représentation schématique du chemin de dénaturation d'une protéine oligomérique. La flèche vers le bas indique la dénaturation irréversible des monomères conduisant à l'agrégation. D'après (Girard et al., 2010).

Ce processus peut être réversible suivant les constantes d'équilibre existantes entre les états intermédiaires. C'est le cas des lactates déshydrogénases (LDH) tétramériques de porc qui se dissocient en monomère de manière réversible en dessous de 100 MPa (Müller, Lüdemann, & Jaenicke, 1981). De la même manière, la protéine HSP26, composée de 24 sous-unités, se dissocie de manière réversible en dimère autour de 150 MPa (Skouri-Panet, Quevillon-Cheruel, Michiel, Tardieu, & Finet, 2006). Les sous unités peuvent aussi être instables et induire la dissociation irréversible du complexe. C'est le cas de la protéine urate oxydase tétramérique qui se dissocie en monomère vers 200 MPa de manière irréversible (Girard et al., 2010), et de la chaperonne Cpn60 de 14 sous unités qui se dissocie en monomères instables autour de 130 MPa (Gorovits, Raman, & Horowitz, 1995).

Il convient de noter que le caractère réversible de la désoligomérisation est indépendant du nombre de sous unités. De même, tous les oligomères ne sont pas déstabilisés par la pression. En effet, des études ont montré par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) que la peptidase dodécamérique TET (500 kDa) conserve sa structure quaternaire à 400 MPa et 90 °C (Rosenbaum et al., 2012). Cet enzyme provient de *Pyrococcus horikoshii*, archée hyperthermophile des fonds marins, ce qui peut expliquer la stabilité de l'édifice dodécamérique face à des conditions extrêmes.

Curieusement, certaines protéines ont tendance à s'oligomériser sous HPH. Les chaperonnes alpha-cristallin forment à pression ambiante des grands assemblages de 600 kDa. La pression induit une augmentation du rayon de giration, passant de 60 Å à 90 Å à 300 MPa, traduisant une oligomérisation de la protéine (Skouri-Panet et al., 2006).

Malgré des exceptions, la majorité des protéines oligomériques se dissocie aux alentours de 100-200 MPa. Dans le cas des protéines monomériques, leur gamme de stabilité est beaucoup plus étendue. L'équipe de Kazuyuki Akasaka au Japon a largement étudié le devenir des protéines monomériques sous pression par RMN. Dans leur revue en 2004, les auteurs ont répertorié les études faites sur différentes protéines monomériques (RAS, lysozyme, apomyoglobine, prion, lactalbumine) (Kamatari, Kitahara, Yamada, Yokoyama, & Akasaka, 2004). Dans chaque cas, la RMN a permis de modéliser des états partiellement dépliés. La réversibilité de l'effet de la pression qui caractérise un système à l'équilibre permet d'obtenir les paramètres thermodynamiques. Le ΔV entre l'état natif et l'état déplié dépend de chaque protéine et se situe entre la dizaine jusqu'à la centaine de millilitres par moles (Akasaka, Kitahara, & Kamatari, 2013). Cette valeur est influencée par les paramètres physicochimiques (pH, température), par les mutations ponctuelles et par la forme (apo ou holo) de la protéine.

Pour parcourir les différents états entre l'état natif et déplié, il est possible de réaliser, souvent par RMN, des études cinétiques (P-jump) (Roche et al., 2013). Ces expériences permettent de suivre le repliement de la protéine en effectuant une montée rapide en pression puis en relâchant celle-ci. La montée en pression peuple rapidement les états de hautes énergies correspondant à un faible volume. En revenant à pression ambiante, il est possible de suivre la distribution des molécules entre les différents états jusqu'au retour à l'état initial (Figure 1.8, panneau inférieur).

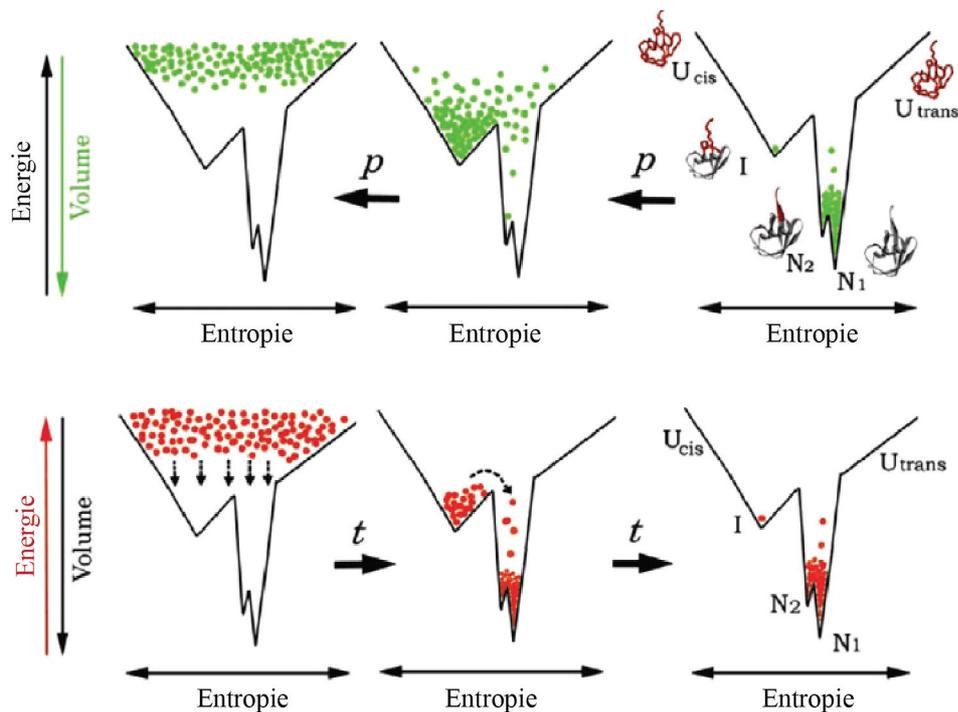


Figure 1.8. Changement dans la distribution des conformères induit par la pression. Changement dans la distribution des conformères induit par la pression (indiqué par des boules) dans des expériences d'équilibre (panneau supérieur) ou des expériences cinétiques (panneau inférieur). Les conformères indiqués sont ceux de l'ubiquitine déterminés expérimentalement. N1 et N2 représentent les états natifs, I un état intermédiaire, et U un état dénaturé. D'après (Akasaka et al., 2013).

Lors des expériences à l'équilibre, les mesures sont effectuées directement sous pression. Les intermédiaires capturés lors des expériences de cinétiques (ou P-jump) correspondent à ceux obtenus lors des expériences à l'équilibre pour l'ubiquitine (Akasaka et al., 2013) (Figure 1.8, panneau supérieur). Les états partiellement dépliés identifiés lors des expériences à l'équilibre reflètent le chemin de dépliement induit par la pression sur la protéine.

L'effet de la pression sur les cavités internes est considéré comme un agent majeur dans le processus de dépliement induit par la pression (Rouget et al., 2011). Les auteurs ont montré que les effets de la pression sur les cavités ne s'appliquent pas uniformément à l'ensemble de celles-ci mais concernent des zones spécifiques. Cette remarque a aussi été faite pour le comportement sous pression des cavités de la capsid du Cowpea Mosaic Virus (Girard et al., 2005). Les auteurs de l'étude de cette capsid ont déterminé qu'en moyenne les cavités voient leurs volumes diminués de 40 % à 330 MPa. Toutefois cette moyenne ne reflète pas l'évolution individuelle des cavités puisque certaines sont plus impactées alors que d'autres semblent pratiquement insensibles à la pression.

Le ΔV de dénaturation, c'est à dire la différence de volume entre l'état natif et l'état déplié, a été mesuré sur une même protéine sur laquelle des cavités de tailles différentes ont été induites par mutation ponctuelle (Roche et al., 2012). La formation de cavité non présente chez la protéine sauvage induit une augmentation du ΔV . Cependant, les auteurs ne mettent pas en évidence une proportionnalité entre les différences de taille des cavités et les variations mesurées de ΔV .

Les cavités jouent donc un rôle prépondérant dans la stabilité des protéines sous pression mais la résistance des protéines à la pression ne peut pas être discuté seulement sous cet angle. En effet, le virus CpMV maintient sa structure quaternaire jusqu'à 330 MPa, malgré des variations de volume détectées au niveau des cavités (Girard et al., 2005). C'est aussi le cas de la protéase géante TET (500 kDa) qui comporte de nombreuses cavités et ne subit aucun changement dans son édifice quaternaire sous une pression de 400 MPa et à une température de 90 °C (Rosenbaum et al., 2012).

Le changement dans l'hydratation des protéines est aussi souvent avancé pour expliquer les effets moléculaires de la pression. Des expériences de simulation ont montré que le nombre moyen de molécules d'eau par résidu augmentait de 0,7 à 1,2 quand la pression passait à 1 GPa, indiquant une augmentation de l'hydratation (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson, & Balny, 1996). L'entrée de molécules d'eau à l'intérieur de la protéine serait en lien avec la dénaturation du polymère (Hummer et al., 1998). Ce phénomène a pu être visualisé par cristallographie des rayons X (Collins, Hummer, Quillin, Matthews, & Gruner, 2005; Nagae et al., 2012). C'est le cas du mutant T4 du lysozyme. La mutation d'une leucine en alanine a créé une cavité de 150 Å³ environ (Collins et al., 2005). Les auteurs ont identifié une densité électronique résiduelle à l'intérieur de la cavité à 200 MPa. Ils ont associé cette densité à deux molécules d'eau. Cette observation a été confirmée par des expériences de dynamique moléculaire et plus récemment par RMN sous haute pression (Nucci, Fuglestad, Athanasoula, & Wand, 2014).

La stabilité d'une protéine sous pression est dépendante de la température. Détecter les variations de stabilité d'une protéine en fonction de la température et de la pression permet d'établir un diagramme de phase. Celui d'une protéine a en général une forme elliptique (Figure 1.9).

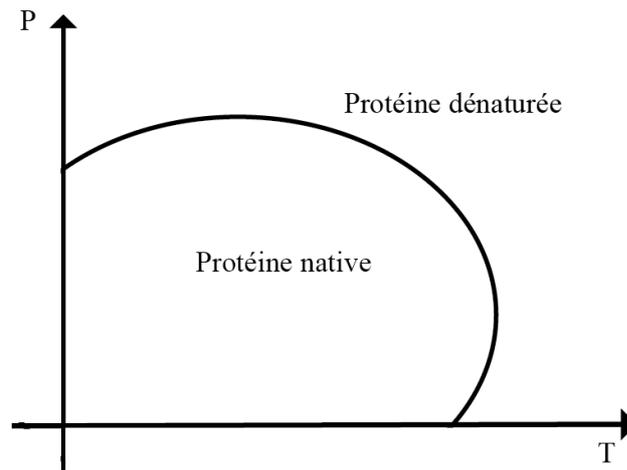


Figure 1.9. Diagramme de phase en fonction de la température et de la pression. D'après (Meersman, Smeller, & Heremans, 2006)

Le diagramme de phase comporte deux zones : à l'intérieur du cercle la protéine est sous forme native, à l'extérieur elle est sous forme dénaturée. Cette représentation implique un système bimodale, de l'état natif à l'état déplié (N→U) sans intermédiaires ou globule fondu (I ou MG). Il convient de noter qu'aux hautes températures, l'augmentation de la pression augmente la stabilité de la protéine.

En suivant le repliement de protéine en fonction de la pression et de la température, il a été montré que le repliement après un saut en pression (P-jump) était lent (de l'ordre de la ms) et réversible (Prigozhin et al., 2013). A l'inverse le repliement après un choc thermique est rapide (μ s) et conduit à de l'agrégation ou à la formation de feuillet β .

1.4.4.4. L'activité spécifique

La pression affecte l'activité spécifique d'une protéine en fonction du ΔV associé à la réaction. En obtenant les paramètres cinétiques à différentes pressions, il est possible d'obtenir la variation de volume associé à chacun d'entre eux (définition cf. chapitre 2). On peut alors définir le volume associé à la fixation du substrat, le ΔV_{K_m} et le volume d'activation associé à la constante catalytique, le $\Delta V_{k_{cat}}^\ddagger$ (Masson & Balny, 2005). Comme indiqué précédemment, la pression va favoriser les réactions ayant un volume associé négatif. Dans sa revue de 1981, Morild a répertorié le volume d'activation (ΔV^\ddagger) pour différents types d'enzymes. Certaines enzymes homologues répertoriées, comme les malate déshydrogénases, présentent

des valeurs de ΔV^\ddagger aussi bien positives que négatives. Dans le cas de l'enzyme citrate synthase, le ΔV^\ddagger peut varier de 8 à 175 ml.mol⁻¹ suivant l'organisme d'origine.

Dans le cas simple, les valeurs de ΔV_{K_m} et $\Delta V_{k_{cat}}^\ddagger$ sont constantes en fonction de la pression. Cependant, certaines enzymes ont une dépendance complexe vis-à-vis de la pression souvent de manière bi-modale. Plusieurs facteurs peuvent induire un changement dans les valeurs de ΔV : modification de la structure quaternaire de l'enzyme ou dénaturation, changement dans la compressibilité de l'enzyme ou changement de l'étape limitante de la réaction (Masson & Balny, 2005). Par exemple, l'activité de l'enzyme humaine butyrylcholinestérase (BChE) présente une relation non-linéaire avec la pression (sur une gamme de 0,1 à 150 MPa) vraisemblablement en lien avec un changement dans l'étape limitante de la réaction (Masson & Balny, 2005). A l'inverse, l'activité du lysozyme et de la thermolysine est linéaire jusqu'à 100 MPa, l'activité étant inhibée dans le cas du lysozyme alors qu'elle augmente dans le cas de la thermolysine (Gross et al., 1993). L'enzyme carboxypeptidase de *Sulfolobus solfataricus* qui présente des valeurs de ΔV_{K_m} et $\Delta V_{k_{cat}}^\ddagger$ constantes sur une large gamme de pression (0,1 -150 MPa) et de température (35-65 °C) a été choisie pour étudier le lien entre la nature du substrat et la valeur du ΔV (Occhipinti et al., 2006). Cette enzyme présente une large spécificité de substrats puisqu'elle est capable d'hydrolyser n'importe quel acide aminé bloqué en N-terminal (à l'exception de la proline). Ce travail est intéressant car, pour la première fois, les auteurs ont mesuré de manière exhaustive les paramètres cinétiques de différents substrats en faisant varier la pression et la température. Toutefois, les auteurs n'ont pas identifié de lien entre la variation du ΔV_{K_m} ou du $\Delta V_{k_{cat}}^\ddagger$ et les propriétés physicochimiques ou de volume des substrats. De plus, ils n'observent pas de relation entre la variation des paramètres thermodynamique liés à la pression (ΔV) et ceux liés à la température (ΔH). Cette observation rejoint le travail effectué sur la thermolysine et la vimelysin (Ikeuchi, Kunugi, & Oda, 2000).

1.4.5. Comportement des protéines issues d'organismes piézophiles

Après avoir détaillé l'effet général de la pression sur le processus catalytique, la question se pose de la réponse des enzymes provenant d'organismes des fonds marins. Des études comparatives d'enzymes homologues provenant d'organismes piézosensibles et piézophiles ont été réalisées afin d'étudier l'adaptation aux HPH.

La stabilité et l'activité sous pression des actines de poissons du genre *Coryphaenoides* d'espèces abyssales et non abyssales ont été comparées par l'équipe de Morita. Les auteurs ont mis en évidence un ΔV associé à la polymérisation de l'actine plus faible dans le cas des enzymes provenant de poissons des fonds marins que dans celles provenant de poissons de surface (Morita, 2003). De plus, l'activité DNase 1 et la fluorescence intrinsèque du tryptophane sont moins affectées dans le cas des actines provenant d'espèces abyssales. Les auteurs ont identifié des mutations ponctuelles pouvant expliquer les différences de comportement sous pression des actines. Ils proposent que les mutations Q137K et A155S, en diminuant le ΔV associé, empêcheraient la réaction de dissociation de l'ATP et du Ca^{2+} , qui n'est plus influencée par la pression. De plus, les mutations V54A et L67P réduiraient le changement de volume associé à la polymérisation de l'actine. Cependant, aucune caractérisation structurale et fonctionnelle de mutants n'a été réalisée pour confirmer ces hypothèses. Récemment, des expériences de dynamiques moléculaires semblent indiquer qu'une augmentation des ponts salins entre l'enzyme et l'ATP soit responsable de la stabilité accrue de cette interaction sous HPH chez les enzymes provenant d'organismes abyssaux (Wakai, Takemura, Morita, & Kitao, 2014). Il convient de noter que les mutations indiquées par les auteurs ne concernent pas une diminution du volume du résidu *per se*, mais peuvent avoir un effet positif sur le comportement de l'enzyme sous HPH.

Les lactate déshydrogénases (LDH) tétramériques de poisson du genre *Coryphaenoides* ont été largement étudiées du point de vue de l'adaptation à la température et à la pression (Johns & Somero, 2004; Somero, 1992). Les auteurs ont réalisé différentes incubations sous HPH puis ont comparé l'activité résiduelle de chacune des LDH en fonction du temps. Ils ont montré que la pression nécessaire pour inactiver les LDH correspond à la gamme de pressions rencontrées par les poissons dont elles proviennent ("Pressure inactivation of tetrameric lactate dehydrogenase homologues of confamilial deep-living fishes," 2014). Les auteurs émettent l'hypothèse que l'inactivation des LDH par les HPH est due à la dissociation réversible des LDH en monomères non actifs. Le ΔV associé à ce processus est constant pour les six LDH étudiées.

Une étude comparative similaire a été menée sur des LDH de myxines. Des mesures directes d'activité sous pression ont mis en évidence une perte d'activité dès 20 MPa de la LDH provenant d'espèces non abyssales de myxines alors que celle provenant des fonds marins maintient 70 % de son activité jusqu'à 100 MPa (Nishiguchi, Miwa, & Abe, 2008). Les auteurs ont poursuivi leurs travaux en étudiant la stabilité des LDH par électrophorèse capillaire sous pression. A 50 MPa, aucun changement n'est visible dans le cas de la LDH provenant de l'organisme des

fonds marins. Par contre, dans le cas de l'enzyme provenant de l'organisme de surface, la présence conjointe du monomère, dimère et tétramère est visible à 50 MPa. Cette dissociation est réversible (Nishiguchi, Abe, & Okada, 2011). Ainsi, à l'inverse des travaux sur les actines qui indiquaient une adaptation à la pression à travers la régulation de sa fonction, les études sur les LDH pointent vers une adaptation à travers la stabilité de l'édifice tétramérique.

Les études sur les dihydrofolate réductases (DHFR) provenant de *E. coli* et de bactéries psychrophiles du genre *Shewanella* ont été moins concluantes. En effet, l'enzyme provenant de la souche *S. benthica* DB6705 (6,356 m) ainsi que d'autres enzymes d'organismes piézosensibles sont inhibées par les HPH au même titre que l'enzyme provenant de *E. coli* (Murakami et al., 2011). A l'inverse, l'enzyme de la souche *S. benthica* DB21MT-2 (10,898 m) est activée à 100 MPa (Murakami et al., 2011) mais pas celle de piézophiles comme *Moritella profunda* (Hay et al., 2009) ou de *Photobacterium profundum* (Murakami et al., 2010). Les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence un lien clair entre le comportement sous pression des enzymes et celui des organismes d'origine. De plus, les auteurs n'ont pas exploré l'effet de la pression sur la stabilité de ces enzymes.

1.5. Choix des enzymes modèles pour étudier l'adaptation à la pression

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'ANR « Living deep ». Cette ANR vise à explorer les bases de l'adaptation à la HPH chez l'archée hyperthermophile et piézophile stricte *Pyrococcus yayanosii*. Cette archée isolée à 4100 m de profondeur sur le site Ashadze situé sur la dorsale medio atlantique. Cet organisme a une température optimale de croissance comprise entre 80 et 108 °C et une pression optimale de croissance située entre 20 et 120 MPa (Birrien et al., 2011; Zeng et al., 2009). Au sein du consortium, le groupe ELMA s'est focalisé sur les relations structure/adaptation à la HPH des protéines. Deux autres espèces de *Thermococcales* présentant des comportements sous pression différents ont été choisies pour enrichir l'étude initiale. *Pyrococcus furiosus*, isolé sur une plage à proximité de Naples en Italie, présente une gamme de croissance de 0,1 MPa à 30 MPa a été choisi comme référent surfacique (Fiala & Stetter, 1986). *Pyrococcus horikoshii*, isolé dans la fosse d'Okinawa dans l'océan Pacifique, présente une gamme de croissance de 0,1 MPa à 40 MPa (González et al., 1998). Cette espèce a été considérée comme intermédiaire par rapport aux deux autres. Les courbes de croissance de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* sont présentées figure 1.10.

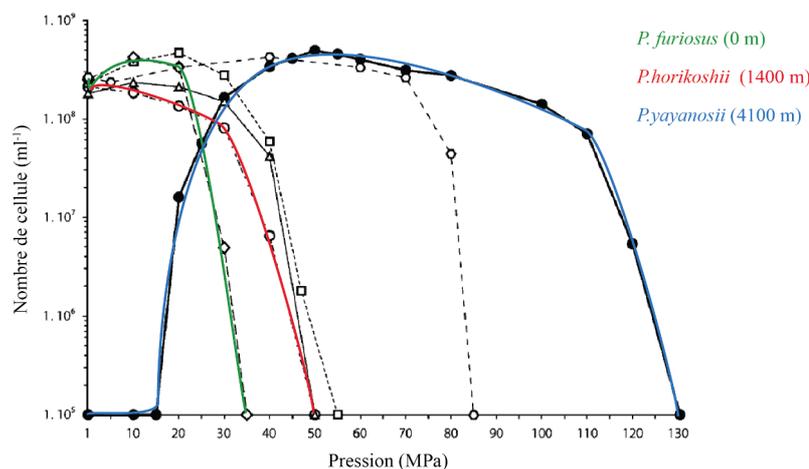


Figure 1.10. Croissance des *Thermococcales* sous hautes pressions hydrostatiques à température optimale (98 °C). *P. furiosus* (vert), *P. horikoshii* (rouge) et *P. yayanosii* (bleu). En plus des organismes choisis pour l'étude, les courbes de croissance de *P. glycovorans* (triangle), *P. abyssi* (carré) et *T. barophilus* (rond) sont aussi indiquées. D'après (Birrien et al., 2011; Zeng et al., 2009).

Au sein de l'équipe ELMA à l'IBS, l'étude des mécanismes moléculaires de l'adaptation des protéines a souvent utilisé les malate déshydrogénases (MDH) en

tant qu'enzyme modèle, en particulier pour étudier la thermoadaptation et l'haloadaptation (Coquelle, Fioravanti, Weik, Vellieux, & Madern, 2007; Madern & Zaccai, 1997). Les MDH présentent l'avantage d'avoir une activité spécifique facilement mesurable malgré les contraintes de mesure sous HPH (cf. chapitre 3). Malheureusement, le gène codant pour la MDH n'était pas présent dans le génome des *Thermococcales*, nous avons choisi une autre enzyme modèle présentant des caractéristiques compatibles avec les mesures d'activité spécifique sous pression.

Le choix s'est porté sur les glyoxylate hydroxypyruvate réductases (GRHPR) qui ont la particularité d'accepter deux substrats différents. Les GRHPR catalysent la réduction d'hydroxypyruvate en D-glycérate et du glyoxylate en glycolate. Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du cofacteur, NADH ou NADPH.

Pour élargir et enrichir l'étude des effets de pression sur les protéines, une seconde série d'études a été menée sur des MDH bactériennes tétramériques. Les MDH issues de 6 bactéries isolées à différentes profondeurs ont été choisies. Ces enzymes catalysent l'oxydation du malate en oxaloacétate en utilisant le NAD⁺ comme accepteur d'électrons. Nous avons choisi deux organismes isolés dans la Fosse des Mariannes, *Thermaerobacter marianensis* (Takai, Inoue, & Horikoshi, 1999) et *Geobacillus kaustophilus* (Takami, Nishi, Lu, Shimamura, & Takaki, 2004). Ces organismes, appartenant au phylum *Firmicutes*, sont des thermophiles (optimum de croissance de 60 °C pour *G. kaustophilus* et 75 °C pour *T. marianensis*). Nous avons choisi comme référents de surface : *Chloroflexus aurantiacus* (Pierson & Castenholz, 1974), *Pelotomaculum thermopropionicum* (Imachi et al., 2002) et *Thermaerobacter nagasakiensis* (Nunoura, Akihara, Takai, & Sako, 2002). Pour compléter l'étude, nous avons choisi *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Nazina, Ivanova, Kanchaveli, & Rozanova, 1988) qui a été isolé à une profondeur intermédiaire (-3000 mètres).

1.6. Objectifs du travail de recherche

L'objectif de ma thèse est de voir si, au même titre que la température ou la forte salinité pour lesquelles le phénomène adaptatif est bien documenté, on retrouve des mutations spécifiques, identifiables dans les séquences d'enzymes abyssales par rapport aux surfaciques, qui auraient été sélectionnées face à une contrainte induite par les HPH.

- CHAPITRE 3 : Méthodologie et développement des instruments sous haute pression hydrostatique

L'étude intégrative de protéine combinant biochimie, enzymologie et biologie structurale a nécessité le développement et l'optimisation d'instruments dédiés aux mesures sous haute pression. Durant ma thèse, j'ai utilisé les instruments disponibles sur la plateforme Haute Pression à l'IBS. J'ai été formée à leur utilisation, leur maintenance et j'ai mené des améliorations notamment dans le cadre du système de gestion de la qualité (certification ISO9001).

- CHAPITRE 4 : Etude structurale et fonctionnelle à pression ambiante des glyoxylate hydroxypyruvate réductases (GRHPR): rôle dans le métabolisme et mode d'action

Avant de commencer la caractérisation des propriétés spécifique et structurales des GRHPR sous HPH, nous avons voulu vérifier s'il existait des différences entre ces enzymes détectables à pression ambiante. Pour répondre à cette question, j'ai obtenu les paramètres cinétiques de chaque enzyme avec les quatre combinaisons de substrat et cofacteurs (hydroxypyruvate, glyoxylate, NADH et NADPH). Ces données ont été corrélées avec les observations faites sur les structures obtenues par cristallographie des rayons X à 100 K.

- CHAPITRE 5 : Etude comparative des effets de pression sur les glyoxylate hydroxypyruvate réductases provenant de archées isolées à diverses profondeurs

J'ai ensuite analysé le comportement spécifique sous pression des enzymes de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* à différentes températures. Afin de sonder les effets de la pression sur les différents types de substrats et cofacteurs, l'ensemble des 4 combinaisons de substrats et cofacteurs ont été étudiés sous

pression (hydroxypyruvate, glyoxylate, NADH et NADPH). Parallèlement, une étude structurale cristallographique sous haute pression (HPMX) a été menée. Cette étude a été réalisée grâce à une cellule enclume diamant (chapitre 3). La comparaison des structures obtenues à pression ambiante et à haute pression de PfuGRHPR et PyaGRHPR ont permis de comprendre la dynamique de ces structures sous pression.

- CHAPITRE 6 : Etude comparative des effets de la pression sur les malate déshydrogénases provenant de bactéries isolées à diverses profondeurs

Afin de comparer les résultats obtenus précédemment avec les GRHPR, nous avons étudié le comportement spécifique de 6 MDH de bactéries sous HPH. De plus, ces enzymes provenaient de différents clades permettant de sonder les répercussions de l'effet potentiel de l'adaptation à la pression sur l'ensemble d'un phylum. En outre, grâce au caractère thermophiles de ces enzymes, nous avons pu sonder la relation pression-température sur une large gamme de pression (0,1-400 MPa et de température (10-80 °C). Ce travail est présenté dans le chapitre 6 :

Pour effectuer une (grande) partie des caractérisations spécifiques des enzymes étudiées, ainsi qu'une partie de la détermination structurale de 3 MDH, j'ai eu la chance de bénéficier de l'aide précieuse de Sylvain Engilberge, qui a effectué, au sein du groupe, ses stages de M1 et M2 sur ma thématique de thèse. Son apport a largement contribué à l'aboutissement du travail présenté dans ce manuscrit.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

2.1. Production des protéines

2.1.1. Expression des protéines

Pour surexprimer les protéines d'intérêt, des cellules compétentes d'*Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3)RIL sont transformées avec un plasmide Pet41 contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt. Les cellules transformées sont déposées sur boîte de pétri dans laquelle est coulé du milieu de culture (pour 1 L de milieu : 32 g de LB agar (Invitrogen) en poudre, eau milliQ q.s.p et autoclavage) enrichi avec 50 μ M d'ampicilline et laissé sur la nuit à 37 °C dans un incubateur à sec.

Lors de la première expression, la pré-culture est préparée en plaçant une colonie repiqué de la culture sur boîte de pétri dans 50 ml de milieu LB (pour 1 l de milieu : 20 g de LB (Sigma) en poudre, eau MilliQ q.s.p et autoclavage) enrichi avec 50 μ M d'ampicilline. Après une nuit sous agitation à 180 rpm à 37 °C, chaque litre de culture de milieu LB enrichi en ampicilline est inoculé avec 10 ml de pré-culture. Pour préparer un stock de cellules conservé à -80 °C, 500 μ M de pré-culture sont homogénéisés avec 500 μ M de glycérol 60 % v/v stérile. Lorsque la densité optique (DO) de la culture atteint 0,6 à 0,8, l'expression protéique est induite avec une concentration finale de 50 μ M d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). La culture est à nouveau mise en incubateur pendant 4 h à 37 °C sous agitation à 180 rpm. Le volume de culture est ensuite centrifugé à 3 500 g pendant 15 min à 4 °C. Les culots bactériens sont resuspendus avec du tampon de lyse (50 ml de 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 8) et conservés systématiquement dans des tubes de 50 ml à -80 °C.

2.1.2. Purification

Après décongélation dans la glace et après ajout d'un volume de 500 μ l d'une solution contenant 0,25 mg/ml lysozyme (Euromedex), 0,05 mg/ml DNase (Roche), 0,2 mg/ml RNase (Roche), 1 comprimé de cocktail de protéases « Complete » (Roche) et 500 μ l de MgSO₄ à 2 M, les lysats cellulaires sont soumis aux ultrasons 3 fois pendant 30 s avec des pauses de 30 s dans la glace.

Les protéines étudiées durant cette thèse proviennent d'organismes thermophiles ou hyperthermophiles. En plus de favoriser l'expression chez *E. coli*, cette caractéristique est mise à profit par l'utilisation d'un choc thermique comme première étape de purification. Ce choc thermique consiste à incuber l'extrait cellulaire durant 15 min à haute température. La température requise pour chaque protéine est choisie en se basant sur la température optimale de l'organisme d'origine. Ensuite, la température du choc thermique est ajustée afin d'obtenir le meilleur ratio entre un rendement maximum et l'élimination d'un maximum de protéines contaminantes provenant de *E. coli* (Tableau 2.1). Les protéines dénaturées par le choc thermique sont séparées des protéines solubles par une centrifugation à 17 400 g pendant 45 min à 4 °C.

	Température du choc thermique (°C)
CauMDH	60
PthMDH	60
TnaMDH	70
DkuMDH	70
TmaMDH	80
GkaMDH	60
PfuGRHPR	85
PhoGRHPR	85
PyagrHPR	85

Tableau 2.1. Température du choc thermique pour l'ensemble des MDH et GRHPR étudiées au cours de cette thèse

Les MDH et les GRHPR ont en commun l'emploi du NAD(H) lors du processus catalytique. Cette caractéristique est elle aussi mise à profit dans le protocole de purification. En effet, nous utilisons une colonne Blue sépharose (GE Healthcare) dont le ligand Cibacron Blue F3G-A interagit avec les protéines possédant le repliement de type « dinucléotide (comme les enzymes NADH et NADPH dépendantes). En plus de fixer la protéine d'intérêt, ce type de colonne permet d'éliminer l'ADN dans les fractions de lavage alors que celui-ci interagit avec une colonne échangeuse d'ions. La protéine est éluée par 1 M de NaCl durant 30 ml. Les fractions présentant de l'activité MDH ou GRHPR sont concentrées.

Lorsque le choc thermique est réalisé à une température inférieure à 80 °C, il est souvent utile de réaliser une seconde étape de purification. De fait, cette partie ne concerne que les MDH. Dans ce cas, une colonne échangeuse d'ion forte est utilisée comme étape

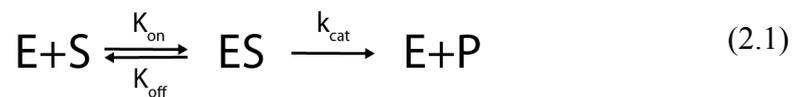
intermédiaire (RessourceQ, GE Healthcare). L'échantillon est préalablement dessalé avec un tampon A (Tris 20 mM, pH=7,5) par des étapes de concentration/dilution successives dans des concentrateurs avec un seuil de rétention de 30 kDa (Vivaspin). Après équilibration de la colonne par 85 % de tampon A et 10 % de tampon B (Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH=7,5), l'échantillon est déposé sur la colonne. L'élution commence, après 20 ml de lavage, par un gradient de sel sur 170 ml jusqu'à 500 mM de NaCl. Les fractions présentant de l'activité MDH sont concentrées jusqu'à 10 mg/ml.

La dernière étape de purification est effectuée sur une colonne d'exclusion de taille (Superose 12, GE Healthcare) équilibrée préalablement par un tampon GF (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH=7,5). La pureté finale de l'échantillon est vérifiée sur gel d'acrylamide 12 % avec révélation au bleu de Coomassie et confirmée par spectrométrie de masse sur la plateforme Spectrométrie de masse de l'IBS. Lorsque la pureté est supérieure à 99 %, nous avons utilisé la technique de la mesure d'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de chaque enzyme a été déterminé à partir de la séquence protéique par le logiciel PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam>).

2.2. Enzymologie

2.2.1. Théorie enzymologie

Pour caractériser le fonctionnement d'une enzyme, on mesure la quantité de produit apparu en fonction du temps. L'équation de Briggs et Haldane permet de décrire les différentes étapes de la réaction (Briggs & Haldane, 1925):



Dans cette équation, l'enzyme E et le substrat S interagissent pour former le complexe ES. Cette étape est réversible et caractérisée par les constantes de vitesse k_{on} et k_{off} . Le substrat est ensuite transformé en produit P et relargué avec une constante de vitesse k_{cat} . Les concentrations sont en molaires, les constantes de vitesse en s^{-1} pour k_{off} et k_{cat} , et en $M.s^{-1}$ pour k_{on} .

Au début de la réaction, un état stationnaire se forme rapidement et la concentration du complexe EA reste constante en fonction du temps ($d(EA)/dt = 0$). Cette approximation peut être appliquée lorsque peu de substrat a été transformé, c'est à dire dans des conditions de vitesses initiales.

Il est ainsi possible d'obtenir l'équation suivante qui définit la vitesse de réaction :

$$v = k_{\text{cat}}[ES] = \frac{k_{\text{cat}}[E_T][S]}{\left(\frac{k_{\text{off}} + k_{\text{cat}}}{k_{\text{on}}}\right) + [S]} \quad (2.2)$$

Pour obtenir l'équation familière de Michaelis et Menten, il suffit d'effectuer quelques substitutions. V_{max} représente la vitesse de réaction lorsque le substrat est en quantité saturante et que $[ES]=[E_T]$:

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E_T] \quad (2.3)$$

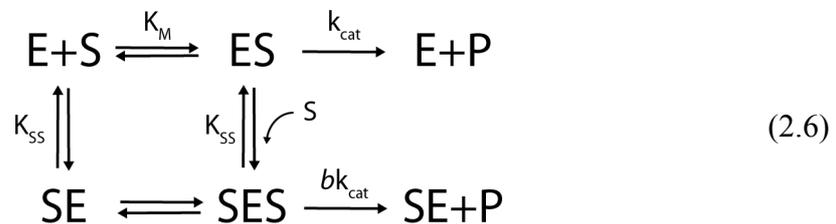
et le K_M est défini en fonction des constantes de vitesse :

$$K_M = \frac{k_{off} + k_{cat}}{k_{on}} \quad (2.4)$$

Nous obtenons l'équation de Michaelis et Menten :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.5)$$

Dans certains cas, l'excès de substrat provoque une diminution de la vitesse de réaction en formant un complexe enzyme-substrat inactif.



Le complexe enzyme substrat inactif peut être formé d'une ou deux molécules de substrats. Dans le cas des MDH comme des GRHPR, le mécanisme d'inhibition par le substrat n'est pas connu. A ce jour, aucun second site de fixation du substrat n'a été mis à jour. Dans le cadre de cette étude, nous avons considéré que le facteur b était égale à 0, c'est à dire que le complexe SES est complètement inactif. La constante K_{SS} définit la constante d'inhibition.

Lorsqu'une inhibition par excès de substrat est détectée, les paramètres cinétiques sont déterminés par l'équation suivante :

$$v = \frac{k_{cat} [S]}{[S] + K_M} \times \frac{1}{1 + \frac{[S]}{K_{SS}}} \quad (2.7)$$

En plus de mesurer les variations d'activité en fonction du substrat et d'obtenir des paramètres cinétiques, il est aussi possible de mesurer les variations d'activité en fonction de la température et de la pression.

Pour évaluer l'augmentation d'activité en fonction de la température, nous avons choisi le paramètre Q_{10} , c'est à dire la variation d'activité pour 10 °C.

$$Q_{10} = \left(\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \quad (2.8)$$

La relation exponentielle entre la vitesse de réaction et la température montre que pour une augmentation linéaire de la température, la vitesse de réaction sera multipliée par un facteur donné. Le Q_{10} est plus élevé pour des réactions non spécifiques, avec des valeurs de l'ordre de 3 à 4, que pour des réactions spécifiques pour lesquelles la valeur de Q_{10} est autour de 2 (Elias et al. 2014).

Pour quantifier l'augmentation d'activité observée sous HPH et effectuer des comparaisons entre enzymes, nous avons défini un nouveau paramètre. Le P_{100} correspond à la variation d'activité pour 100 MPa suivant l'équation ci dessous.

$$P_{100} = \left(\frac{k_{P_2}}{k_{P_1}} \right)^{\frac{100}{P_1 - P_2}} \quad (2.9)$$

La valeur de 100 MPa a été choisie de manière arbitraire. Cette pression se situe dans la gamme de pression physiologique. De plus, il est possible d'atteindre 3 à 4 fois cette pression avec les instruments dont on dispose. Si on avait voulu déterminer un coefficient de pression équivalent en terme d'énergie au Q_{10} , en se basant sur des expériences réalisées avec de l'eau pure, nous aurions choisi 800 MPa (Rivalain, Roquain, & Demazeau, 2010).

2.2.2. Conditions expérimentales

Les travaux réalisés au cours de ma thèse sur l'étude de l'activité des enzymes reposent sur le suivi de la diminution de l'absorbance des cofacteurs, NADH ou NADPH, en fonction du temps. En effet, ces deux molécules ont la propriété d'absorber la lumière à 340 nm lorsqu'elles sont protonées. Durant la catalyse, chaque cofacteur déprotoné correspond à un substrat transformé. Ainsi, par calcul de la quantité de cofacteur réduit au cours de la réaction par la loi de Beer Lambert, nous pouvons déterminer la quantité de substrat utilisé :

$$A = C \times l \times \xi \quad (2.10)$$

où A pour l'absorbance, C la concentration exprimée en molaire, l le trajet optique exprimé en cm (avec une valeur de 1 cm sur les instruments utilisés au cours de cette thèse) et ξ correspondant à l'épsilon molaire de la molécule exprimé $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ avec une valeur de $6\ 220\ mol^{-1}\cdot cm^{-1}$ pour les molécules de NADH et NADPH.

La valeur enregistrée par le spectrophotomètre est une absorbance en fonction du temps (t). Il est possible d'obtenir la quantité de cofacteur transformée en utilisant la loi de Beer Lambert (équation 2.12). Dans des conditions de vitesse initiale, c'est à dire quand la vitesse reste constante, la quantité de substrat transformé en fonction du temps correspond à la vitesse de réaction. Cette valeur est normalisée par la quantité d'enzyme afin d'obtenir l'activité spécifique et ainsi comparer différentes conditions et différentes enzymes.

Les mesures conventionnelles d'activité spécifique ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Jasco V-630. Ce spectrophotomètre possède une agitation magnétique interne et un régulateur de température par effet Peltier, avec une gamme de 10 à 100 °C. En plus de la régulation propre de l'instrument, la température est vérifiée dans la cuve de mesure après l'expérience grâce à un thermocouple calibré.

Lors des mesures, un volume de 500 μl de tampon est pré-incubé à la température voulue. Ensuite, nous ajoutons dans la cuve et dans l'ordre suivant, le cofacteur, l'enzyme et le substrat. Le volume ajouté dépend des conditions expérimentales mais est toujours compris entre 5 et 30 μl (1-6 % du volume total dans la cuve). Le volume des composants de la réaction est négligeable par rapport au volume du tampon et ne fait pas varier la température ou le pH de la solution. La mesure est réalisée sous agitation (400 rpm). Pour chaque condition expérimentale, la cinétique du cofacteur seul est déterminée et utilisée pour corriger la mesure obtenue avec l'enzyme et le substrat. Il est à noter que le NAD(P)H est très sensible au pH acide (inférieur à 6,5). L'ensemble des mesures a été réalisé à un pH=8 à l'exception des mesures pour déterminer le pH optimum (gamme de 6,5 à 10).

Le protocole pour les mesures effectuées sous pression est décrit dans le chapitre 3.

2.3. Détermination des structures de protéines par cristallographie des rayons X

Une partie de ce travail de thèse repose sur l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines. Pour connaître la position des atomes d'une protéine dans l'espace, plusieurs méthodes sont possibles. Nous nous sommes focalisés sur la détermination de structures par cristallographie des rayons X largement utilisée notamment dans le cas de protéines dont la masse molaire excède la taille limite (> 40 kDa) pour permettre l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN). La cristallographie des rayons X repose sur l'interaction des électrons des atomes constituant l'échantillon avec les rayons X. Le signal est amplifié par l'organisation périodique dans l'espace de la protéine au sein d'un cristal. Le motif cristallin est la répétition périodique de la maille élémentaire dans les trois directions de l'espace.

2.3.1. Obtention d'un cristal de protéine

Le facteur limitant lors d'une étude structurale par cristallographie des rayons X reste, en général, l'obtention d'un cristal de protéine de bonne qualité. Les conditions permettant d'obtenir un cristal doivent être déterminées de manière empirique. Nous avons accès à la plateforme de criblage automatisé HTX lab de l'EMBL à Grenoble disposant d'un robot de cristallisation nanogoutte. A partir de $80 \mu\text{l}$ de solution de protéine, il est possible de tester 576 conditions de cristallisation différentes. La visualisation des gouttes obtenues permet d'identifier les conditions prometteuses qui sont ensuite reproduites et améliorées manuellement. Pour améliorer les cristaux, je me suis basé sur leur faciès. J'ai privilégié les cristaux les plus volumineux, avec des arrêtes bien dessinées et monocristallins.

Sur les lignes de lumière de cristallographie de macromolécules (MX), l'enregistrement de données de diffraction est réalisé à une température de 100 K afin de diminuer les dommages dus à l'irradiation par les rayons X. Pour éviter que le solvant contenu dans le cristal ne forme de la glace qui donne un signal de diffraction plus intense que la protéine et endommage les cristaux, on utilise des solutions de cryo-protectants (PEG 400, l'éthylène glycol, le glycérol, l'huile de paraffine, la paratone...). Le choix du meilleur cryo-protectant se fait de manière empirique en variant la concentration, le temps d'incubation ou en combinant différents cryo-protectants.

2.3.2. Diffraction des rayons X par un cristal

La position des atomes dans la maille cristalline est définie par les coordonnées (xyz). C'est l'espace dit objet ou réseau direct. L'espace réciproque (espace image) correspond au réseau formé par les taches de diffraction et se définit par les coordonnées (hkl), avec h, k et l entiers.

La relation entre ces deux réseaux s'établit selon les relations suivantes (équations de Laue) :

$$a \cdot S = h \quad b \cdot S = k \quad c \cdot S = l \quad (2.11)$$

où S est le vecteur de diffusion c'est à dire le vecteur différence entre le vecteur d'onde du rayon diffracté et le vecteur d'onde du rayon incident. Il définit la direction de la diffraction.

La condition de diffraction peut être exprimée par la loi de Bragg. Un cristal contient une infinité de plans dans lesquels les atomes sont arrangés périodiquement : ce sont les plans réticulaires. Ces plans sont définis par des indices h, k et l appelés indices de Miller. A chaque famille de plans du cristal correspond une réflexion (hkl) dans le réseau réciproque (tache de diffraction). La loi de Bragg est définie par la relation :

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (2.12)$$

où d_{hkl} est la distance inter-réticulaire, θ est l'angle entre la direction du faisceau incident et la famille de plans réticulaires et λ la longueur d'onde du faisceau incident.

A chaque réflexion (hkl) est associé un facteur de structure F_{hkl} qui est relié à la nature des atomes, à travers le facteur de diffusion atomique f_j et à la position (xyz) des atomes j dans la maille du réseau direct, et qui décrit l'onde diffractée en amplitude, $|F_{hkl}|$, et en phase φ_{hkl} . Le facteur de structure décrit ainsi la contribution de l'ensemble des atomes, à travers leurs électrons, à la diffraction.

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} = \sum_{j=1}^N f_j e^{[2i\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]} \quad (2.13)$$

Chaque amplitude diffractée par le cristal est la somme de toutes les amplitudes diffusées par chaque électron dans le cristal. Il existe alors une relation mathématique, la transformée de Fourier, entre les amplitudes diffractées, c'est-à-dire les facteurs de structure F_{hkl} dans le réseau réciproque et la distribution de la densité électronique du cristal $\rho(xyz)$ dans le réseau direct :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2i\pi(hx+ky+lz)} \quad (2.14)$$

La densité électronique est ainsi la transformée de Fourier inverse des facteurs de structure ou synthèse de Fourier.

Lors de l'enregistrement d'un cliché de diffraction, l'information de phase est perdue. Il est impossible de déterminer la structure à partir des seules données de diffraction. En effet l'expérience ne nous permet d'accéder qu'à l'intensité de chaque tâche de diffraction, intensité qui correspond au carré du module du facteur de structure :

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2 \quad (2.15)$$

Pour reconstruire l'ensemble de l'espace réciproque, il est nécessaire d'enregistrer des clichés de diffraction à différents degrés de rotation jusqu'à obtenir un jeu de données complet. Pour résoudre le problème de phase et calculer la densité électronique en chaque point de l'espace permettant de reconstruire le modèle de l'objet d'intérêt il existe plusieurs méthodes.

Le remplacement moléculaire est la méthode la plus couramment utilisée. Elle nécessite l'enregistrement d'un seul jeu natif. L'information de phase est obtenue à partir d'un modèle présentant une forte identité de séquence (supérieure à 30 %) avec la protéine dont on veut déterminer la structure. Le modèle peut correspondre à l'ensemble ou à une partie de la structure recherchée. Cette méthode est soumise à la contrainte d'avoir un modèle adéquat. De plus, elle introduit un biais dans la reconstruction de la structure qui peut être difficilement supprimé au cours de l'affinement. En effet, l'information de phase est prépondérante dans le calcul de la synthèse de Fourier et reflétera donc plus ou moins le modèle initial. Ce biais peut être réduit en choisissant d'enlever les chaînes latérales du modèle. Nous verrons aussi dans ce manuscrit qu'une différence dans la proportion de solvant ainsi que dans la disposition des monomères dans l'unité asymétrique peut faire échouer un remplacement moléculaire (cf. 6.2.4.2).

L'autre manière de résoudre le problème de phase est d'utiliser les méthodes dites *de novo*. Ces méthodes se basent sur l'incorporation d'atomes lourds (contenant donc un grand numéro d'électrons) dans le cristal de protéine. L'idée est donc d'introduire une sous-structure (les atomes lourds) au sein de la protéine et d'en déterminer la position dans l'espace permettant d'avoir une première série de modules et de phases pour les facteurs de structure. Les atomes lourds interagissent fortement avec les rayons X et leurs intensités diffractées par le cristal diffèrent significativement de ceux constituant la protéine. Il est possible de déterminer les coordonnées des atomes lourds à partir des cartes de différences de Patterson. Il est ainsi possible de reconstruire les phases des atomes lourds et d'en déduire les phases de

la protéine. Les méthodes *de novo* sont cruciales dans la découverte de nouvelles familles de protéines.

Les méthodes *de novo* les plus anciennes sont les méthodes de remplacement isomorphe (Single Isomorphous Replacement et Multiple Isomorphous Replacement). Dans ce cas, on compare des jeux de données obtenus avec un cristal natif (sans sous-structure) et un ou plusieurs cristaux dérivés auxquels on a ajouté des atomes lourds (une ou plusieurs sous-structures différentes). Les cristaux dérivés et natifs doivent être isomorphes. En effet, pour déterminer les phases de la protéine, il faut pouvoir soustraire celles des atomes lourds selon la relation vectorielle ci-dessous :

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (2.16)$$

où F_P , F_{PH} et F_H sont les facteurs de structure du cristal natif, du cristal dérivé et de la sous-structure des atomes lourds dans le cristal dérivé, respectivement.

En utilisant un seul cristal dérivé (SIR), on obtient le facteur de structure F_H qui donne deux solutions possibles pour F_P . Pour obtenir les phases sans ambiguïté, on peut utiliser plusieurs cristaux dérivés (MIR).

D'autres méthodes existent qui s'affranchissent du problème d'isomorphisme en se basant sur un seul cristal (SAD et MAD). Ces méthodes se basent sur le fait que certains atomes lourds réagissent différemment en fonction de la longueur d'onde (phénomène de résonance). En changeant de longueur d'onde, il est donc possible de mimer un remplacement isomorphe.

2.3.3. Traitement des données de diffraction

Je décris par la suite le protocole que j'ai utilisé durant ma thèse.

Un jeu de données est constitué d'un ensemble de clichés de diffraction. Pour déterminer les intensités I_{hkl} correspondant à chacune des réflexions, nous utilisons le logiciel XDS (Kabsch, 2010) qui est composé de différentes routines. Dans un premier temps, il convient de déterminer l'orientation du cristal, d'attribuer à chacune des réflexions un indice de Miller (hkl) et de déterminer les paramètres de la maille cristalline. Cette indexation est principalement effectuée au cours de la routine IDXREF en s'appuyant sur les taches de diffraction les plus intenses et permet d'avoir une première indication de la symétrie du cristal (réseau de Bravais). Dans un second temps, l'intégration des données de diffraction est réalisée par la routine INTEGRATE. L'intégration consiste à prédire la position des taches de diffraction, en se basant sur les paramètres déterminés à l'étape précédente, et à estimer la valeur de l'intensité correspondante, I_{hkl} , ainsi que l'écart type associé σ_{hkl} . Enfin, une mise

à l'échelle est réalisée par la routine CORRECT et permet d'obtenir une liste de réflexions avec leur intensité moyenne et corrigée en tenant compte des réflexions équivalentes (de part les symétries associées au groupe d'espace ou de part les réflexions mesurées plusieurs fois). CORRECT fournit aussi une première proposition de groupe d'espace possible.

A la fin de cette étape, un ensemble de statistiques est obtenue par tranche de résolution et par groupe d'images. Le choix de la résolution optimale se fait en prenant en compte du rapport signal/bruit, I/σ et de divers indicateurs tels que le R_{sym} ou le $CC_{1/2}$ (Karplus & Diederichs, 2012). Il est possible d'exclure les images qui détériorent les statistiques sans améliorer la complétude. L'ensemble de ces étapes est répété plusieurs fois jusqu'à affinement des paramètres cristallins et expérimentaux.

Le groupe d'espace est vérifié ensuite par POINTLESS, de la suite CCP4 (Winn et al., 2011), et XTRIAGE, de la suite PHENIX (McCoy et al., 2007).

Pour calculer les amplitudes des facteurs de structure à partir des intensités, nous utilisons un ensemble de logiciels : COMBAT (Zwart, 2005) et SORTMTZ, pour convertir au format adéquat, SCALA pour la mise à l'échelle et TRUNCATE pour obtenir les amplitudes. Les programmes SCALA et TRUNCATE calculent des indicateurs statistiques qui permettent de justifier de la qualité des données cristallographiques. Ils sont ici consignés :

- Le rapport signal sur bruit

$$\frac{I}{\sigma(I)} \quad (2.17)$$

- La redondance des données : nombre de fois qu'une réflexion unique est enregistrée.
- Complétude : nombre de réflexions mesurées par rapport aux réflexions théoriques. Les réflexions manquantes affectent la carte de densité électronique.
- $CC_{1/2}$: coefficient de corrélation. Le jeu de données est séparé en deux de manières aléatoires. Le $CC_{1/2}$ reflète la corrélation entre les deux. Ce paramètre estime la proportion de signal sur bruit qui contribue à la variation des données (Diederichs & Karplus, 2013).
- R_{sym} : indique l'accord entre les intensités équivalentes par symétrie et leur moyenne.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle} \quad (2.18)$$

- R_{pim} : tient en compte la redondance des données.

$$R_{pim} = \frac{\sum_{hkl} \left[\frac{1}{(N-1)} \right] \sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle} \quad (2.19)$$

Pour définir la résolution maximale d'un jeu de données, nous nous sommes basés essentiellement sur les indicateurs $\frac{I}{\sigma(I)}$ et $CC_{1/2}$ en choisissant un seuil de 2 et 0.5 respectivement. Nous avons aussi vérifié que la complétude soit la plus grande possible pour cette résolution (>90 %).

A la fin de cette étape, le fichier au format mtz produit par TRUNCATE est utilisé pour vérifier la qualité des données (présence de macles, présence de pseudo-symétrie de translation) et le groupe d'espace. Nous calculons le coefficient de Matthews à partir du programme disponible dans la suite CCP4 (Kantardjieff & Rupp, 2003) pour avoir une estimation de la composition de l'unité asymétrique. Le programme considère que le choix le plus probable est celui correspondant à 50 % de solvant dans le cristal. L'utilisateur se base ensuite sur sa connaissance de la biologie de la molécule pour faire son choix. Le choix du nombre de monomère dans l'unité asymétrique impacte le résultat du phasage. Comme pour le groupe d'espace, on ne connaît avec certitude le nombre de monomère dans l'unité asymétrique que lors du premier tour d'affinement.

Dans le cas de la méthode de phasage par remplacement moléculaire, la première étape est le choix du modèle. Dans notre cas, nous avons eu à notre disposition un ensemble de modèle avec des identités de séquences élevées (> 60%). Pour éliminer le maximum de biais lors du phasage, nous avons éliminé les chaînes latérales et les molécules du solvant du fichier pdb modèle. En général, on choisit un monomère comme modèle. Le logiciel PHASER (McCoy et al., 2007), de la suite CCP4, a été choisi dans la majorité des déterminations de structures par remplacement moléculaire effectuées. Les paramètres ajustés selon les protéines étaient les suivants :

- nombres de molécules présentes dans l'unité asymétrique
- La proportion de solvant
- le groupe d'espace et les énantiomorphes.

PHASER produit des indicateurs statistiques afin de juger de la qualité du phasage. Le gain du logarithme de maximum de vraisemblance global (LLG) et les Z-scores des fonctions de rotation (RTZ) et de translation (TFZ). PHASER considère une solution valable si elle possède un LLG supérieur à 16. En dehors de ces indicateurs, la meilleure façon de se rendre compte de la qualité de la détermination des phases reste de visualiser la carte de densité

électronique. A haute résolution, l'ambiguïté est très faible et si le phasage est réussi, on peut quasiment reconnaître les acides aminés aromatiques. Pour des résolutions plus basses, on doit pouvoir distinguer entre la partie solvant/protéine. Les hélices α et les feuilletts β doivent aussi être clairement distinguables.

Dans le cas de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter nagasakiensis* (cf. 6.2.4.2), le phasage a été réalisé avec la suite BALBES (Long, Vagin, Young, & Murshudov, 2008). Il s'agit d'un programme de remplacement moléculaire automatique qui prend en charge la recherche des meilleurs modèles de départ dans la Protein Data Bank à partir d'une séquence, la construction du modèle, le phasage avec le logiciel MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) et enfin, l'amélioration des phases et l'affinement avec le logiciel REFMAC (Murshudov, Vagin, & Dodson, 1997).

Pour reconstruire le modèle, on effectue en premier lieu une étape de nivellement par le solvant en utilisant le programme DM (Cowtan & Zhang, 1999), de la suite CCP4. Le programme définit un masque qui délimite la différence entre protéine et solvant dans la maille. Le pourcentage de solvant est déterminant à cette étape. La densité électronique du solvant est modifiée pour devenir uniforme. Ensuite, le programme BUCCANEER (Cowtan, 2006) reconstruit le modèle à partir de la carte de densité électronique améliorée et de la séquence primaire de la protéine. En général, BUCCANEER reconstruit un modèle partiel. La reconstruction totale du modèle est ensuite effectuée manuellement à l'aide du logiciel COOT (Emsley, Lohkamp, Scott, & Cowtan, 2010). Lorsque la basse résolution ne permettait pas une reconstruction automatique du modèle initial par l'utilisation de BUCCANEER, le modèle produit par PHASER a été utilisé comme point de départ à la construction manuelle dans COOT.

L'étape finale de la détermination d'une structure est l'affinement du modèle. C'est l'étape qui demande le plus grand investissement de la part du cristallographe. En effet, elle consiste à effectuer des cycles d'affinement, réalisés à l'aide du logiciel PHENIX (en particulier le module phenix.refine) (Adams et al., 2010), et des cycles de reconstruction dans COOT. Le but de cette étape est de réduire l'écart entre les facteurs de structures observés et ceux calculés à partir du modèle. Autrement dit, on cherche à ce que le modèle construit interprète au mieux la carte de densité électronique. Pour vérifier la qualité de l'affinement, nous disposons de deux indicateurs statistiques, le R_{factor} et le R_{free} .

$$R_{factor} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad (2.20)$$

Le R_{free} est calculé à partir d'un échantillon de réflexions (5%) non utilisées au cours de l'affinement. Idéalement, l'écart entre ces deux indicateurs doit être de l'ordre de 2 à 5 %.

Le programme PHENIX dispose d'un nombre élevé de paramètres influençant l'affinement. Les tours d'affinements se suivent mais ne se ressemblent pas. Nous décrivons ici le protocole d'un affinement standard. Entre chaque affinement, le modèle est vérifié dans COOT.

Premier tour d'affinement : affinement par corps rigides (rigid body), recuit simulé (simulated annealing), affinement des positions des atomes et des facteurs d'agitation thermique.

Positionnement des ligands et des ions et molécules de PEG en se basant sur la composition de la liqueur mère et de la solution de cryo-congélation.

Deuxième tour d'affinement : affinement des positions des atomes et des facteurs d'agitation thermique.

Positionnement des ligands et des ions et molécules de PEG. Affinement de leur taux d'occupation.

Troisième tour d'affinement : affinement des positions des atomes et des facteurs d'agitation, recherche automatique des molécules d'eau.

L'ajout des molécules d'eau à tendance à réduire fortement les R_{factor} et R_{free} .

Quatrième tour d'affinement : affinement des positions des atomes et des facteurs d'agitation, recherche des molécules d'eau et ajout de groupe TLS (« Translation, Libration Screw »).

L'analyse TLS se base sur les facteurs d'agitation thermique de chaque atome. L'analyse TLS propose de partitionner une chaîne principale en un certain nombre de fragments. Les atomes appartenant à un groupe TLS subissent la même variation. Les groupes TLS sont définis après analyse à l'aide du serveur TLSMD (Painter & Merritt, 2006). Ajout des hydrogènes pour les résidus protéiques. Les hydrogènes ont une diffusion faible (comparée à celle des atomes de C, O ou N) et contribue à la définition de la basse résolution. L'ajout d'hydrogène améliore la géométrie de la molécule et contribue à diminuer le R_{factor} et R_{free} .

Cinquième tour d'affinement : affinement des positions des atomes et des facteurs d'agitation, recherche des molécules d'eau, ajout de groupe TLS.

A la fin de l'affinement, les molécules d'eau sont vérifiées une par une. Le modèle est ensuite vérifié grâce aux outils de COOT et de PHENIX afin de vérifier que les résidus respectent les contraintes de géométrie.

2.3.4. Analyse des structures

Lors de cette thèse, j'ai fait une recherche de logiciels permettant une étude fine des structures des protéines. Je vous présente ici rapidement leur fonctionnement ainsi que le protocole permettant leur utilisation. Suivant les essais effectués et/ou les résultats obtenus, certains logiciels ne sont pas mentionnés dans les résultats présentés dans cette thèse.

qFit (van den Bedem, Dhanik, Latombe, & Deacon, 2009)

A partir du modèle affiné et de la carte de densité électronique, ce logiciel teste différents conformères possible pour chaque résidu. La position et l'occupation des conformations qui représentent au mieux la densité électronique sont ensuite affinées.

<http://smb.slac.stanford.edu/qFitServer/qFit.jsp>

CONTACT (van den Bedem, Bhabha, Yang, Wright, & Fraser, 2013)

Ce logiciel définit un réseau d'interaction entre les acides aminés d'une protéine à partir d'un fichier produit par qFit, c'est à dire à partir d'un fichier donnant les conformations possibles de certains résidus. Les acides aminés sont considérés en réseau, si le changement de conformation de l'un impacte les autres.

<http://smb.slac.stanford.edu/CONTACT/>

THESEUS (Theobald & Steindel, 2012)

THESEUS est un programme de superposition de structure. Il met à profit une approche par maximum de vraisemblance. Il fournit en outre une analyse par composantes principales (Principal Component Analysis, PCA) quand les séquences des structures analysées sont identiques. Pour rendre compte de la qualité de la superposition, le programme fournit des valeurs normalisées des résiduelles qui peuvent être vues comme représentant l'écart à la meilleure superposition. Lorsque l'analyse en composantes principales est possible, le logiciel fournit un fichier pdb dans lequel les valeurs de la colonne correspondant aux facteurs d'agitation thermique sont remplacées par les valeurs de l'analyse PCA, ce qui permet une visualisation direct de ces valeurs au niveau de la structure. Cette option a été utilisée pour comparer les structures obtenues avec la cellule enclume diamant. Le résultat obtenu avec THESEUS rend mieux compte de la structure dans son ensemble que ne peut le faire COOT, à travers les superposition par moindre carré ou en considérant la structure secondaire (Secondary Structure Matching).

Ligplot + (Wallace, Laskowski, & Thornton, 1995)

Ce logiciel permet à partir du modèle protéique de cartographier le site actif ou l'interface d'une protéine. Il prend en compte les interactions hydrogènes et hydrophobes. Il représente en 2D les acides aminés impliqués ainsi que les distances.

CASTP (Dundas et al., 2006)

Ce logiciel recherche les cavités présentes dans une structure à partir d'un fichier PDB. Le rayon de la bille servant à délimiter les cavités peut être ajusté entre 0 et 10 Å. Les cavités peuvent être visualisées directement. Ce logiciel met aussi en évidence les crevasses, c'est à dire les poches qui sont en partie ouvertes au solvant.

<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>

VOIDOO (Kleywegt & Jones, 1994)

Ce programme recherche aussi les cavités. Cependant le nombre de paramètres ajustables est beaucoup plus élevé. Il fournit aussi la liste des résidus qui bordent les cavités détectées. Cependant, il ne détecte pas les cavités ouvertes en partie au solvant.

HOLLOW (Ho & Gruswitz, 2008)

Ce programme effectue sensiblement le même travail que les précédents. Cependant, son fichier de sortie est directement utilisable par *PYMOL* ce qui lui donne un avantage en terme de visualisation.

CHAPITRE III

METHODOLOGIE ET DEVELOPPEMENT DES INSTRUMENTS SOUS HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES

3.1. Introduction

L'étude des protéines sous pression nécessite des instruments particuliers qui ne sont pas communément utilisés. J'ai donc souhaité dédier un chapitre pour expliquer leur fonctionnement ainsi que les développements que j'ai pu apporter durant ma thèse.

Nous disposons sur la plateforme d'un spectrophotomètre, d'un fluorimètre et d'une cellule à enclume diamant (CED). Le fluorimètre ayant été obtenu récemment, je n'ai encore obtenu aucun résultat exploitable. Je n'exposerai donc pas son fonctionnement ici. La CED est un outil qui permet d'enregistrer des données de cristallographie de rayons X sous haute pression et à température ambiante. Nous disposons au sein de la plateforme de 2 CED nommées ELSA et ELMA. Ces instruments sont utilisés sur des lignes de lumières spécifiques à SOLEIL et à l'ESRF. Lors de ma thèse j'ai participé à des campagnes sur mon sujet mais aussi en tant qu'experte sur des collaborations mis en place par Eric Girard.

Durant ma thèse, j'ai participé au développement du système de gestion de la qualité des différents instruments présents sur la plateforme, dans le cadre de la mise en place de la certification ISO9001 de l'institut et dans le but d'ouvrir la plateforme aux utilisateurs. Ce travail a consisté à écrire des protocoles détaillés pour chaque instrument, mettre en place des fiches compagnonnages et anomalies. J'ai aussi géré les différentes pannes ainsi que la maintenance inhérente à ces appareils.

3.2. Spectrophotomètre couplé à une cellule haute pression

3.2.1. Instrumentation

Les mesures d'activité sous pression sont effectuées sur un spectrophotomètre CARY 1C. Une enceinte haute pression y a été adaptée et permet des mesures d'activité en contrôlant la pression et la température. Cette cellule est constituée d'une double enceinte permettant la thermalisation de la cellule grâce à un bain thermostaté allant de 10 à 80 °C et la montée en pression. La cellule est constituée de deux fenêtres en saphir situées sur le trajet optique qui sont maintenues par des supports. La pression est appliquée grâce à une pompe à cabestan remplie d'eau distillée. Il est ainsi possible de monter à 400 MPa en moins de 2 min (Figure 3.1).

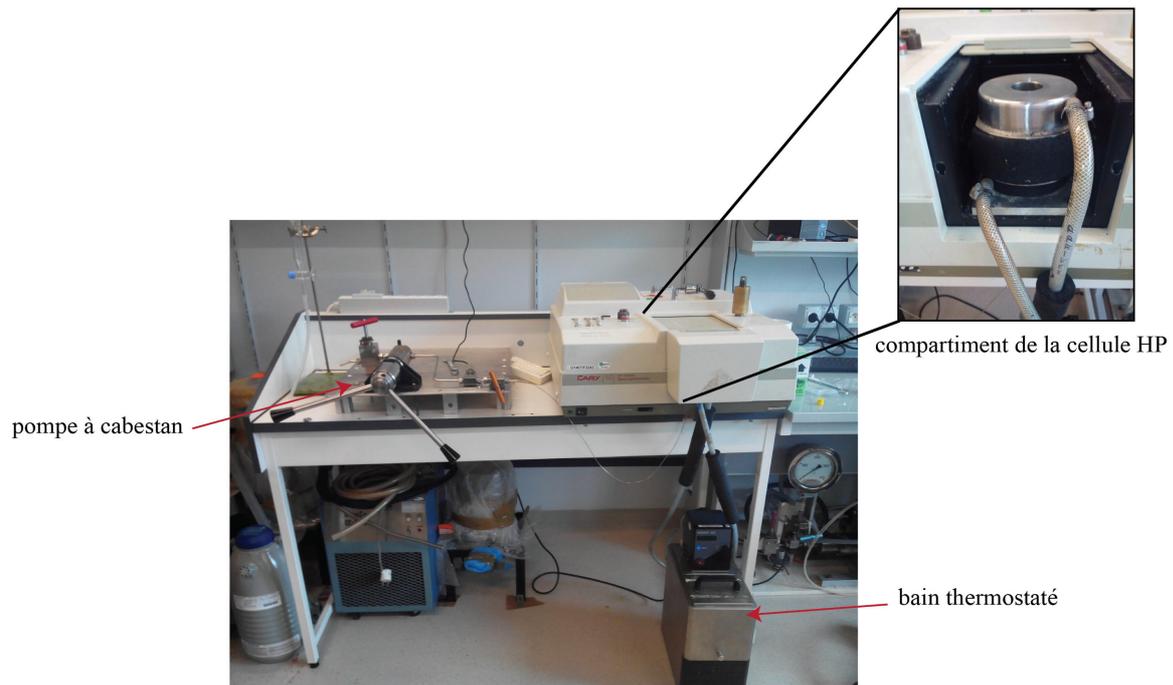


Figure 3.1. Montage expérimental du spectrophotomètre de la plateforme Haute Pression de l'IBS.

3.2.2. Conditions expérimentales

La mise en place de la cuve pour la mesure d'activité s'avère plus délicate que dans le cas d'un spectrophotomètre classique. En effet, la cuve est placée dans l'enceinte haute pression qui est remplie d'eau. Par conséquent, la cuve doit être fermée à l'aide d'un film plastique maintenu par un joint placé sur son goulot. De cette manière, la pression peut être transmise sans qu'il y ait d'échange entre le contenu de la cuve et l'eau de l'enceinte (Figure 3.2).

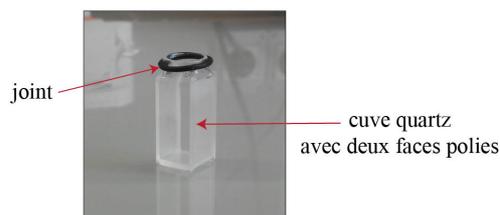


Figure 3.2. Cuve en quartz utilisée pour les mesures d'activité sous haute pression hydrostatique avec son joint.

Une mesure classique consiste à pré-incuber un volume de 3 ml de tampon dans des tubes à hémolyse placés dans le bain marie. Les réactifs sont ensuite ajoutés au tampon dans le tube à hémolyse. Après homogénéisation, le contenu du tube est rapidement versé dans la cuve. Le film plastique est alors disposé sur le goulot en évitant la formation de bulles. En effet, la pression ne se transmettra pas de la même manière en présence de bulles ce qui faussera les mesures. Cette manipulation prend environ 45 s. La détection de l'absorbance est déclenchée après la montée en pression. Le temps de latence entre la mise en présence des réactifs et le début de la mesure (de 45 s à 120 s) complique donc les mesures d'activités si la concentration en substrat est faible.

3.2.3. Contrôle de la température

Le maintien de la température est effectué par un bain thermostaté. Pour vérifier la température, nous utilisons un thermocouple. Nous mesurons la température dans le bain (équivalente à celle indiquée par le thermostat) et directement dans la cellule haute pression. La déperdition de chaleur entre les deux est d'environ 2 °C. Dans le cadre du processus de gestion de la qualité mise en place au sein de l'institut, nous vérifions cet écart tous les trois mois.

A la fin de l'année 2013, nous avons récupéré de nouveaux bains nous permettant d'étendre notre gamme de température. En effet, ces bains peuvent refroidir le liquide qu'ils contiennent. Dès lors, nous pouvions théoriquement réaliser des expériences à des températures de 2-3 °C minimum. Toutefois, la basse température peut induire la formation de condensation au niveau des fenêtres en saphirs ce qui peut fausser les mesures en modifiant l'absorbance des fenêtres. Une solution permettant d'éviter la formation de condensation serait de disposer des petits jets d'air sec au niveau des fenêtres. Cette

amélioration est en cours de discussion. Pour le moment, nous n'effectuons pas de mesures en dessous de 10 °C.

3.2.4. Effets des paramètres physicochimiques

Une des composantes importantes de la mesure d'activité est le tampon. En effet les éléments composant celui-ci peuvent interagir avec l'enzyme. De plus, comme toute molécule, le tampon peut être impacté par la pression et la température. Suivant sa nature, les variations des paramètres physicochimiques pourront modifier sa capacité à maintenir le pH. La variation de pH en fonction de la température est appelée coefficient de température. La même chose est vraie pour la pression. Le tableau ci-dessous regroupe les coefficients de température et de pression pour les tampons les plus utilisés.

	Coefficient de température (°C ⁻¹)	Coefficient de pression (MPa ⁻¹)
Tris HCl	0,028	0,18
Phosphate	0,0028	-0,40
Hepès	-0,014	0,20
Mops	0,015	0,21
Tris / Phosphate pH 8 (25-75 % v/v)	ND	-0,10

Tableau 3.1. Coefficient de température et de pression de différents tampons (Quinlan & Reinhart, 2005).

A titre d'exemple, pour connaître le pH d'un tampon Tris à 60 °C dont le pH a été ajusté à pH 8 à 25 °C ; il faut faire le calcul suivant :

$$pH_{60} = pH_{25} + (T_{finale} - T_{initiale}) \times Coef_T$$

$$pH_{60} = 8 + (60 - 25) \times 0,028 = 8,98$$

La variation de pH est relativement importante. Pour les mesures en fonction de la température, nous avons choisi du tampon phosphate dont le coefficient de température est 10 fois moins important. Cependant, il présente un coefficient de pression élevé. Ainsi, pour les mesures en pression, nous avons choisi un mélange Tris HCl / Phosphate (25-75 % v/v respectivement) qui varie très peu en fonction de la pression (Quinlan & Reinhart, 2005). En revanche, aucune information n'était disponible sur la stabilité de ce mélange de tampon en fonction de la température. Nous avons donc mesuré la variation de pH en fonction de la température de ce tampon.

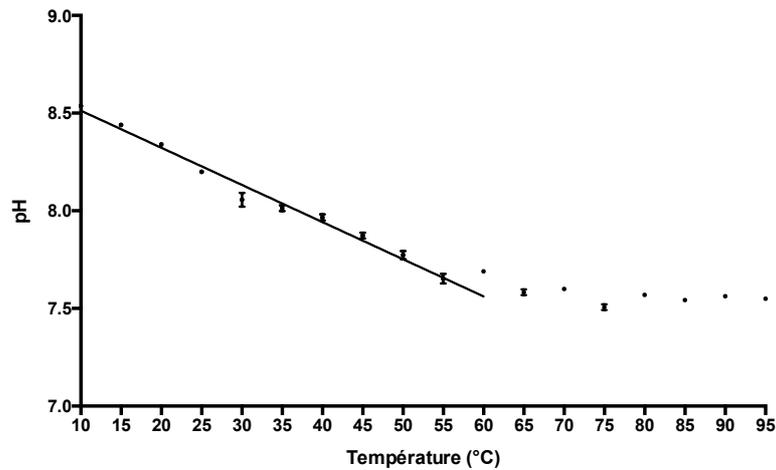


Figure 3.3. Evolution du pH en fonction de la température d'un tampon Tris HCl (25%) Phosphate (75%) à 100 mM.

La figure 3.3 montre que le pH du mélange Tris HCl/Phosphate varie de manière linéaire avec la température entre 10 et 60 °C. Après 60 °C le pH ne varie plus. Le coefficient de température jusqu'à 60 °C est de 0,019. Il est proche de celui du Tris (0,028).

Enfin, toujours dans le but de minimiser une variation possible du pH sur l'étude de la pression, nous avons choisi d'utiliser le même tampon pour chacune des enzymes étudiées. Nous avons aussi choisi de ne pas rajouter de sels, même si ces derniers augmentent l'activité spécifique des enzymes considérées, puisque nous ne connaissons pas leur comportement et leur effet éventuel sur le pH à haute pression. Nous avons donc vérifié le comportement spécifique de chaque enzyme en fonction de la concentration en sel à pression ambiante.

3.3. Cristallographie des rayons X sous hautes pressions hydrostatiques

3.3.1. L'instrumentation : la cellule à enclumes diamant (CED)

En biocristallographie sous haute pression (HPMX pour High-Pressure Macromolecular Crystallography) nous utilisons une cellule à enclumes diamant. La CED est un système composé de deux diamants qui enserrant un joint métallique dans lequel a été percé un trou. La cavité contenant l'échantillon est donc formée par les parois du trou percé dans le joint et les surfaces des deux diamants et est ainsi hermétiquement close (Figure 3.4.).

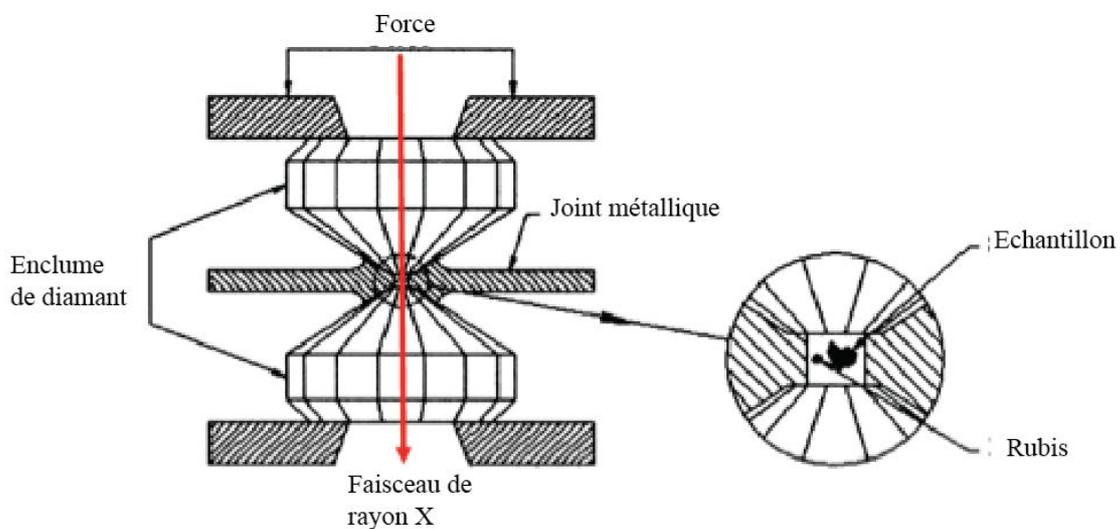


Figure 3.4. Schéma d'une cellule à enclumes de diamant

Lors de l'enregistrement des données, le faisceau de rayons X passe à travers les deux diamants. L'enregistrement des données est effectué à haute énergie pour optimiser la transmission des diamants (90 % à 33 keV). Ceci permet en outre d'obtenir un cône de diffraction peu ouvert et ainsi d'enregistrer les taches de diffraction à très haute résolution.

Ainsi, l'angle d'ouverture est de 25 ° à 37 keV pour obtenir des données à 1,5 Å de résolution. Par conséquent, à haute énergie, l'ouverture limitée de la CED restreint le domaine de rotation durant l'enregistrement mais pas la résolution des données de diffraction.

Les caractéristiques des CED décrites ici concernent les CED disponibles sur la plateforme Haute Pression. La première s'appelle ELSA et la seconde ELMA. ELMA possède en plus un système de régulation de la température (Figure 3.5).

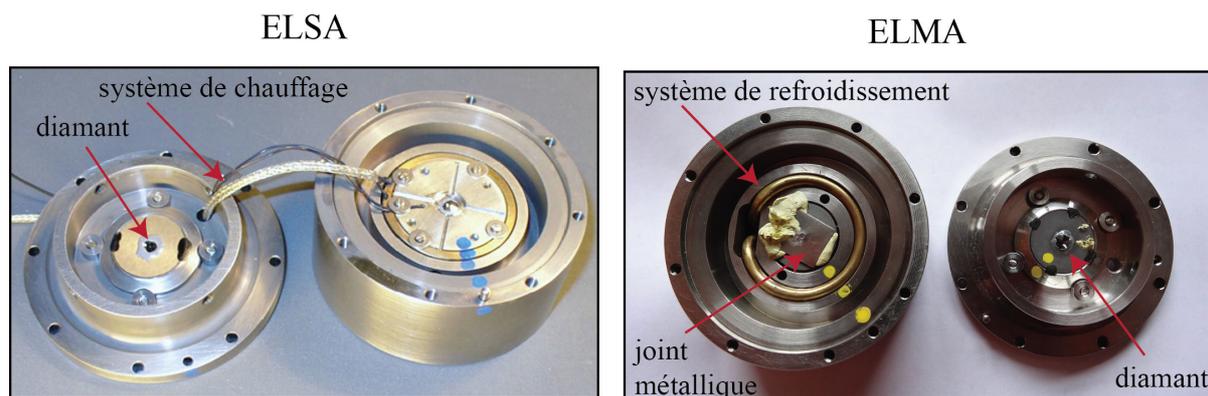


Figure 3.5. Photos des CED ELSA et ELMA

L'ouverture utile est de l'ordre de 82 °, ce qui signifie qu'une rotation de la CED sur la tête goniométrique de 82 ° peut être réalisée sans que les clichés de diffraction soient masqués en tout ou en partie. Les cristaux, compte tenu de leur morphologie, se placent souvent selon la même orientation dans la cavité. Une grande ouverture agrandit le domaine de l'espace réciproque accessible et donc la complétude des données.

Les CED utilisées pour cette étude fonctionnent grâce à un transfert de la force par un piston annulaire muni de deux joints toriques et gonflé à l'aide hélium. La surface des culots de diamant a été ajustée pour un domaine de pression utile jusqu'à 2 GPa au moins avec une cavité de compression de 400 µm de diamètre et 200 µm d'épaisseur. La pression effective de l'échantillon dans la cavité est déterminée par le déplacement d'une raie de fluorescence d'une microsphère de rubis illuminée par un faisceau laser (Système PRL de la société BETSA). La longueur d'onde d'émission à pression ambiante peut varier faiblement d'une microsphère de rubis à l'autre (en fonction de la taille, de la préparation etc.). La calibration à pression ambiante est donc réalisée pour chaque microsphère. Ensuite, la longueur d'onde à atteindre pour obtenir la pression désirée à l'intérieur de la CED est calculée selon l'équation suivante (adaptée de (Forman, 1972)) :

$$P_{rubis} = (\lambda_{pamb} - \lambda_{HP}) \times 0,365 \quad (3.1)$$

où P_{rubis} est en giga Pascal, la longueur d'onde λ en nm.

La variation de la pression ressentie par le rubis et celle appliquée sur le piston par le gaz suit une relation sinusoïdale (Figure 3.4.)

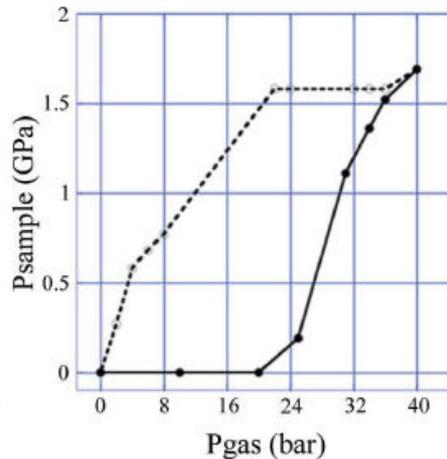


Figure 3.6. Variation de la pression ressentie par le rubis en fonction de la pression appliquée par le gaz. Ligne pleine : rampe de montée. ligne pointillée : rampe de descente.

Avant 16 bars, la pression de gaz n'est pas encore suffisante pour réduire l'épaisseur du joint métallique et pour transmettre la pression dans la cavité. Cette gamme de pression est utilisée pour plaquer le joint après son positionnement (voir paragraphe suivant). Dû à la forme exponentielle de la courbe, de faibles variations de la pression de gaz entraînent de fortes variations dans la pression à l'intérieur de la cavité (et donc ressentie par le cristal de protéine) mesurée par le rubis. Les montées en pression se font lentement avec un temps de stabilisation de l'ordre de la dizaine de minutes.

3.3.2. Conditions expérimentales

Nous utilisons des joints métalliques en Inconel X750. Ces joints sont préparés à l'avance. Pour cela, nous utilisons généralement le matériel disponible sur ID27 (ESRF). Un joint est placé entre les deux diamants et une indentation est effectuée. Après indentation, la position du joint par rapport aux diamants devra être identique pour toutes les autres expériences et, ce, afin d'éviter un éventuel fluage du métal qui conduirait à une mise en contact directe des diamants et à leur destruction. Le trou est alors percé au centre de l'indentation. Ce perçage est réalisé par électroérosion.

Avant chaque expérience, le joint est nettoyé aux ultrasons pour enlever les résidus de liqueur mère. Le joint est positionné sous binoculaire et maintenu sur le diamant par de la patafix. Le joint est plaqué en appliquant une pression membrane de 6 bars sur la cellule fermée afin de rendre étanche la cavité formée par le joint et le diamant. Ensuite, la cellule est ouverte pour charger l'échantillon. Nous plaçons un rubis sur le diamant fixé au capot. Pour rappel, la fluorescence du rubis permet de connaître la pression à l'intérieur de la cellule.

Le cristal est péché avec une boucle de 200-300 μm (Figure 3.7). La cavité est préalablement remplie de liqueur mère. Le cristal est déposé dans la goutte de liqueur mère et délicatement guidé à l'intérieur de la cavité. La liqueur mère est ajoutée au dernier moment pour éviter tout risque d'évaporation. Ensuite le capot comprenant le second diamant est mis doucement sur la cellule. Après fermeture de la cellule, la cavité est visualisée sous binoculaire pour vérifier la présence du cristal, du rubis et l'absence de bulles d'air. Il est toutefois possible d'enlever les petites bulles d'air en appliquant une pression membrane de 6 bars.



Figure 3.7. Les différentes étapes de chargement du cristal dans la CED. ©CEA/D. Morel

Ensuite, la cellule est posée sur un support en V fixé sur le goniomètre présent sur la ligne de lumière utilisée pour les mesures. La cellule doit être centrée par rapport à l'axe du goniomètre et celui du faisceau de rayons X. Cette procédure est réalisée en mesurant la transmission du faisceau à travers le trou de la cavité à l'intérieur de la CED. Durant cette étape, le faisceau est atténué pour diminuer les dommages dus à l'irradiation aux rayons X. Après le centrage de la cellule, quelques images sont enregistrées pour déterminer les paramètres de mailles, la résolution et le temps d'exposition par image. Le temps d'exposition est aussi ajusté pour diminuer les dommages dus à l'irradiation. Il varie de 5 à 30 s selon les paramètres de la ligne au moment de l'expérience (principalement caractéristiques du faisceau et détecteur).

3.3.3. Lignes de lumière adaptées à la cristallographie sous haute pression

A ce jour, aucune ligne de lumière pour la biocristallographie n'est dédiée à la haute pression. Les expériences de HPMX se déroulent sur des lignes développées pour des études de physique. L'ESRF possède une ligne entièrement dédiée à la haute pression, ID27, dirigée par Mohamed Mezouar. Depuis dix ans, une étroite collaboration existe avec les scientifiques de cette ligne et la plateforme Haute Pression. Nous avons pu développer ainsi les conditions optimales pour les expériences de biocristallographie. En effet, un soin particulier a été apporté pour obtenir une bonne synchronisation entre le mouvement du goniomètre et l'ouverture de l'obturateur échantillon nécessaire dans la méthode de la rotation utilisée pour l'enregistrement des données de diffraction. De plus, l'équipe de cette ligne a développé un ensemble de scripts qui facilitent le déroulement des expériences, notamment le centrage de la CED. La communauté physicienne s'intéressant à la haute pression étant très développée, cette ligne subit une pression très forte. Pour augmenter notre temps de faisceau alloué, nous avons diversifié nos demandes, sur ID09 et sur CRISTAL (SOLEIL). Les scientifiques de ces lignes de lumière ont, à chaque fois, fait leur possible pour adapter leurs lignes à nos contraintes.

3.3.4. Déroulement d'un enregistrement en HPMX

Comme dans toutes expériences de cristallographie, une attention particulière est accordée aux cristaux. Dans le cas des expériences HPMX, leurs dimensions doivent s'accorder au mieux à celle de la cavité de la CED, c'est à dire 400 μm de diamètre x 200 μm d'épaisseur.

Au démarrage d'une campagne synchrotron, nous enregistrons un jeu de données sur un cristal de lysozyme placé dans la CED. Cette étape est utile pour nous rendre compte de l'état de la ligne de lumière et des paramètres d'enregistrement (distance cristal-détecteur, synchronisation obturateur/goniomètre).

Pour chaque nouvelle protéine, nous explorons tout d'abord la gamme de stabilité du cristal. En général, la pression charnière à laquelle le cristal est déstabilisé correspond à la pression identifiée en solution (Colloc'h et al., 2006) et est en lien avec un changement de conformation et/ou à la déstabilisation de la structure quaternaire de la protéine. Cela nous permet donc de définir le domaine de pression à explorer. Pour cela, nous mesurons une dizaine de clichés de diffraction (1° d'oscillation par image) à chacune des pressions considérées. Une dizaine d'images suffit pour une première détermination des paramètres de

maille et ainsi calculer le volume de la maille. En général, le volume de la maille diminue linéairement de 1 % par 100 MPa jusqu'à la déstabilisation du cristal caractérisée par une perte de la diffraction et associé à un changement drastique dans le volume de la maille (qui peut augmenter ou diminuer) (Figure 3.8).

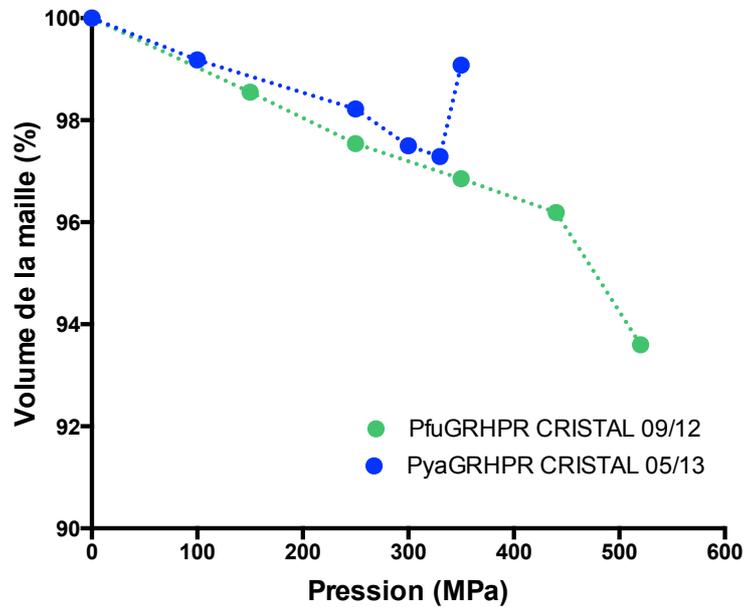


Figure 3.8. Courbes de compressibilité de différentes protéines. Les mesures ont été effectuées sur la ligne de lumière CRISTAL de SOLEIL

Après avoir déterminée la gamme de pression dans laquelle le cristal est stable, nous enregistrons des jeux de données à différentes pressions à l'intérieure de cette gamme. Nous commençons, en général, par un jeu de données à pression ambiante qui nous sert de référence lors de l'analyse des données. Nous pouvons ainsi nous rendre compte de la sensibilité du cristal aux dommages dus à l'irradiation à température ambiante. Ensuite, nous enregistrons un jeu de données à une pression proche de la pression de déstabilisation du cristal.

Lors de l'enregistrement des données, nous changeons de zone toutes les 5-10 images afin de limiter les dommages dus à l'irradiation. Dans ce but, la CED est déplacée en vertical et horizontal pour parcourir l'ensemble du cristal. La figure 3.9 présente le cristal dans la CED avant et après exposition au faisceau de rayon X.

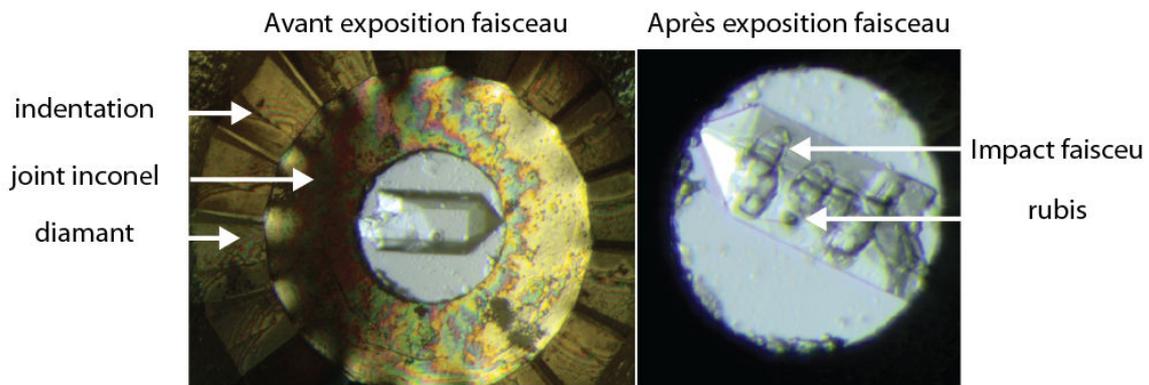


Figure 3.9. Cristal à l'intérieur de la cavité avant et après exposition au faisceau. Les marques sur le cristal (image à droite) correspondent aux zones irradiées après plusieurs translations du cristal.

Dans le cas de cristaux de faibles tailles ou de faibles symétries, il est nécessaire d'enregistrer des jeux de données sur plusieurs cristaux pour pouvoir disposer d'un jeu de données complet. Le traitement des données s'effectue selon le protocole développé dans le chapitre 2. Les jeux de données provenant de différents cristaux sont mélangés lors de la mise à l'échelle. Après l'obtention des amplitudes, la détermination des phases est réalisée par remplacement moléculaire. Le modèle de départ correspond à la structure de la protéine à 100 K sous forme de Polyala pour limiter les biais apportés par le remplacement moléculaire. Par la suite, l'affinement est réalisé avec PHENIX (Adams et al., 2010) selon les étapes décrites dans le chapitre 2. Lors de la détermination des structures à pression ambiante et haute pression, un soin particulier est apporté à respecter le même protocole pour l'ensemble des jeux de données. De la même manière, les différents jeux de données d'une même protéine sont enregistrés lors d'une même campagne (mêmes conditions de ligne).

CHAPITRE IV

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE A PRESSION AMBIANTE DES GLYOXYLATE HYDROXYPYRUVATE REDUCTASES : ROLE DANS LE METABOLISME ET MODE D'ACTION

4.1. Introduction

L'effet de la pression sur les protéines mésophiles a été largement décrit (Akasaka et al., 2013; Masson & Balny, 2005; Somero, 1992). Cependant, il existe très peu d'études structure fonction sur les effets de la pression, encore moins dans le cadre d'une étude comparative visant à mettre en évidence un phénomène adaptatif des HPH au niveau protéique. Sachant que la pression peut affecter les paramètres cinétiques d'une enzyme de manière différente en fonction du substrat (Occhipinti et al., 2006), nous avons donc choisi comme enzyme modèle la glyoxylate-hydroxypyruvate réductase (GRHPR) qui a la particularité d'accepter deux substrats différents. Les GRHPR catalysent la réduction d'hydroxypyruvate en D-glycérate et du glyoxylate en glycolate. Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du cofacteur, NADH ou NADPH (Figure 4.1).

Figure 4.1. Réaction de réduction de l'hydroxypyruvate en D-glycérate et du glyoxylate en glycolate catalysée par la GRHPR. Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du cofacteur, NADH ou NADPH.

Les GRHPR sont présentes dans de très nombreux organismes, mais leur rôle exact n'est pas clairement défini dans tous. Ces enzymes ont été particulièrement bien étudiées chez les plantes où elles sont impliquées dans le mécanisme de photorespiration (Givan & Kleczkowski, 1992). Chez l'homme, l'enzyme agit dans le processus de détoxification du glyoxylate au niveau du foie (Snell, Natsumeda, & Weber, 1987). Une perte drastique d'efficacité de l'enzyme via une déficience génétique conduit à l'apparition de maladies graves (Van Acker, 2007). La structure de l'enzyme humaine a été déterminée en complexe ternaire avec du D-glycérate et du NADPH (Booth, Connors, Rumsby, & Brady, 2006). Dans de précédentes études, les GRHPR archéennes ont été décrites plutôt comme des glyoxylate réductases (GR) que des hydroxypyruvate réductases (HPR) sans que cela soit relié à un potentiel rôle au niveau du métabolisme (Ohshima, Nunoura-Kominato, Kudome, & Sakuraba, 2001; Yoshikawa et al., 2007). Dans le cas de l'enzyme de *Pyrococcus horikoshii*, celle-ci a été caractérisée comme GR et sa structure a été obtenue en complexe avec du NADP(H) (Yoshikawa et al., 2007).

Pour réaliser cette étude vis-à-vis des effets de la pression, nous avons choisi de caractériser les GRHPR issues de 3 archées hyperthermophiles de la famille des *Pyrococcales*

qui ont été isolées à différentes profondeurs et qui présentent des optima de croissance différents sous pression. Comme indiqué en introduction de ce manuscrit, le premier organisme est un hyperthermophile-piézophile strict qui a été isolé récemment. Il s'agit de *Pyrococcus yayanosii*, une archée isolée à 4100 m de profondeur sur le site Ashadze situé sur la dorsale medio atlantique. Cet organisme a une température optimale de croissance comprise entre 80 et 108 °C et une pression optimale de croissance située entre 20 et 120 MPa (Figure 4.2). Ne pouvant pas pousser à pression ambiante, il a été qualifié de piézophile strict (Zeng et al., 2009). Pour cette étude comparative, nous avons aussi choisi *P. furiosus*, isolé sur une plage à proximité de Naples en Italie avec une gamme de croissance de 0,1 à 30 MPa (Fiala & Stetter, 1986) et *P. horikoshii*, isolé dans la fosse d'Okinawa dans l'océan Pacifique qui présente une gamme de croissance de 0,1 à 40 MPa (González et al., 1998) et dont la GRHPR a été caractérisée comme indiqué ci-dessus. Les courbes de croissance de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* sont présentées dans la figure 4.2.

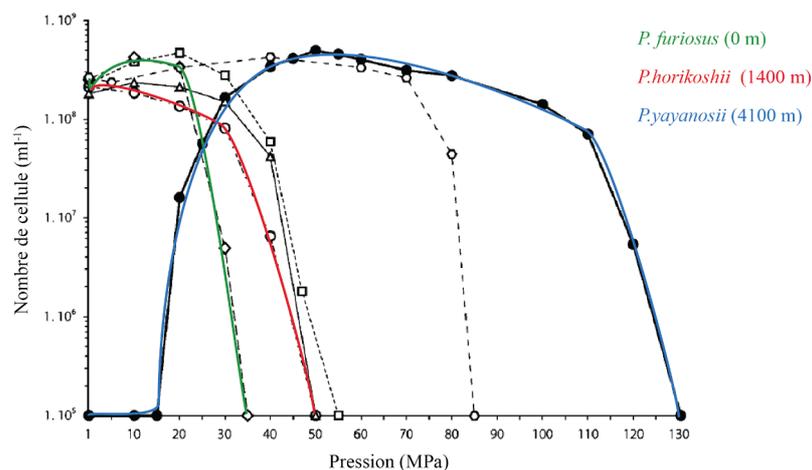


Figure 4.2. Croissance des *Thermococcales* sous hautes pressions hydrostatiques à températures optimales (98 °C). *P. furiosus* (vert), *P. horikoshii* (rouge) et *P. yayanosii* (bleu). En plus des organismes choisis pour l'étude, les courbes de croissance de *P. glycovorans* (triangle), *P. abyssi* (carré) et *T. barophilus* (rond) sont aussi indiquées. D'après (Birrien et al., 2011; Zeng et al., 2009).

L'objectif est d'identifier des différences de comportement entre enzymes provenant d'organismes abyssaux par rapport aux enzymes provenant d'organisme de surface, en lien avec des mutations spécifique sélectionnées face à une contrainte induite par les HPH.

Afin d'y parvenir, nous avons donc essayé de mettre en lumière l'existence de différences de propriétés au niveau de l'activité et de la stabilité des GRHPR. Comme il est vraisemblable que les paramètres cinétiques puissent être modifiés même à pression ambiante, nous avons tout d'abord conduit une série de mesures qui sont présentées au paragraphe 4.2. Les études biochimiques et structurales sous pression seront présentées dans le chapitre 5. Nous avons aussi associé à cette étude biochimique à pression ambiante, la détermination de

la structure par cristallographie des rayons X conventionnelle de deux des trois GRHPR. L'ensemble de ce travail nous permet de proposer une assignation fonctionnelle pour les GRHPR archéennes et apporte un nouvel éclairage sur le mécanisme d'action de cette famille d'enzyme. A la suite de ces diverses caractérisations, il est devenu possible de positionner la place de ces enzymes dans le métabolisme des *Thermococcales*.

4.2. Détermination des paramètres cinétiques et de la spécificité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de *Thermococcales*

Pour étudier les propriétés spécifiques des GRHPR et en caractériser ultérieurement le comportement sous pression (voir chapitre 5), nous avons fait synthétiser les fragments d'ADN correspondant aux gènes codants pour les enzymes de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii*. Ces fragments ont été clonés dans le plasmide pET 41a. Les protéines ont été produites dans *E. coli* (BL21 DE3 RIL) et purifiées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Les 3 GRHPR partagent une similarité de séquence protéique de 85 % (cf. Annexe 4.1). La concentration en protéine a été déterminée par la méthode d'absorbance à 280 nm. La pureté des échantillons, vérifiée par spectrométrie de masse et gel de polyacrylamide, étant supérieure à 99 %, nous avons utilisé le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de chaque enzyme rapporté dans le tableau ci-dessous :

	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
PfuGRHPR	43890
PhoGRHPR	42410
PyagrHPR	40910

Tableau 4.1. Valeurs des coefficients d'extinction molaire (ϵ) des GRHPR

Pour étudier la spécificité des GRHPR, les paramètres cinétiques des enzymes ont été déterminés pour les 4 couples substrats/cofacteurs possibles : du glyoxylate ou de l'hydroxypyruvate comme substrat et du NADH ou NADPH comme cofacteur. Pour obtenir les paramètres cinétiques (K_M et k_{cat}), les vitesses initiales à différentes concentrations de substrat (10 à 20 concentrations différentes) ont été mesurées. Lorsqu'un paramètre était modifié (cofacteur ou substrat), le second était maintenu constant et en concentration 10 fois supérieures au K_M . Lorsqu'une inhibition par le substrat était observée, nous avons choisi la concentration en substrat correspondant à l'activité maximale. Les paramètres cinétiques ont été obtenus avec le logiciel PRISM en appliquant les formules suivantes dans le cas où les

données suivaient l'équation de Michalelis Menten (Equation 4.1) ou dans le cas de la présence d'une inhibition par excès de substrat (Equation 4.2) :

$$Y = \frac{V_{\max} \times X}{K_M + X} \quad \text{Equation 4.1}$$

$$Y = \frac{V_{\max} \times X}{K_M + X \times \left(1 + \frac{X}{K_i}\right)} \quad \text{Equation 4.2}$$

Comme pour les études des GRHPR de *T. litoralis* et *P. horikoshii* (Ohshima et al., 2001; Yoshikawa et al., 2007), nous avons choisi une température de mesure de 50 °C, valeur en dessous de la température optimale d'activité (85 °C). En effet, en plus de permettre une comparaison directe avec la littérature, travailler à basse température offrait la possibilité de ralentir la vitesse de la réaction et de pouvoir mesurer la vitesse initiale même dans des conditions de concentrations faibles en substrat. De plus, à basse température, les phénomènes d'évaporation qui rendent plus difficile la reproductibilité des mesures étaient évités.

Les mesures de vitesse initiale de réaction permettent de calculer les k_{cat} de chaque enzyme (Figure 4.3). Les valeurs absolues sont indiquées dans le tableau 4.3.

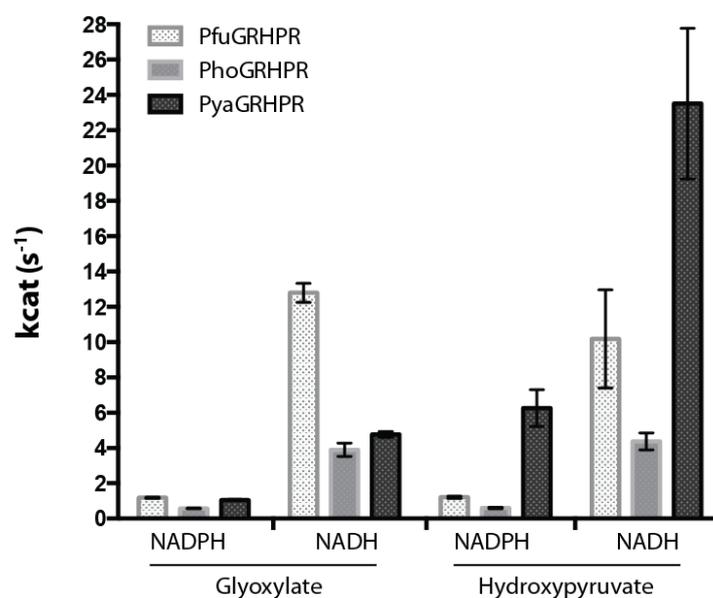


Figure 4.3. Représentation des valeurs de k_{cat} pour les différentes GRHPR. PfuGRHPR est indiqué en gris clair, PhoGRHPR en gris foncé et PyaGRHPR en noir. Les données en présence de glyoxylate sont représentées à gauche et celles en présence d'hydroxypyruvate à droite. Les mesures ont été réalisées à 50 °C. Les valeurs de k_{cat} ont été obtenues à partir de données obtenues sur une concentration en glyoxylate et d'hydroxypyruvate de 0,05 à 8 mM et de NADH et de NADPH de 0,02 à 0,8 mM. Les concentrations en enzymes ont été modifiées selon les couples de substrat/cofacteur pour être en condition de vitesse initiale : PfuGRHPR 0,4-1,2 $\mu g/ml$, PhoGRHPR 1,6-9,2 $\mu g/ml$ et PyaGRHPR 0,4-3,3 $\mu g/ml$.

Cette étude révèle des différences importantes dans les valeurs de k_{cat} en fonction du cofacteur. Pour les 3 enzymes, les valeurs les plus élevées de k_{cat} sont obtenues avec le NADH, qui amplifie l'activité des enzymes de 5 à 12 fois plus que le NADPH. Les écarts les plus importants ont été observés avec PfuGRHPR et PhoGRHPR. Par contre, il n'y a pas de différence claire dans les valeurs de k_{cat} en fonction du substrat dans le cas de PfuGRHPR et PhoGRHPR. Pour l'enzyme PyaGRHPR en présence d'hydroxypyruvate, la valeur de k_{cat} est multipliée par 6 par rapport à la valeur en présence de glyoxylate (Tableau 4.2). La valeur de k_{cat} maximale, toutes enzymes confondues, est obtenue par PyaGRHPR avec le couple hydroxypyruvate/NADH ($23 s^{-1}$).

	PfuGRHPR		PhoGRHPR		PygGRHPR	
Hydroxypyruvate	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH
k_{cat}/K_M (s^{-1}/mM)	15 +/- 5	75 +/- 50	30 +/- 15	60 +/- 20	40 +/- 20	60 +/- 25
K_M (mM)	0,09 +/- 0,03	0,15 +/- 0,05	0,02 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,15 +/- 0,05	0,40 +/- 0,1
k_{cat} (s^{-1})	1,2 +/- 0,06	10,0 +/- 3,0	0,6 +/- 0,04	4,4 +/- 0,5	6,3 +/- 1,0	24 +/- 4
Glyoxylate						
k_{cat}/K_M (s^{-1}/mM)	5,4 +/- 0,9	7,0 +/- 0,4	1,2 +/- 0,3	25 +/- 6	3,3 +/- 0,7	3,1 +/- 0,4
K_M (mM)	0,22 +/- 0,03	1,8 +/- 0,02	0,50 +/- 0,09	0,15 +/- 0,02	0,31 +/- 0,05	1,5 +/- 0,15
k_{cat} (s^{-1})	1,2 +/- 0,03	13 +/- 0,5	0,6 +/- 0,02	3,9 +/- 0,4	1,1 +/- 0,04	4,8 +/- 0,2

Tableau 4.2. Récapitulatif des paramètres cinétiques des différentes GRHPR à 50 °C. Les valeurs de paramètres cinétiques ont été obtenues à partir de données obtenues sur une concentration en glyoxylate et d'hydroxypyruvate de 0,05 à 8 mM et de NADH et de NADPH de 0,02 à 0,8 mM. Les concentrations en enzymes ont été modifiées selon les couples de substrat/cofacteur pour être en condition de vitesse initiale : PfuGRHPR 0,4-1,2 µg/ml, PhoGRHPR 1,6-9,2 µg/ml et PygGRHPR 0,4-3,3 µg/ml.

La spécificité d'une enzyme est guidée par les paramètres cinétiques. Aux concentrations en substrat proche du K_M , c'est la valeur de celui-ci qui guide la vitesse de la réaction spécifique. Lorsque la concentration en substrat augmente est atteint des valeurs de 5 ou 10 fois le K_M , c'est la valeur de k_{cat} qui définit le mieux l'efficacité de l'enzyme. Dans la cellule, la concentration en substrat est souvent de l'ordre du µM ou inférieur, ce qui correspond à des valeurs proche ou inférieur au K_M . Pour identifier la spécificité des GRHPR dans la cellule, nous avons comparé les valeurs de K_m des enzymes pour les substrats (Figure 4.4).

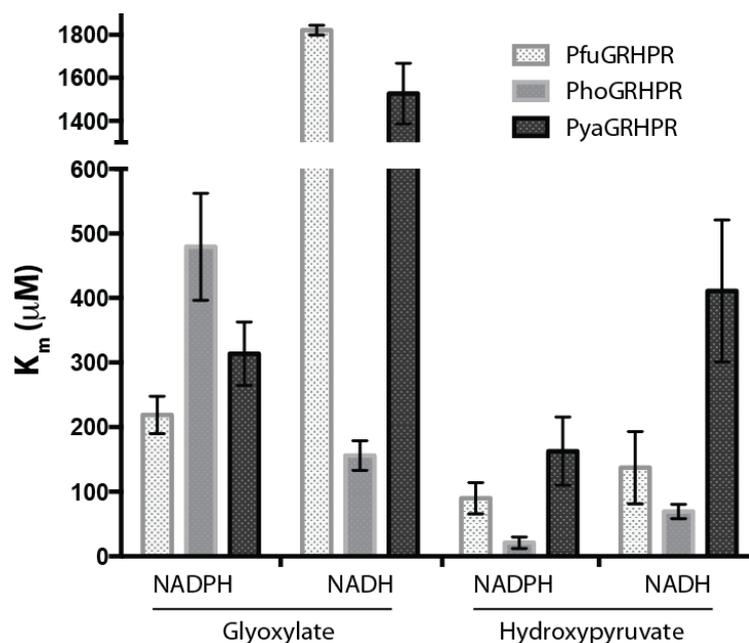


Figure 4.4. Représentation des valeurs de K_M associées aux substrats pour les différentes GRHPR. PfuGRHPR est indiqué en gris clair, PhoGRHPR en gris foncé et PyaGRHPR en noir. Les données en présence de glyoxylate sont représentées à gauche et celles en présence d'hydroxypyruvate à droite. Les mesures ont été réalisées à 50 °C. Les valeurs de k_{cat} ont été obtenues à partir de données obtenues sur une concentration en glyoxylate et d'hydroxypyruvate de 0,05 à 8 mM et de NADH et de NADPH de 0,02 à 0,8 mM. Les concentrations en enzymes ont été modifiées selon les couples de substrat/cofacteur pour être en condition de vitesse initiale : PfuGRHPR 0,4-1,2 µg/ml, PhoGRHPR 1,6-9,2 µg/ml et PyaGRHPR 0,4-3,3 µg/ml.

Cette étude montre que les 3 enzymes présentent plus d'affinité pour l'hydroxypyruvate (20-163 µM) que pour le glyoxylate (156-1822 µM), ceci quel que soit le cofacteur utilisé. PhoGRHPR possède la valeur de K_m la plus faible pour l'hydroxypyruvate (70 µM avec NADH et 21 µM avec NADPH). Avec le NADH, les enzymes PfuGRHPR et PyaGRHPR ont une affinité pour le glyoxylate proche de 2 mM. Ces enzymes montrent une claire préférence pour l'hydroxypyruvate.

Nos études indiquent que le NADH semble être le cofacteur préféré par les HPR. Pour confirmer ce résultat il est important de considérer les valeurs de K_M pour les cofacteurs (Figure 4.5).

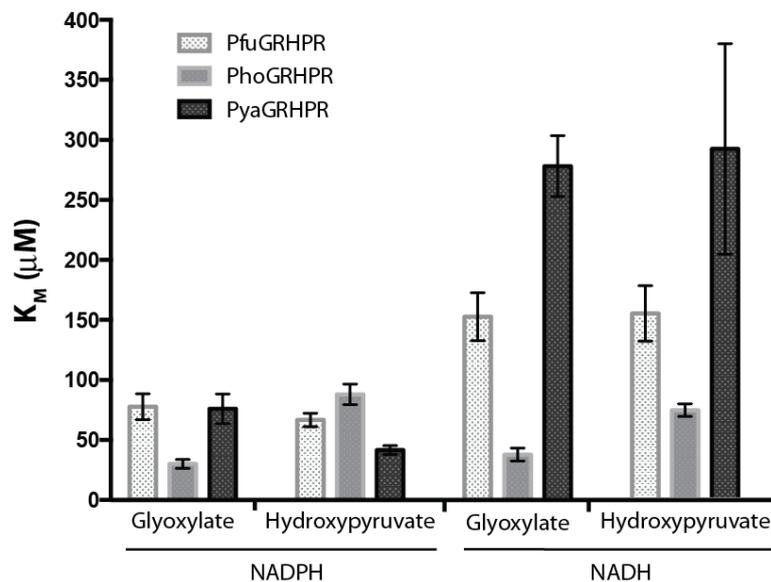


Figure 4.5. Représentation des valeurs de K_M associés aux cofacteurs pour les différentes GRHPR. PfuGRHPR est indiqué en gris clair, PhoGRHPR en gris foncé et PyaGRHPR en noir. Les données en présence de glyoxylate sont représentées à gauche et celles en présence d'hydroxypyruvate à droite. Les mesures ont été réalisées à 50 °C. Les valeurs de K_M ont été obtenues à partir de données obtenues sur une concentration en glyoxylate et d'hydroxypyruvate de 0,05 à 8 mM et de NADH et de NADPH de 0,02 à 0,8 mM. Les concentrations en enzymes ont été modifiées selon les couples de substrat/cofacteur pour être en condition de vitesse initiale : PfuGRHPR 0,4-1,2 μg/ml, PhoGRHPR 1,6-9,2 μg/ml et PyaGRHPR 0,4-3,3 μg/ml.

Les résultats présentés dans la figure 4.5 indiquent que les GRHPR ont une affinité plus grande pour le NADPH (30 – 88 μM) que pour le NADH (40-290 μM). Toutefois, pour identifier clairement le cofacteur physiologique, nous avons calculé le rapport k_{cat} sur K_M qui indique l'efficacité catalytique pour chaque combinaison de substrat et cofacteur (Tableau 4.1). Les valeurs d'efficacité catalytique cumulent les barres d'erreurs du K_M et du k_{cat} . Les valeurs numériques ne permettent pas de différencier un cofacteur par rapport à l'autre. De plus, ce rapport n'est pas représentatif de l'évolution de la vitesse de réaction sur l'ensemble des concentrations en substrat considéré. Comme discuté par Northrop *et al.*, ce paramètre est à prendre avec précaution lorsqu'on compare des enzymes entre elles (Northrop, 2002). Comme la concentration cytosolique des *Thermococcales* en NADH et NADPH est encore mal connue, nous avons choisi de représenter la variation de l'activité spécifique en fonction de la concentration en substrat entre 0 et 700 μM (Figure 4.6).

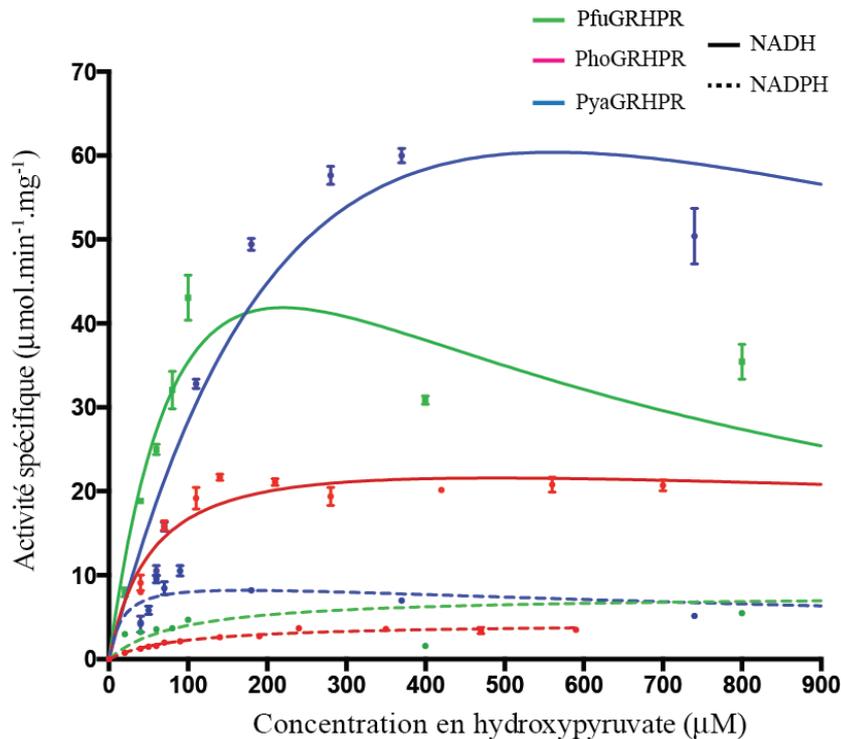


Figure 4.6. Variation de l'activité en fonction de la concentration en hydroxypyruvate. Les courbes correspondant à PfuGRHPR sont en vert, celle de PhoGRHPR en rouge et celle de PyaGRHPR en bleu. Les courbes en présence de NADH sont en ligne pleine, celles en présence de NADPH en pointillé. Les mesures ont été réalisées à 50 °C. Les valeurs de K_M ont été obtenues à partir de données obtenues sur une concentration en glyoxylate et d'hydroxypyruvate de 0,05 à 8 mM et de NADH et de NADPH de 0,02 à 0,8 mM. Les concentrations en enzymes ont été modifiées selon les couples de substrat/cofacteur pour être en condition de vitesse initiale : PfuGRHPR 0,4-1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PhoGRHPR 1,6-9,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et PyaGRHPR 0,4-3,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Les résultats présentés sur la figure 4.6 montrent que l'activité spécifique des enzymes est beaucoup plus élevée avec le NADH (courbes pleines) qu'avec du NADPH (courbes en pointillées) sur la gamme de concentration en hydroxypyruvate de 100-900 μM . En utilisant l'hydroxypyruvate et NADH, l'enzyme PyaGRHPR est la plus active. La tendance est la même en présence de NADPH. Il est ainsi possible de les désigner comme des hydroxypyruvate réductases (HPR) qui utilisent le préférentiellement NADH comme cofacteur.

Pour confirmer les résultats obtenus sur des enzymes recombinantes, l'activité réductase a été mesurée sur des extraits bruts de *P. horikoshii*. Les *Pyrococcales* sont produites à Brest dans le laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes (LM2E) du Pr. Jebbar (UMR 6197 IFREMER/UBO/CNRS). Ces archées ont un taux de croissance beaucoup plus bas que la bactérie *E. coli*. De ce fait, les mesures ont été faites uniquement sur *P. horikoshii* car c'était la seule que nous pouvions avoir en quantité suffisante. Les mesures ont été faites sur des lysats à 85 °C en conditions saturantes de substrat et cofacteur, c'est à dire dans des conditions très supérieures au K_m . Chaque valeur a été normalisée par l'activité de l'extrait brut avec le cofacteur (Tableau 4.2).

	Hydroxypyruvate		Glyoxylate	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Activité ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	23 +/- 12	ND	15 +/- 8	ND
k_{cat} (s^{-1})	4,4 +/- 0,5	0,6 +/- 0,04	3,9 +/- 0,4	0,6 +/- 0,02

Tableau 4.3. Mesures d'activité sur un extrait brut de *P. horikoshii* après lyse des cellules. Les mesures ont été effectuées en triplicats et à 85 °C. Les concentrations en substrat et cofacteurs étaient saturantes et au moins 5 fois supérieures au K_M calculé pour l'enzyme recombinante : glyoxylate et hydroxypyruvate, 2 mM, NADH et NADPH, 0,45 mM.

Ces résultats semblent confirmer ceux obtenus avec l'enzyme recombinante concernant la préférence des GRHPR pour le cofacteur NADH.

Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, les paramètres cinétiques de la GRHPR de *P. horikoshii* avaient été déterminés lors de la détermination de la structure (Yoshikawa et al., 2007). Les valeurs obtenues dans cette publication et qui avaient conduit les auteurs à définir cette enzyme comme étant une glyoxylate réductase, sont comparées aux valeurs obtenues durant ma thèse dans le tableau 4.4. Il est à noter que ces données ont été obtenues en effectuant des mesures à différentes concentrations en cofacteur uniquement (0,005-0,2 mM) et en condition d'excès de substrat (20 mM de glyoxylate et 3 mM d'hydroxypyruvate). Dans certains cas, cela correspond à des conditions d'inhibition par excès de substrat. Les barres d'erreurs ne sont pas fournies par les auteurs.

	Glyoxylate		Hydroxypyruvate	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
K_M cofacteurs (μM)	15*	21*	13*	25*
	40 +/- 5	30 +/- 5	70 +/- 5	90 +/- 10
k_{cat} (s^{-1})	11*	2,4*	4,1*	1,8*
	3,9 +/- 0,04	0,6 +/- 0,02	4,4 +/- 0,5	0,6 +/- 0,04

Tableau 4.4. Comparaison des paramètres cinétiques obtenus pour PhoGRHPR. *Données extraites de la publication de Yoshikawa *et al.* en 2007.

En ce qui concerne les valeurs de K_M obtenues pour les cofacteurs, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment. Il est difficile d'aller plus loin dans la comparaison car aucune barre d'erreurs n'est donnée et ne permet pas d'estimer la marge de confiance. Dans le cas des k_{cat} , ce paramètre est usuellement déterminé en faisant varier le

substrat et non le cofacteur. Il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues précédemment à celle de notre étude.

En conclusion, à pression atmosphérique, les 3 GRHPR des *Thermococcales* sont des hydroxypyruvate réductases qui utilisent le NADH comme cofacteur. Comme indiqué en introduction de ce chapitre, nous avons cherché à corréler ces résultats biochimiques à des explications moléculaires. Pour cela, nous avons donc entrepris une étude structurale par cristallographie des rayons X conventionnelle.

4.3. Détermination de la structure cristalline des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de *P. furiosus* et *P. yayanosii*.

Avant d'entrer dans le détail des déterminations structurales de PfuGRHPR et PyaGRHPR, il convient de rappeler que la structure de PhoGRHPR a été déterminée par Yoshikawa *et al* (Code PDB : 2DBQ, 2DBR et 2DBZ). Ces structures, à 1,70 Å, 2,61 Å et 2,45 Å de résolution respectivement, correspondent toutes à une forme holo de l'enzyme en complexe binaire avec le NADPH. Ce complexe a été obtenu alors que une étape de trempage dans une solution contenant 3 mM de NADH a été réalisée avant l'étape de cryocongélation.

4.3.1. Cristallogénèse des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

Après vérification de l'homogénéité de la protéine par chromatographie d'exclusion de taille (cf. chapitre 2), la solution protéique est concentrée jusqu'à 10 mg.ml⁻¹ (Tampon 20 mM Tris HCl 150 mM NaCl pH 7,5). Les conditions initiales de cristallisation ont été obtenues après crible sur le robot de cristallisation nanogouttes du HTX lab de l'EMBL, Grenoble. J'ai optimisé manuellement ces conditions initiales.

Dans le cas PfuGRHPR, cette protéine cristallise très facilement puisque l'optimisation des conditions a permis d'obtenir des cristaux dans trois conditions différentes: en présence de PEG 400, de sulfate d'ammonium et de MPD (Figure 4.7). Le faciès des cristaux est le même pour les trois conditions.

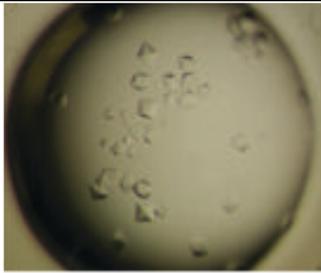
18 % PEG 400	
100 mM NaCl	
100 mM Acétate de sodium pH 5,2	
[P] = 10 mg.ml-1	
2 jours	
Cryo-protectant : 30 % PEG 400	400x400 µm
8 % MPD	
100 mM NaCl	
100 mM Acétate de sodium pH 4,5	
[P] = 10 mg.ml-1	
2 jours	
Cryo-protectant : 30 % MPD	400x400 µm
1,8 M Sulfate d'ammonium	
100 mM Acétate de sodium pH 4,5	
[P] = 10 mg.ml-1	
2 jours	
Cryo-protectant : 30 % glycérol	400x400 µm

Figure 4.7. Conditions de cristallisation des cristaux de PfuGRHPR. Les photos montrent la morphologie des cristaux obtenus.

Pour la cryo-protection des cristaux, j'ai utilisé, quand cela était possible, directement la liqueur mère en augmentant la concentration de l'agent précipitant (cas du PEG400 et du MPD). Dans le cas de la condition de cristallisation en présence de sulfate d'ammonium, j'ai utilisé du glycérol comme cryo-protectant.

En vue d'une détermination de la structure de PfuGRHPR par phasage *de novo*, j'ai entrepris des essais de co-cristallisation en présence de 3 complexe de lanthanides : Gd-DO3A, Gd-HPDO3A et Gd-DTPA-BMA afin d'obtenir les cristaux dérivés nécessaires. Ces complexes sont développés au sein de l'équipe ELMA à l'IBS et permettent d'exploiter la forte diffusion anormale des atomes de lanthanide (dans le cas présent, l'atome de gadolinium,

Gd) (Girard, Stelter, Vicat, & Kahn, 2003). Toutefois, seuls des cristaux en présence de 100 mM du complexe Gd-DTPA-BMA ont été obtenus par co-cristallisation. J'ai donc aussi réalisé des trempages de cristaux natifs pendant 40 min dans des solutions correspondant à la liqueur mère et contenant 100 mM de chacun des complexes. Je n'ai pas observé de dégradation du faciès des cristaux natifs lors de ces différents trempages.

Dans le cas de PyaGRHPR, une seule condition initiale a été obtenue après criblage qui, après optimisation conduit aux cristaux présentés sur la figure 4.8. Pour la cryo-protection, j'ai testé différents cryo-protectants et c'est le PEG400 qui a donné les meilleurs résultats.

1,5 M Malonate pH 7,0	
[P] = 10 mg.ml-1	
2 jours	
Cryo-protectant : 30 % PEG 400	
500x100 µm	

Figure 4.8. Conditions de cristallisation des cristaux de PyaGRHPR. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

4.3.2. Enregistrement et traitement des données de diffraction des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

Pour PfuGRHPR, les données de diffraction ont été enregistrées sur la ligne de lumière PROXIMA 1 à SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE). Nous avons pu enregistrer des données pour les trois conditions de cristallisation. Celle contenant du PEG 400 a permis d'obtenir la meilleure résolution (1,4 Å), contre 1,7 Å pour les conditions en présence de sulfate d'ammonium ou de MPD. Pour résoudre la structure *de novo*, nous avons, de plus, enregistré différents jeux de données SAD (Single-wavelength anomalous diffraction) sur les cristaux co-cristallisés avec du Gd-DTPA-BMA et ceux issus des trempages avec d'autres complexes de lanthanides (Gd-HPDO3A et Gd-DO3A).

Les données sont intégrées et mise à l'échelle comme décrit dans le chapitre 2. Les statistiques obtenues sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Dans le cas des cristaux dérivés, celui obtenu par trempage en présence de Gd-HPDO3A présentait le signal anomal le plus important. Par conséquent, je ne reporte que les statistiques correspondant à ce jeu de données SAD (Tableau 4.3).

	PfuGRHPR, PEG 400	PfuGRHPR, SA	PfuGRHPR, MPD	PfuGRHPR, SAD
Longueur d'onde (Å)	0,9796	0,9796	0,9796	1,7112
a,b,c (Å)	114,58 - 114,58 - 118,12	115,59 - 115,59 - 118,67	114,88 - 114,88 - 118,69	115,56 - 115,56 - 118,99
Groupe d'espace	I4 ₁	I4 ₁	I4 ₁	I4 ₁
Résolution (Å)	47,73 - 1,40 (1,48-1,40)	48,02 - 1,70 (1,79 - 1,70)	47,92 - 1,70 (1,79 - 1,70)	48,10 - 2,10 (2,21 - 2,10)
Réflexions uniques	148 562 (21 010)	85 668 (12 229)	84 493 (12 188)	45 355 (6 372)
R _{sym} (%)	4,6 (108)	6,1 (54,3)	5,8 (85,9)	5,3 (14,6)
R _{pim} (%)	2,3 (57)	2,4 (21,1)	2,2 (33,1)	5,5 (14,6)
CC _{1/2} (%)	100,0 (54,0)	100,0 (76,0)	100 (41,2)	100,0 (93,0)
I/σ(I)	14,3 (1,7)	16,7 (3,2)	17,6 (2,3)	12,6 (4,2)
Multiplicité	3,7 (3,2)	6,8 (6,5)	6,8 (6,6)	4,9 (3,3)
Complétude (%)	99,4 (96,59)	99,9 (98,4)	99,9 (98,4)	99,2 (95,8)
R _{ano}				2,19

Tableau 4.5. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de PfuGRHPR.

Comme on pouvait s'y attendre compte tenu de leur morphologie similaire, les cristaux issus des trois conditions de cristallisation présentent le même groupe d'espace. J'ai déterminé les structures pour les trois conditions, mais j'ai choisi la condition en PEG 400 comme structure de référence puisque c'est celle qui diffracte à plus haute résolution. Le coefficient de Matthews indique la présence de 2 monomères dans l'unité asymétrique avec 51 % de solvant. Ce coefficient est calculé de manière théorique avec la séquence protéique en supposant 50 % de solvant dans l'unité asymétrique. C'est lors du phasage que l'on vérifie si le nombre de monomère prédit par le coefficient de Matthews est correct.

Pour déterminer la structure de PyaGRHPR, nous avons enregistré des données de diffraction sur la ligne de lumière BM30A-FIP à l'ESRF (Installation européenne de

rayonnement synchrotron). Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont données dans le tableau ci-dessous.

	PyagrHPR, 100K
Longueur d'onde (Å)	0,9796
a,b,c (Å)	141,06 - 141,06 - 260,79
Groupe d'espace	P6 ₂ 22
Résolution (Å)	47,97 – 2,00 (2,11 - 2,00)
Réflexions uniques	103 194 (14 794)
R _{sym} (%)	17,0 (188,0)
R _{pim} (%)	6,2 (68,3)
CC _{1/2} (%)	100,0 (52,7)
I/σ(I)	11,7 (1,4)
Multiplicité	7,3 (7,3)
Complétude (%)	99,8 (99,3)

Tableau 4.6. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de PyagrHPR.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de 4 monomères dans l'unité asymétrique avec 49 % de solvant.

4.3.3. Détermination et affinement de la structure de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductase de *P. furiosus*

Dans le cas de PfuGRHPR, pour résoudre le problème de phase, nous avons souhaité utiliser des complexes de lanthanides. Il est ainsi possible de s'affranchir du biais introduit par l'utilisation d'un modèle comme dans le cas d'une détermination de structure par remplacement moléculaire. De plus, c'était l'occasion d'utiliser cet outil de phasage développé dans l'équipe et de me former au phasage *de novo*.

La structure de PfuGRHPR a donc été déterminée par la méthode SIRAS (Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering) en combinant le jeu de données anormales mesuré sur le cristal dérivé en présence du complexe Gd-HPDO3A et le jeu de données natif obtenu sur le cristal ayant poussé en présence de PEG 400. La détermination

des phases a été réalisée avec la suite *SHELX-CDE* incluse dans CCP4 (Sheldrick, 2010). Nous avons commencé par prévoir 2 monomères dans l'unité asymétrique en considérant une proportion de solvant de 51 %. Après des échecs répétés, nous avons essayé avec 1 monomère dans l'unité asymétrique en considérant une proportion de solvant de 75 %. Le programme SHELX-D a permis de déterminer la présence de 6 sites de fixation du complexe de gadolinium. L'affinement des coordonnées des atomes de Gd, ainsi que la détermination du jeu initial de phases, ont été effectués dans SHELX-E donnant une valeur finale de 0,907 pour la figure de mérite. L'amélioration des phases a été reprise à l'aide du programme DM (Cowtan & Zhang, 1999) de la suite CCP4 en considérant une proportion de solvant de 75 %. Une reconstruction automatique du modèle par le logiciel *BUCCANEER* (Cowtan, 2006) n'a pas donné les résultats escomptés compte tenu de la résolution des données. Seuls 227 résidus sur les 333 qui composent la protéine ont été modélisés (70 %). Le reste du modèle a donc été reconstruit manuellement dans *COOT* (Emsley et al., 2010). L'affinement a été mené selon le protocole décrit dans le chapitre 2. En fin d'affinement, j'ai obtenu un R_{factor} de 13,30 % et un R_{free} de 14,88 % et les statistiques d'affinement sont regroupées dans le tableau 4.5.

	PfuGRHPR, 100 K
Résolution (Å)	40,51- 1,40
R _{factor} (%)	13,6
R _{free} (%)	14,5
Nombres de réflexions utilisées	148 486
Composition (nombre d'atomes)	
Protéine	2956
H ₂ O	432
Ligands	150
Res. hors Ramachandran (%)	0,0
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,010
Liaisons angles (°)	1,50
B _{moyen} protéine (Å ²)	27,3
B _{moyen} eau (Å ²)	45,1
B _{moyen} ligands (Å ²)	31,9

Tableau 4.7. Statistiques d'affinement pour la structure de PfuGRHPR à 100 K.

J'ai identifié deux densités électroniques résiduelles dans le site actif que j'ai modélisé comme étant un cofacteur NADPH et une molécule de substrat (ou de produit) à 5 atomes compatible avec du glyoxylate. Les deux ligands ont été affinés avec un taux d'occupation final de 1 (et des facteurs d'agitation thermique en accord avec les résidus qui les coordonnent). En plus des ligands et de la protéine, j'ai aussi modélisé 433 molécules d'eau par monomère, des molécules de PEG et de glycérol.

4.3.4. Détermination et affinement de la structure de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductase de *P. yayanosii*

J'ai déterminé la structure de PyaGRHPR par la méthode du remplacement moléculaire avec le programme PHASER (McCoy et al., 2007). Le modèle de départ était le

monomère sous forme de Polyala de la GRHPR de *Pyrococcus horikoshii* (PDB ID 2DBR) qui partage 84 % de similarité de séquence avec PyaGRHPR. En recherchant un monomère dans l'unité asymétrique, les statistiques de PHASER étaient concluantes, sans être très élevées, avec des valeurs de 672 et 11,6 pour le LLG et TFZ respectivement.

J'ai ensuite amélioré les phases fournies par PHASER avec le logiciel DM en considérant une proportion de solvant de 49 % déterminée par le programme MATTHEWS (Kantardjieff & Rupp, 2003). Ensuite, sur la base de ce jeu de phases améliorées, j'ai utilisé le programme BUCCANEER (Cowtan, 2006) pour reconstruire de manière automatisée le modèle. Le logiciel a réussi à reconstruire 105 résidus sur les 333 qui composent la protéine (30 % du modèle) répartis en 13 chaînes parfois redondantes et n'appartenant pas toutes à la même unité asymétrique. Par conséquent, le monomère entier a été manuellement reconstruit dans COOT (Emsley et al., 2010). Lors du premier tour d'affinement, les statistiques $R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ étaient un peu élevées (32,20-35,6% respectivement) qu'escomptées pour des données à 2,0 Å de résolution. Ceci semblait indiquer que le modèle ne représentait pas correctement les données de diffraction. La protéine PyaGRHPR est présente sous forme de dimère en solution. En superposant le dimère de PhoGRHPR, nous avons reconstruit le dimère de PyaGRHPR. La réduction de 6 points des statistiques $R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ lors du second affinement a confirmé notre hypothèse.

Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

	PyGRHPR, 100 K
Résolution (Å)	44,58 – 2,00
R _{factor} (%)	15,1
R _{free} (%)	17,9
Nombres de réflexions utilisées	103 119
Composition (nbre d'atomes)	
Protéine	5334
H ₂ O	670
Ligands	269
Res. hors Ramachandran (%)	0,3
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,012
Liaisons angles (°)	1,52
B _{moyen} protéine (Å ²)	40,8
B _{moyen} eau (Å ²)	53,5
B _{moyen} ligands (Å ²)	66,7

Tableau 4.8. Statistiques d'affinement pour la structure de PyGRHPR à 100 K.

Comme dans le cas de PfuGRHPR, nous avons observé au niveau du site catalytique une densité résiduelle correspondant au substrat/produit et au cofacteur. Le cofacteur a été identifié rapidement comme étant du NADP(H). Nous avons modélisé une molécule de substrat (ou de produit) à 7 atomes compatible avec de l'hydroxypyruvate. En plus des ligands et de la protéine, j'ai aussi modélisé 670 molécules d'eau par monomère, des molécules de malonate et de glycérol.

4.4. Analyse des structures

4.4.1. Description du repliement des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

Cette protéine est un homodimère de 33 kDa comportant deux domaines, l'un de fixation du NADH, de type Rossman fold, NBD pour « NADH binding domain » ou domaine de fixation du NADH et l'autre de fixation du substrat, de type flavodoxin-like fold, SBD pour « Substrate binding domain » ou domaine de fixation du substrat. (Figure 4.9).

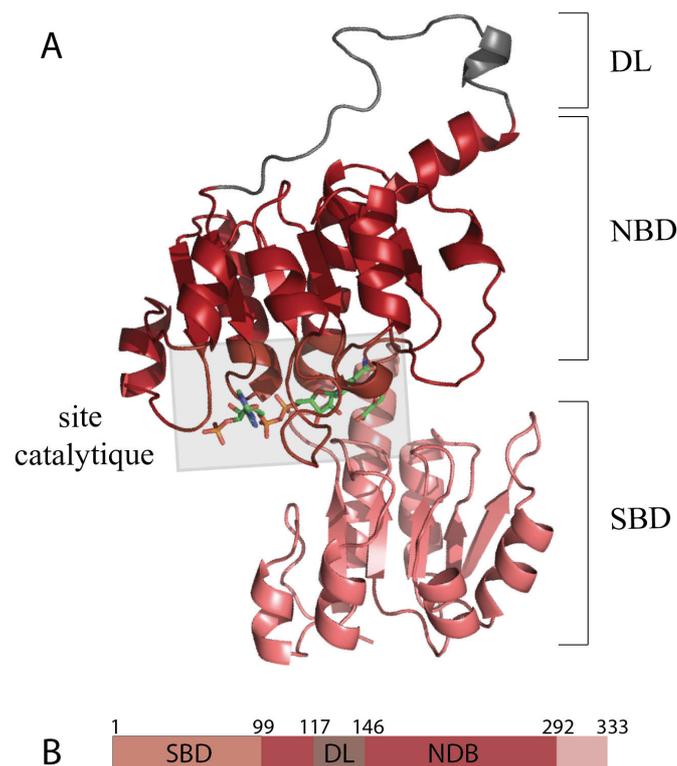


Figure 4.9. Représentation de la structure des GRHPR. (A) Représentation en cartoon du monomère de GRHPR. Le site catalytique est situé à l'interface du domaine SBD (rose) et NBD (rouge). La boucle de dimérisation (DL) est indiquée en gris. (B) représentation de la séquence et des différents acides aminés.

Lors de l'association du dimère, la boucle de dimérisation (DL) vient au contact de la cavité catalytique L'interface dimérique est formée par les résidus du domaine NDB.

Le premier complexe ternaire a été obtenu dans la structure (Code PDB : 2GCG) de la GRHPR humaine (Booth et al., 2006). Auparavant, la seule structure de GRHPR disponible était la structure sous forme apo de la D-glycérate déshydrogénase (GDH) de *Hyphomicrobium methylovorum* (Goldberg, Yoshida, & Brick, 1994)(Code PDB : 1GDH). La comparaison de la structure holo et apo montrent un mouvement du domaine SBD qui se traduit par une diminution de l'ouverture angulaire du site actif (Figure 4.10).

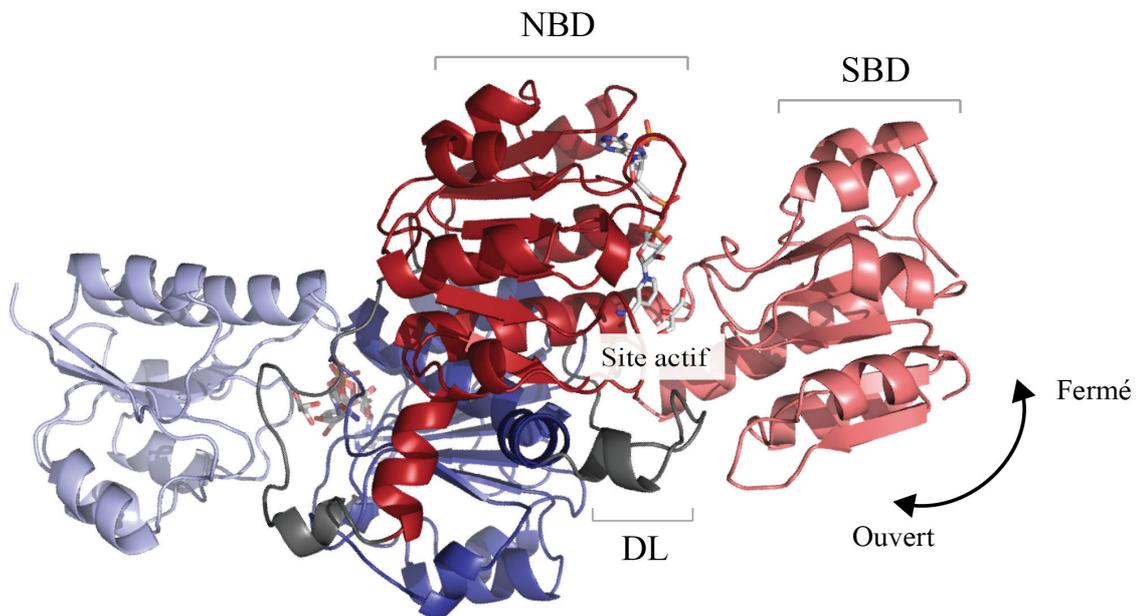


Figure 4.10. Représentation du dimère des GRHPR. Le domaine NBD (domaine de fixation du NADPH) est largement impliqué dans l'interface ainsi que la boucle de dimérisation (DL). Le site actif se situe à l'interface du domaine NBD et SBD (domaine de fixation du substrat). Lors de la fixation du cofacteur, le SBD se rapproche du NBD provoquant la fermeture du site actif.

Cette distinction entre la forme apo et holo est retrouvée chez d'autres enzymes de la famille des déshydrogénases (Kumar et al., 2002; Lamzin, Dauter, Popov, Harutyunyan, & Wilson, 1994). En 2007, la structure cristallographique de la GRHPR de *P. horikoshii* a été déterminée en complexe binaire avec une molécule de NADPH (Yoshikawa et al., 2007).

4.4.2. Thermostabilité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductase des espèces de *Pyrococcus*

La température optimale d'activité est de 85 °C pour les enzymes PfuGRHPR, PhoGRHPR et PyaGRHPR. Les enzymes maintiennent 100 % de leur activité même après une incubation de 2 h à 95 °C. En comparaison, l'enzyme GDH de la bactérie mésophile *Hyphomicrobium methylovorum* (HmeGDH) n'est plus active après une incubation de 30 min à 40 °C (Izumi et al., 1990).

Les facteurs structuraux contribuant à la thermostabilité de PhoGRHPR ont été détaillés par Yoshikawa *et al.* (Yoshikawa et al., 2007). Les auteurs mettent en avant un pourcentage plus important de résidus chargés chez PhoGRHPR que chez HmeGDH ou que chez la GRHPR humaine, hGRHPR (33 %, 24 % et 26 % respectivement). Cette caractéristique est conservée chez PfuGRHPR et PyaGRHPR dont la séquence comporte 32 % de résidus chargés (Asp, Arg, Glu, His et Lys).

La superposition de la structure de PyaGRHPR et de hGRHPR, avec le programme *THESEUS*, permet de mettre en évidence une extension de la région C-terminal, d'une dizaine de résidus, dans la structure de PyaGRHPR (Figure 4.11).

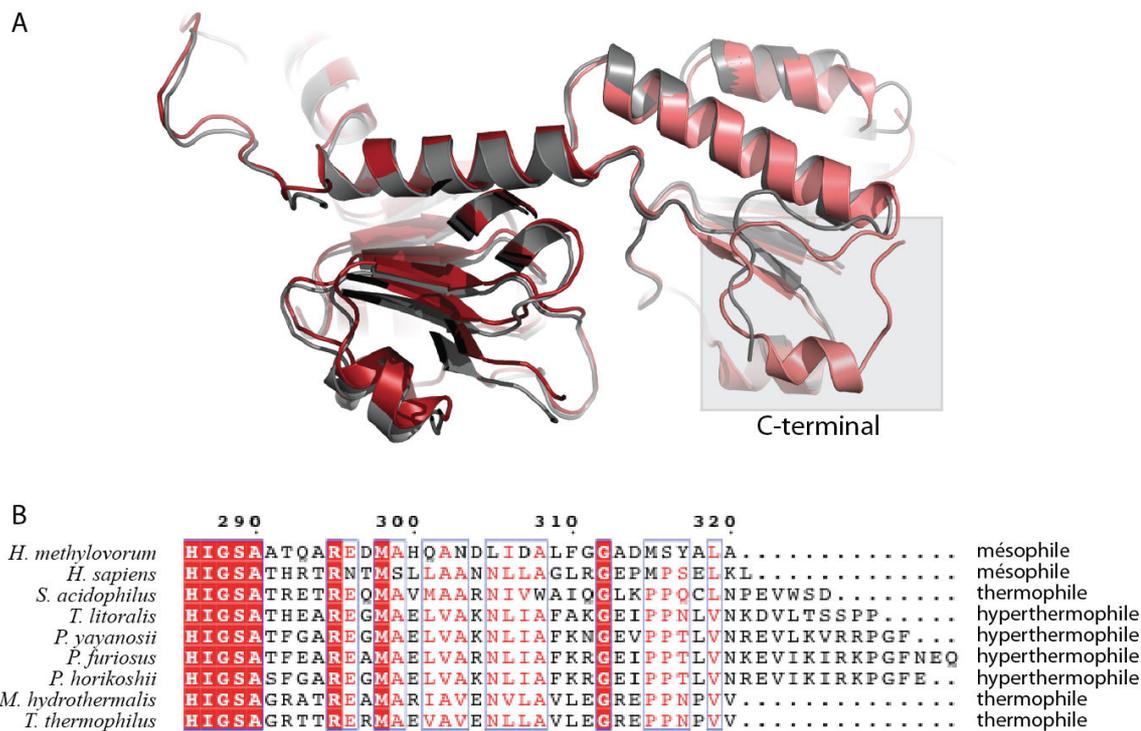


Figure 4.11. Superposition de la région C-terminale des GRHPR. (A) Représentation en cartoon de la superposition avec le programme THESEUS du monomère de PyaGRHPR (rouge) et de hGRHPR (gris). L'extension C-Terminal présente dans la structure PyaGRHPR est indiquée par le rectangle gris. (B) Extrait de l'alignement de séquence de différentes GRHPR disponible en annexe (cf. Annexe 4.3). Le caractère thermophile de l'organisme d'origine est indiqué pour chaque enzyme.

La superposition du squelette carboné sur l'ensemble du monomère montre que cette extension qui appartient au domaine SBD est structurée en hélice alpha. Cette extension est aussi présente chez PhoGRHPR et PfuGRHPR. L'extension de la partie C-terminal a déjà été décrite comme participant à la stabilisation de l'architecture à haute température (Vielle & Zeikus, 2001). En effet, une recherche par similarité de séquence dans la Protein Data Bank à partir de la séquence de PfuGRHPR permet de voir que cette extension est présente chez la majorité des GRHPR issues des *Thermococcales* (Figure 4.12.B). Elle est aussi présente chez les GRHPR provenant d'autres archées hyperthermophiles (*Ignisphaera aggregans* et *Aeropyrum pernix*). Par contre, elle est absente des GRHPR thermophiles de *Marinithermus hydrothermalis*, *Sulfobacillus acidophilus* et *Thermus thermophilus*, ainsi que des mésophiles *Hyphomicrobium methylavorum* et l'humain (Figure 4.12 et cf. Annexe 4.3). Il semble donc que cette extension structurée du C-terminal participe à la stabilité face aux très hautes températures des GRHPR provenant de *Thermococcales*.

4.4.3. Analyse du mécanisme d'action des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

Une comparaison entre les structures cristallines du complexe ternaire (D-glycérate et NADPH) et du complexe binaire (NADPH) de l'enzyme humaine a permis de jeter les bases du mécanisme de reconnaissance des substrats (Booth et al., 2006). Ces auteurs ont montré qu'il n'existe pas de modifications majeures de la structure du site actif entre le complexe ternaire et le complexe binaire. La superposition du dimère de PyaGRHPR (complexe ternaire D-glycérate et NADPH) avec le dimère AB de la structure de la GRHPR humaine (hGRHPR) à l'aide du programme THESEUS donne une déviation de la racine de la moyenne des carrés (RMSD) de 1,3 Å (Theobald & Steindel, 2012). Les résidus du site catalytique se superposent très bien et permettent de faire une comparaison détaillée du mode de fixation du D-glycérate et du NADPH. Dans l'ensemble, les interactions entre l'enzyme et le substrat et le cofacteur, décrites chez hGRHPR, sont conservées dans la structure de PyaGRHPR (Figure 4.12). Dans la suite de la discussion, la numérotation indiquée sera celle de PyaGRHPR.

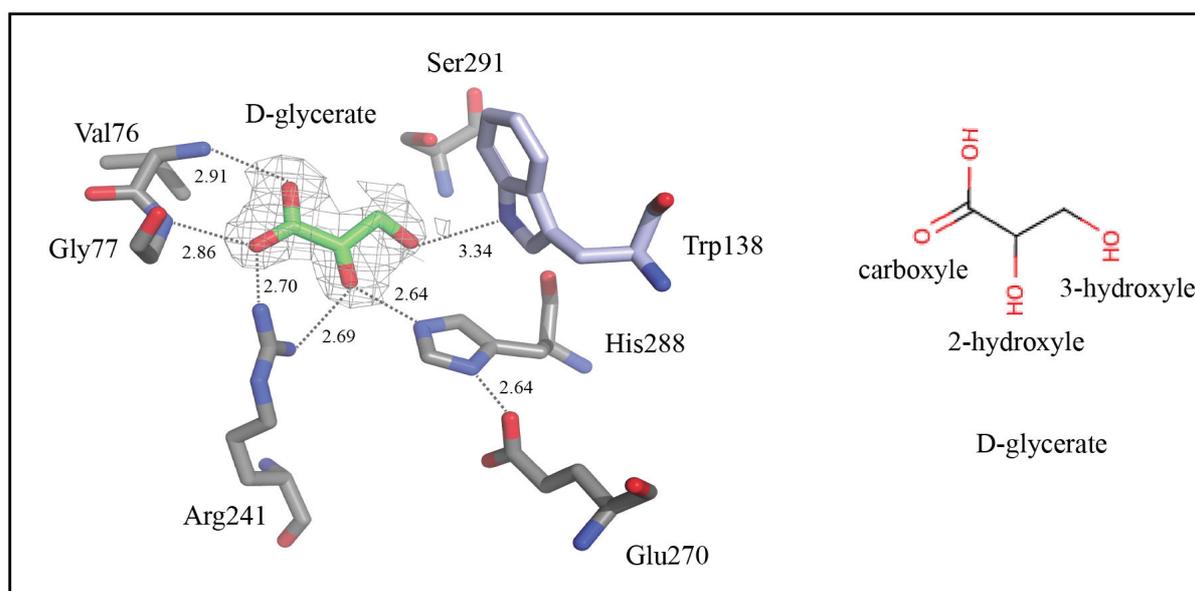


Figure 4.12. Représentation du site actif de PyaGRHPR. Le D-glycérate est représenté avec la carte de densité électronique $2F_{obs}-F_{calc}$ (contour à 1σ). Le Trp138 provient du monomère adjacent. Structure du D-glycérate.

L'histidine réactive, His288, forme une liaison hydrogène avec le groupe 2-hydroxyle du D-glycérate. L'orientation de His288 est maintenue grâce à une interaction avec Glu 270 qui contribue à rehausser le pKa de l'histidine. L'Arg241 maintient et oriente le substrat par

deux liaisons hydrogène avec le groupe 2-hydroxyle et le carboxyle de celui-ci. La partie carboxylate forme aussi des interactions avec les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus Val76 et Gly77. Le groupe 3-hydroxyle forme une liaison hydrogène avec Ser291 et l'azote du groupe imidazole de Trp138 (du monomère adjacent) via une molécule d'eau chez hGRHPR. Par contre, dans la structure de PyaGRHPR, l'interaction se fait directement entre le groupe 3-hydroxyle du substrat et le Trp138 (3,34 Å). De plus, l'interaction de la sérine avec le substrat n'est plus présente. Nous avons comparé les distances des interactions décrites précédemment entre la structure de PyaGRHPR et de hGRHPR. Nous n'avons pas identifié de différences significatives dans les interactions conservées.

Lors de l'analyse des structures, nous considérons que la molécule présente dans le site actif est un produit. Bien que du point de vue cristallographique il soit impossible de distinguer entre substrat et produit, nous avons suivi le raisonnement de Booth *et al.* qui propose que le substrat ayant été incubé avec l'enzyme, la réaction de réduction a du avoir lieu. Dans notre cas, le complexe ternaire s'étant probablement formé chez *E. coli* puisque qu'aucun trempage n'a été effectué postérieurement, le choc thermique durant la purification de l'enzyme a du favoriser l'apparition du produit.

En ce qui concerne la structure de PfuGRHPR, il s'agit de la première structure d'une GRHPR en complexe ternaire avec du glycolate (produit du glyoxylate) et du NADPH. La molécule de glycolate est située et orientée comme celle de D-glycérate dans la structure de PyaGRHPR (Figure 4.13)

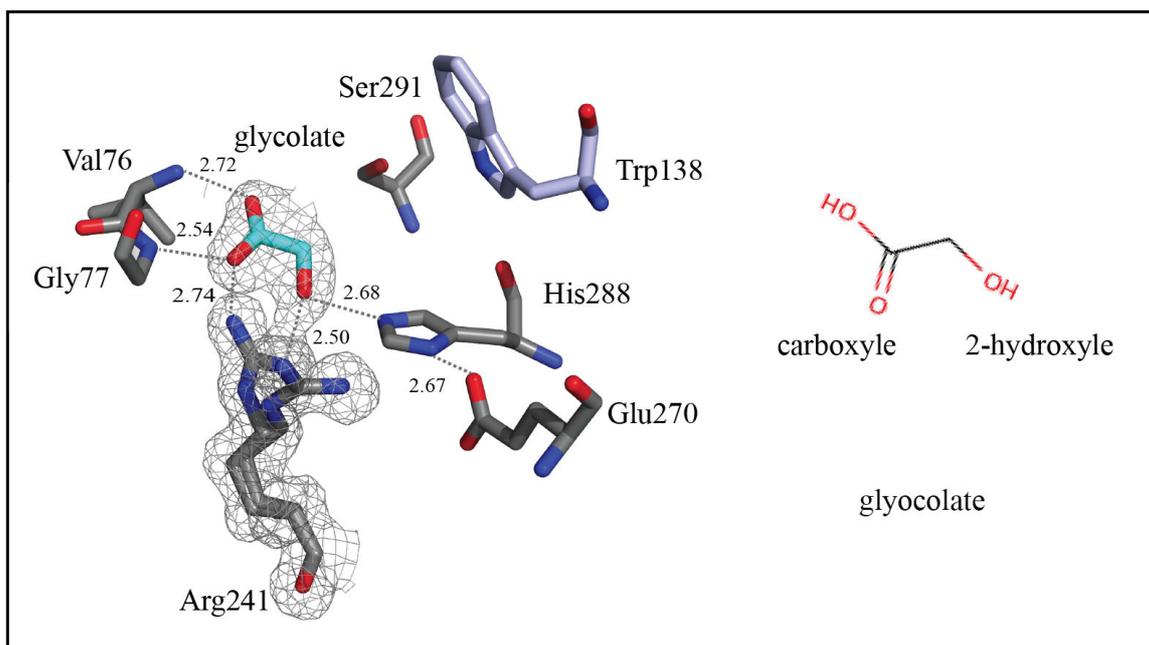


Figure 4.13. Représentation du site actif de PfuGRHPR. Le glycolate est représenté avec la carte de densité électronique $2F_{obs}-F_{calc}$ (contour à 1σ), ainsi que les deux conformations de l'Arg241. Le Trp138 provient du monomère adjacent. Structure du glycolate.

L'absence de groupe hydroxyméthyle sur la molécule de glycolate exclut l'interaction avec la Ser291 ou le Trp138. La diminution du nombre d'interactions entre le glycolate et l'enzyme par rapport au D-glycérate peut être mis en rapport avec la faible affinité des GRHPR pour le glyoxylate (Figure 4.4). La distance des interactions conservées est similaire entre le D-glycérate dans la structure de PyaGRHPR et le glycolate dans la structure de PfuGRHPR. Dans la structure de PfuGRHPR, l'Arg241 a une double conformation. Dans une conformation, elle interagit avec la molécule de glycolate dans l'autre, elle est orientée vers l'extérieur du site actif, à la surface de la protéine. En outre, la Leu53 subit aussi un changement de conformation entre la structure de PfuGRHPR et PyaGRHPR.

Pour comprendre les répercussions de ces changements, j'ai visualisé avec l'outil surface de PYMOL l'environnement autour de la Leu53. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.14.

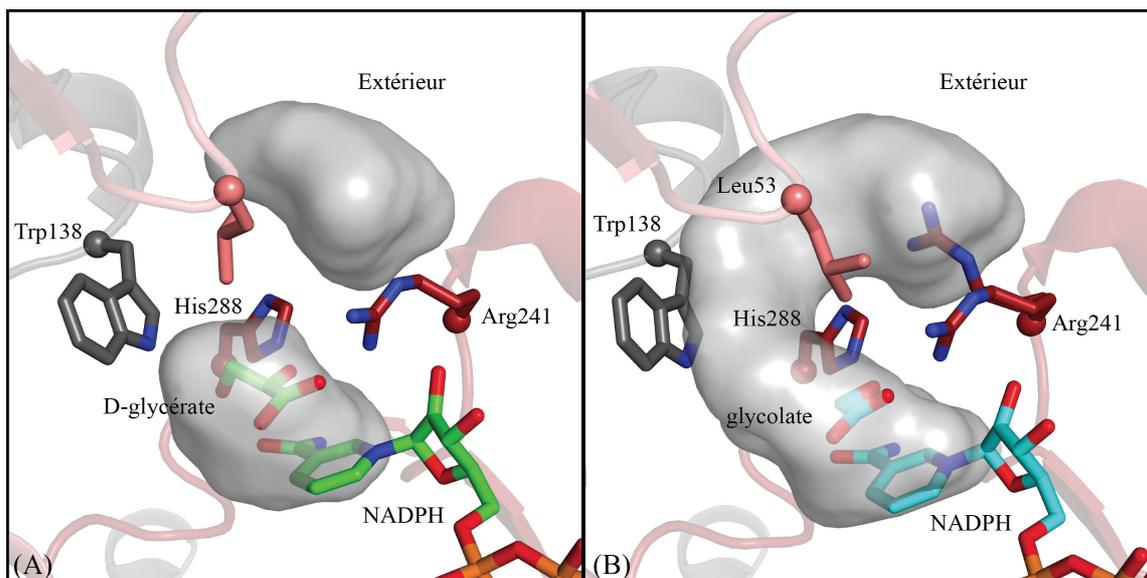


Figure 4.14. Visualisation de l'environnement de la Leu53. Le volume vide est représenté en gris. La numérotation des résidus suit celle de PyaGRHPR. (A) Site actif de PyaGRHPR. (B) Site actif de PfuGRHPR.

Le volume vide autour du résidu 53 est indiqué par la surface grise. Dans la structure de PyaGRHPR, le site actif ne communique pas avec l'extérieur. Par contre, on aperçoit dans la structure de PfuGRHPR l'ouverture d'un tunnel entre le site actif et l'extérieur. Ce tunnel est bordé par les résidus Trp138 et Leu53. En effet, la conformation alternative de la Leu53 chez PfuGRHPR participe à l'ouverture du tunnel. Le Trp138 est en retrait dans la structure de PfuGRHPR par rapport à sa position dans celle de PyaGRHPR (1,16 Å). La double conformation de l'Arg241 indique un mouvement de balancier entre le site actif et l'extérieur de la protéine.

La structure de PfuGRHPR permet donc de mettre en évidence une connexion entre le site actif et l'extérieur (Figure 4.15).

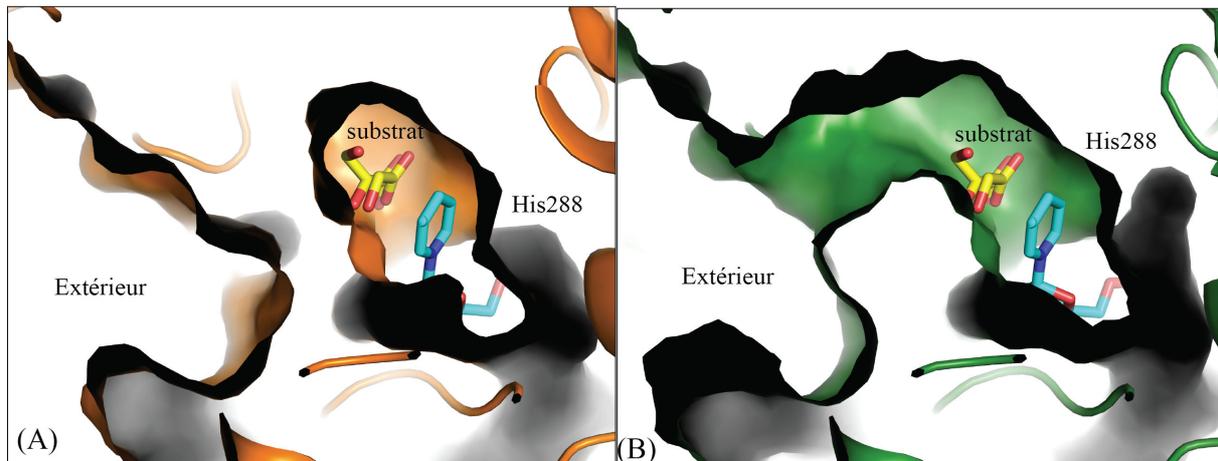


Figure 4.15. Accessibilité du site actif chez les GRHPR. (A) La surface de la structure de PyaGRHPR est représentée en orange. L'extérieur de la protéine se situe à gauche de l'image. (B) La surface de la structure de PfuGRHPR est représentée en orange. L'extérieur de la protéine se situe à gauche de l'image. Le tunnel ouvert vers l'extérieur est clairement visible dans la structure de PfuGRHPR.

De plus, nous avons identifié près du Trp138 de la densité électronique résiduelle qui ne correspond pas à des molécules d'eau ou de solvant (Tris, Na^+ , Cl^- , acétate ou PEG400). Nous avons modélisé une molécule de glycolate avec un taux d'occupation de 50 % (Figure 4.16).

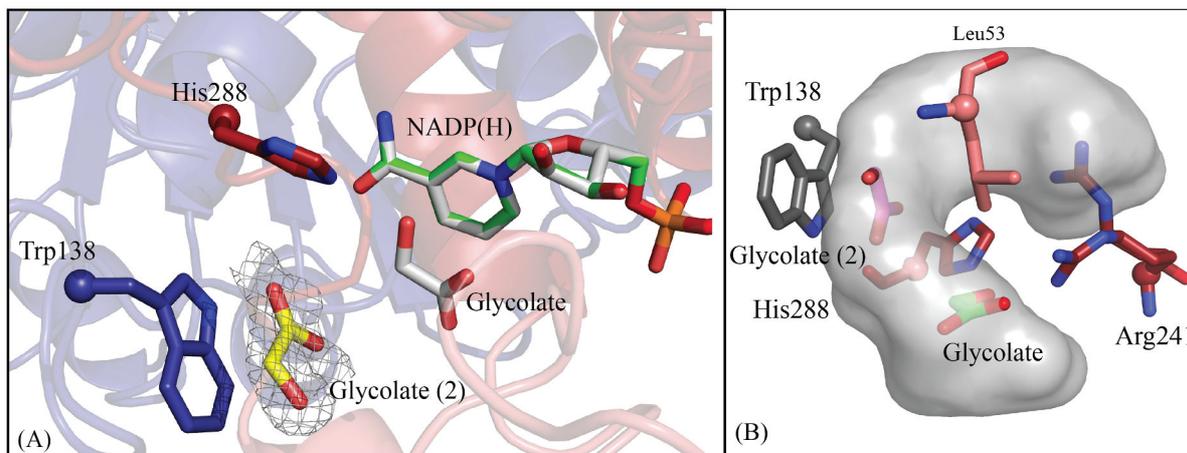


Figure 4.16. Représentation de la deuxième molécule de glycolate dans le site actif de PfuGRHPR. (A) Le glycolate est représenté avec la carte de densité électronique $2F_{obs}-F_{calc}$ (contour à 1σ). Le Trp138 provient du monomère adjacent. (B) Visualisation de l'environnement de la Leu53. Le volume vide est représenté en gris. La numérotation des résidus suit celle de PyaGRHPR.

La deuxième molécule de glycolate se situe à l'intérieur du tunnel décrit précédemment, entre le Trp138 et la Leu53.

La présence d'une seconde molécule de glycolate dans le tunnel nous amène à former une hypothèse quant au mécanisme catalytique des GRHPR. L'analyse des structures cristallographiques a montré que la fixation du cofacteur induisait la fermeture du site actif. Si la fixation des substrats intervient de manière ordonnée chez les GRHPR comme c'est le cas chez d'autres déshydrogénases, ce tunnel pourrait refléter le couloir d'entrée du substrat dans le site actif. Dans cette hypothèse, la seconde molécule de glycolate représenterait un intermédiaire dans le processus d'entrée du substrat. De plus, l'entrée (ou la sortie) du substrat/produit serait régulée par les résidus Trp138 et Leu53. Les fluctuations de la chaîne latérale de Arg 241 (chargée positivement) participeraient au cheminement du substrat (chargé négativement) au travers du tunnel via des interactions électrostatiques.

La dernière observation sur la structure de PfuGRHPR concerne un réseau de molécules d'eau dans le site actif (Figure 4.17).

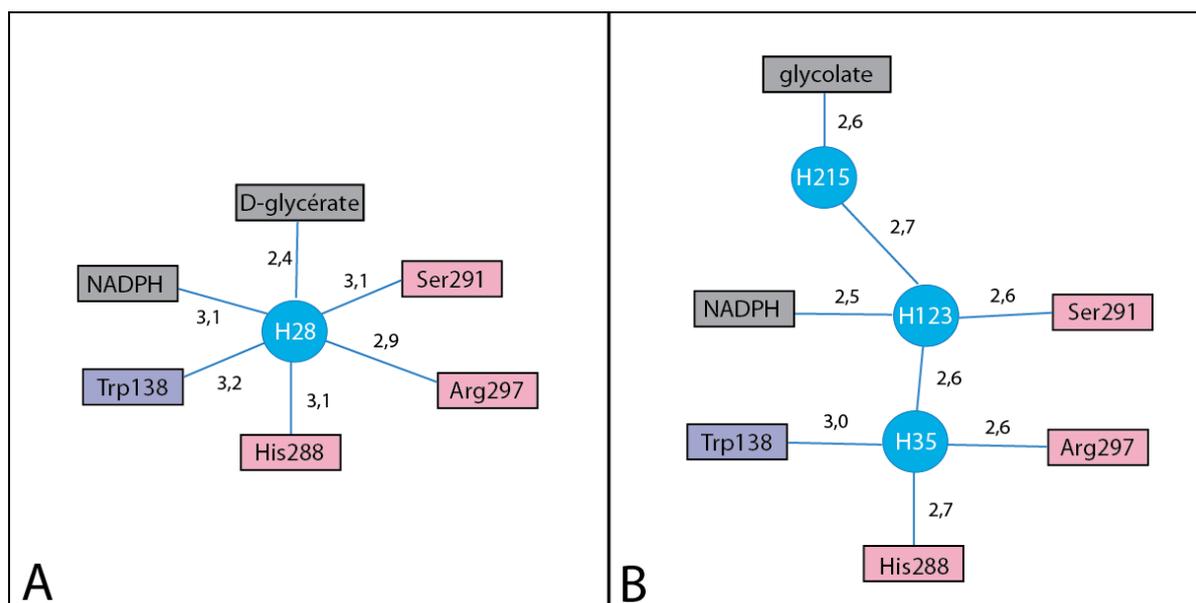


Figure 4.17. Représentation schématique du réseau de molécules d'eau dans le site actif de PyaGRHPR (A) et PfuGRHPR (B). Le Trp138 du monomère adjacent est indiqué en violet. Les molécules d'eau sont représentées en bleu. Les distances d'interactions sont indiquées en Å. La longueur des traits n'est pas proportionnelle à la longueur de la distance entre les résidus.

Nous observons un réarrangement des molécules d'eau dans le site actif de PfuGRHPR. La molécule d'eau H28, conservée dans la structure de PyaGRHPR et hGRHPR n'est plus visible dans la structure de PfuGRHPR. A la place, 3 molécules forment un réseau entre les résidus précédemment reliés par la molécule d'eau H28 chez PyaGRHPR. Les distances d'interactions sont plus courtes dans la structure de PfuGRHPR.

Précédemment, il a été proposé que la molécule d'eau H28 participe à la spécificité de l'enzyme par son interaction avec les résidus Trp138, Ser291 et Arg297 (Booth et al., 2006). En effet, la mutation de l'Arg297 en cystéine induit une réduction de l'activité glyoxylate réductase (5,8 % d'activité) et surtout abolit complètement l'activité hydroxypyruvate réductase (Cregeen, Williams, Hulton, & Rumsby, 2003). A partir de la détermination de la structure de hGRHPR, il a été proposé que la mutation Arg297Cys interrompe les interactions avec la molécule d'eau H28, la Ser291 et le Trp138. Nous avons identifié une double conformation de l'Arg297 dans la structure de PfuGRHPR. L'une est identique à l'Arg297 de PyaGRHPR, l'autre est positionnée différemment, mais ne modifie pas complètement les interactions avec la Ser291 et le Trp138. En effet, les azotes de l'Arg297 sont positionnés au même endroit dans l'une et l'autre des conformations.

Le réarrangement des molécules d'eau visible dans la structure de PfuGRHPR confirme les précédentes hypothèses sur l'importance de la molécule H28 dans la spécificité

de l'enzyme. De plus, nous proposons que les résidus Trp138 et Leu53 participent à la spécificité de l'enzyme en régulant l'entrée dans le site actif.

4.5. La place des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases dans le métabolisme des *Thermococcales*

Afin de pouvoir situer la place des GRHPR dans l'ensemble du métabolisme des *Pyrococcus* et des *Thermococcales* au regard de la spécificité fonctionnelle qui a été déterminée dans cette thèse, une étude de reconstruction du métabolisme a été entreprise sur la base de comparaison de séquences sur l'ensemble des génomes disponibles. Une recherche par similarité de séquence (BLAST) sur une série de 40 enzymes appartenant ou étant en lien direct avec le métabolisme carboné a été effectuée à partir des informations fonctionnelles se rapportant aux enzymes des *Pyrococcus*. Le modèle chez les archées *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* des voies métaboliques impliquées dans la consommation du glyoxylate et des composés C2 est proposé dans la figure 4.18.

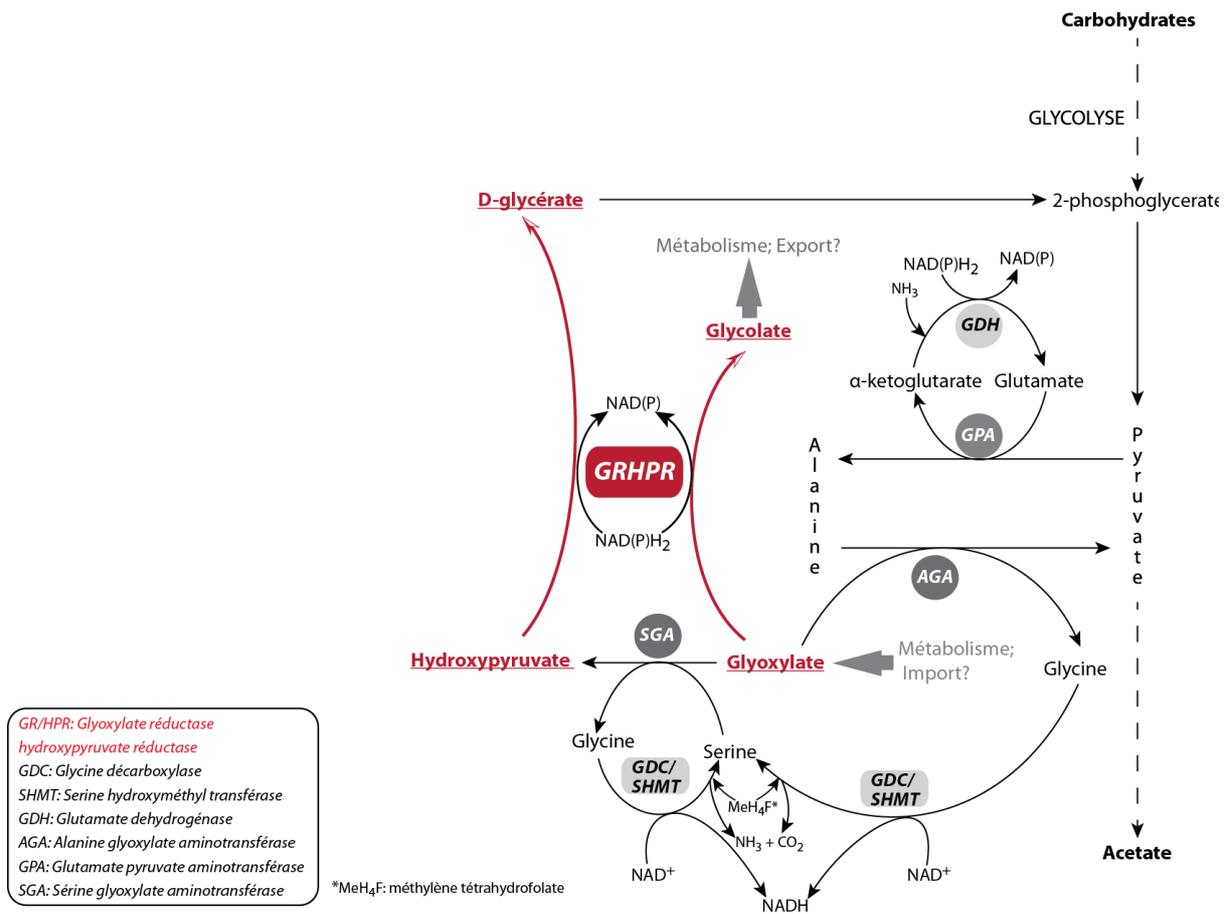


Figure 4.18. Proposition des voies métaboliques impliquées dans la consommation du glyoxylate et des composés C2 chez les archées *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii*

Ce modèle permet de positionner les GRHPR comme étant un lien entre le début de la glycolyse et les enzymes du complexe de la glycine décarboxylase dont la présence dans les génomes des *Thermococcales* a aussi été détectée.

4.6. Discussion

Le rôle et la véritable place des GRHPR n'étaient pas clairement définis dans le métabolisme des *Thermococcales*. Dans de précédentes études, les GRHPR archéennes ont été décrites plutôt comme des glyoxylate réductases (GR) que des hydroxypyruvate réductases (HPR) sans que cela soit relié à un potentiel rôle au niveau du métabolisme. (Ohshima et al., 2001; Yoshikawa et al., 2007). L'obtention des paramètres cinétiques pour l'ensemble des combinaisons cofacteur/substrat nous a permis de réattribuer l'identité fonctionnelle de ces enzymes. Les GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* sont des hydroxypyruvate réductases. Ces enzymes utilisent de manière préférentielle le NADH *in vitro*. Pour connaître le cofacteur utilisé dans la cellule, il faudrait connaître le ratio NADH/NADPH présent chez les Pyrococcales. L'analyse des paramètres cinétiques avait été conduit précédemment pour l'enzyme de *P. horikoshii* (Yoshikawa et al., 2007). Les valeurs obtenues par les auteurs concernant l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur sont en accord avec nos résultats. Cependant, dans cet article, les auteurs déterminent le k_{cat} en faisant varier uniquement le cofacteur. De plus, il utilise les valeurs de K_M des cofacteurs pour déterminer l'efficacité catalytique de PhoGRHPR. Ces choix expliquent nos divergences et le fait que les auteurs assignent cette enzyme comme étant une glyoxylate réductase.

A partir de cette nouvelle définition de leur identité fonctionnelle, nous avons cherché à repositionner les GRHPR dans le métabolisme des espèces de *Pyrococcus*. A partir d'une recherche par similarité de séquence (BLAST), nous avons été en mesure de proposer un modèle des voies métaboliques entourant la fonction GRHPR chez les archées *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii*.

La comparaison des séquences des GRHPR provenant de *Thermococcales* avec des GRHPR provenant d'organismes thermophiles ou mésophiles nous a permis de mettre en évidence une extension structurée du C-terminal qui participe à la stabilité face aux très hautes températures des GRHPR provenant de *Thermococcales*.

L'objectif premier de cette caractérisation était de mettre en lumière des différences de propriétés pouvant être en lien avec l'adaptation à la pression. En lien avec les fortes homologies de séquence (85 %), les GRHPR présentent de fortes similarités structurales. Si l'adaptation à la pression est présente au niveau des GRHPR, elle n'implique pas de grands réarrangements structuraux. De plus, nous n'avons pas décelé de différence significative entre les propriétés spécifiques des différentes enzymes. Une étude spécifique et structurale sous

haute pression est donc nécessaire pour mettre en évidence de possibles différences de propriétés entre ces enzymes.

L'analyse des structures des GRHPR nous a permis d'apporter un nouvel éclairage sur le mécanisme d'action de cette famille d'enzyme.

Chez les GRHPR, la forme apo de l'enzyme est une forme ouverte avec une ouverture angulaire importante. Lors de la fixation du cofacteur, le domaine SBD se rabat sur le domaine NDB et provoque la fermeture du site actif (Booth et al., 2006). L'ordre de fixation du substrat/cofacteur est encore mal connu chez les GRHPR. Cependant, chez d'autres familles de déshydrogénases, le cofacteur se fixe en premier (Clarke, Atkinson, & Holbrook, 1989). Comme aucune différence dans l'angle d'ouverture n'a été identifiée entre le complexe binaire (enzyme/cofacteur) et le complexe ternaire (enzyme/cofacteur/substrat), nous pouvons supposer que la fermeture du site actif est guidée par la seule présence du cofacteur.

La fermeture du site actif, induit par la présence du cofacteur, conduit à la création d'un tunnel entre le site actif et l'extérieur. Ce tunnel est obstrué dans les structures de PyaGRHPR et hGRHPR en présence de D-glycérate. Dans la structure de PfuGRHPR, la conformation alternative de la Leu53 ainsi que le mouvement latéral du Trp138, du monomère adjacent, induisent l'ouverture du tunnel (Figure 4.14). Ce tunnel est assez large pour accommoder une molécule de substrat (Figure 4.16).

La modélisation d'une molécule de glycolate proche du Trp138 dans la structure de PfuGRHPR, nous a permis de visualiser le passage du substrat dans le tunnel (Figure 4.16). La double conformation de l'Arg241, dans cette structure, indique un mouvement de balancier entre le site actif et l'extérieur de la protéine (Figure 4.13). Les fluctuations de la chaîne latérale de Arg 241 (chargée positivement) participeraient au cheminement du substrat (chargé négativement) au travers du tunnel via des interactions électrostatiques.

Les glyoxylate réductases n'étant pas distinguables par la séquence des hydroxypyruvate réductases, il a été proposé qu'un réseau constitué du Trp138 (du monomère adjacent), de la Ser291, de l'Arg297 et d'une molécule d'eau interviennent dans la spécificité du substrat (Booth et al., 2006). La molécule de D-glycérate interagit avec ce réseau par l'intermédiaire d'une molécule d'eau et avec la Ser291 dans la structure de la GRHPR humaine et avec le Trp138 dans la structure de la GRHPR de *P. yamanosii* (Figure 4.17). Dans la structure de PfuGRHPR, l'absence de groupe hydroxyméthyle sur la molécule de glycolate exclut l'interaction avec la Ser291 ou le Trp138 (Figure 4.13).

L'inactivation de l'enzyme GRHPR chez l'homme mène à une maladie rénale nommée hyperoxaluria de type 2 (PH2). Plusieurs mutants de GRHPR conférant cette maladie ont été identifiés et analysés (Cregeen et al., 2003). Plus particulièrement, la mutation de l'Arg297 en cystéine induit une réduction de l'activité glyoxylate réductase (5,8 % d'activité) et surtout abolit complètement l'activité hydroxypyruvate réductase. A partir de la détermination de la

structure de hGRHPR, il a été proposé que la mutation Arg297Cys interrompe les interactions avec la molécule d'eau H28, la Ser291 et le Trp138 (Booth et al., 2006). Ce réseau est perturbé dans la structure de PfuGRHPR contenant du glycolate. L'Arg297 adopte une double conformation et nous observons un réarrangement des molécules d'eau (Figure 4.18).

Pour approfondir la connaissance du processus catalytique et en comprendre les différentes étapes, nous souhaitons obtenir les formes apo (sans substrat ni cofacteur) des GRHPR de *P. furiosus* et *P. yayanosii*. De plus, à l'heure actuelle, aucune structure de GRHPR en présence de NADH n'est répertoriée dans la Protein Data Bank.

Dans ce but, nous avons modifié le protocole de purification des GRHPR pour obtenir la forme apo de l'enzyme. Nous avons utilisé une colonne avec un ligand cibacron qui entre en compétition avec le site de fixation du cofacteur de l'enzyme. Par la suite, des essais de cristallisations seront menés avec la protéine seule et en co-cristallisation avec le NADH. La détermination de ces structures permettra d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme réactionnel des GRHPR.

CHAPITRE V

ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DE PRESSION SUR LES GLYOXYLATE HYDROXYPYRUVATE REDUCTASES PROVENANT DE ARCHEES ISOLEES A DIVERSES PROFONDEURS

5.1. Introduction

Nous avons démontré précédemment qu'à pression atmosphérique, les 3 GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* sont des hydroxypyruvate réductases qui utilisent le NADH comme cofacteur. Une étude de reconstruction du métabolisme sur la base de comparaison de séquences sur l'ensemble des génomes disponibles de *Thermococcales*, a permis de situer la place des GRHPR dans l'ensemble du métabolisme au regard de la spécificité fonctionnelle qui a été déterminée dans cette étude (cf. chapitre 4).

Pour rappel, *Pyrococcus yayanosii* est le premier organisme hyperthermophile-piezophile strict découvert, c'est à dire ne pouvant pas pousser à pression ambiante (Zeng et al., 2009). Nous avons aussi choisi *P. furiosus*, isolé en surface qui présente une gamme de croissance de 0,1 MPa à 30 MPa (Fiala & Stetter, 1986) et *P. horikoshii*, isolé à -1390 mètres de profondeur qui présente une gamme de croissance de 0,1 MPa à 40 MPa (González et al., 1998).

L'objectif est de voir si, au même titre que la température ou la forte salinité pour lesquelles le phénomène adaptatif est bien documenté, on retrouve des mutations spécifiques, identifiables dans les séquences d'enzymes abyssales par rapport aux surfaciques, qui auraient été sélectionnées face à une contrainte induite par les HPH. Afin d'y arriver, nous avons donc essayé de mettre en lumière l'existence de différences de propriétés au niveau de l'activité et de la stabilité.

En s'appuyant sur la connaissance approfondie des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* acquise dans le chapitre 4, nous avons sondé l'effet de la pression sur ces protéines. En effet, les processus spécifiques sont sensibles aux effets de la pression (Balny et al., 2002; Masson & Balny, 2005; Northrop, 2002). La pression favorise les réactions accompagnées d'un changement de volume négatif. Cependant, les déterminants moléculaires guidant ce changement de volume sont encore mal connus. En effet, les effets de la pression peuvent varier entre des enzymes homologues et une même réaction spécifique peut être accompagnée d'un changement de volume négatif ou positif (Jaenicke, 1981). De plus, une enzyme reconnaissant plusieurs substrats peut avoir des comportements différents sous pression en fonction du substrat considéré (Occhipinti et al., 2006). Nous avons exploré les effets de la pression sur des enzymes homologues catalysant différents

substrats dans ce chapitre sans perdre de vue l'objectif principal d'apporter des réponses précises à la question de l'adaptation piézophile.

5.2. Effets de la pression sur l'activité spécifique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

Nous avons suivi les variations d'activité spécifique des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* en fonction de la pression. Pour cela, nous avons mesuré la vitesse initiale de la réaction tous les 100 MPa en duplicat pour les quatre combinaisons de substrats-cofacteurs possibles : du glyoxylate ou de l'hydroxypyruvate comme substrat et du NADH ou NADPH comme cofacteur (Figure 5.1).

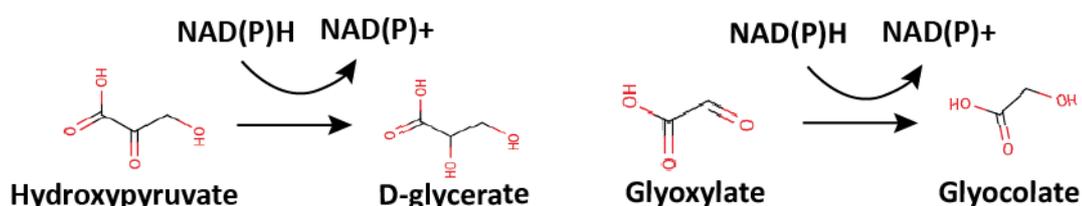


Figure 5.1. Réaction de réduction de l'hydroxypyruvate en D-glycérate et du glyoxylate en glycolate catalysée par la GRHPR. Cette réaction s'accompagne d'une oxydation du cofacteur, NADH ou NADPH.

Le choix d'une température relativement basse pour effectuer les mesures (50 °C) comparée à la température optimale d'activité de ces enzymes (85 °C) correspond à des contraintes instrumentales, de faisabilité et de cohérence. En effet, le spectrophotomètre utilisé sous pression ne peut pas dépasser les 80 °C. De plus, la vitesse de réaction étant fortement augmentée à très haute température, il est difficile de rester dans des conditions de vitesse initiale compte tenu du temps de latence nécessaire pour effectuer la montée en pression. Pour rappel, les paramètres cinétiques à pression ambiante ont été déterminés à 50 °C (cf. chapitre 4). Enfin, cette température est en accord avec de précédents travaux effectués sur d'autres enzymes hyperthermophiles (Rosenbaum et al., 2012). Pour compléter ces travaux et explorer les effets conjoints de la température et de la pression, nous avons aussi effectué l'ensemble de ces mesures à 25 °C.

Beaucoup d'informations peuvent être retirées de ces mesures. Pour une meilleure compréhension, j'ai choisi de sélectionner une partie des résultats pour

illustrer mon propos. L'ensemble des données enregistrées est présenté sous forme de courbes en annexe (cf. annexe 4-7).

5.2.1. Effet du choix du cofacteur sur l'activité spécifique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases en conditions de hautes pressions

Nous avons comparé l'activité hydroxypyruvate réductase en fonction de la pression en présence de NADH ou de NADPH (Figure 5.2) pour les trois GRHPR. L'activité spécifique à pression ambiante a été prise comme référence et correspond au 100 % d'activité pour chaque enzyme. Les données ont été enregistrées pour l'ensemble des trois GRHPR et sont représentées selon le code couleur suivant : PfuGRHPR en vert, PhoGRHPR en rouge et PyaGRHPR en bleu. Ce code couleur sera suivi pour l'ensemble du chapitre. Les données enzymatiques ont été obtenues à 50 °C.

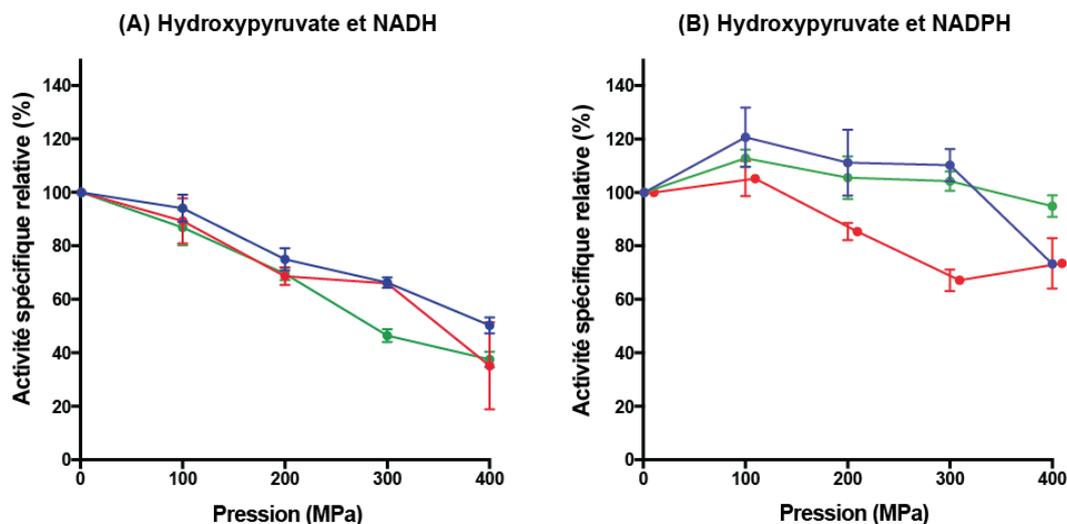


Figure 5.2. Courbes d'activité spécifique relative des GRHPR en fonction de la pression. (A) Mesures effectuées en présence d'hydroxypyruvate (0,26 mM) et de NADH (0,13 mM) avec une concentration en enzyme de 1,2 mg.ml⁻¹ (PfuGRHPR), 1 mg.ml⁻¹ (PhoGRHPR) et 0,8 mg.ml⁻¹ (PyaGRHPR). (B) Mesures effectuées en présence d'hydroxypyruvate (0,26 mM) et de NADH (0,13 mM) avec une concentration en enzyme de 5 mg.ml⁻¹ (PfuGRHPR), 11 mg.ml⁻¹ (PhoGRHPR) et 3 mg.ml⁻¹ (PyaGRHPR). L'activité spécifique a été calculée en μmol.min⁻¹.mg⁻¹. Mesures effectuées à 50 °C en duplicat

En présence d'hydroxypyruvate et de NADH, l'activité spécifique des GRHPR diminue lorsque la pression augmente. Pour les trois GRHPR, l'inhibition

est de 30 % à 200 MPa. Par contre, l'activité spécifique n'est que faiblement impactée par la pression en présence de NADPH. En présence de NADPH, l'activité hydroxypyruvate réductase est maintenue jusqu'à des très hautes pressions (> 400 MPa). On observe une légère diminution de l'activité spécifique dans le cas de l'enzyme de *P. horikoshii*. Dans l'ensemble, les GRHPR se comportent de manière similaire sous haute pression à 50 °C. Le même comportement est observé dans le cas de l'activité glyoxylate réductase de ces enzymes : l'activité spécifique est diminuée sous pression en présence de NADH mais elle se maintient en présence de NADPH (cf Annexe 5.1).

La modulation par les cofacteurs des effets de la pression sur l'activité spécifique n'est vraisemblablement pas en lien avec une déstabilisation de l'édifice dimérique. En effet, les GRHPR ont une thermostabilité élevée (100 % d'activité maintenue après une incubation de 4 h à 90 °C) et compte tenu de la durée de la mesure d'activité (3 min), il semble improbable que l'édifice dimérique soit impacté.

5.2.2. Comportement particulier de la glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de *P. horikoshii*

Dans ce paragraphe, je vais me focaliser plus particulièrement sur le cas de l'enzyme PhoGRHPR. J'ai représenté les variations relatives d'activité spécifique en fonction de la pression de PhoGRHPR à 50 °C (Figure 5.3).

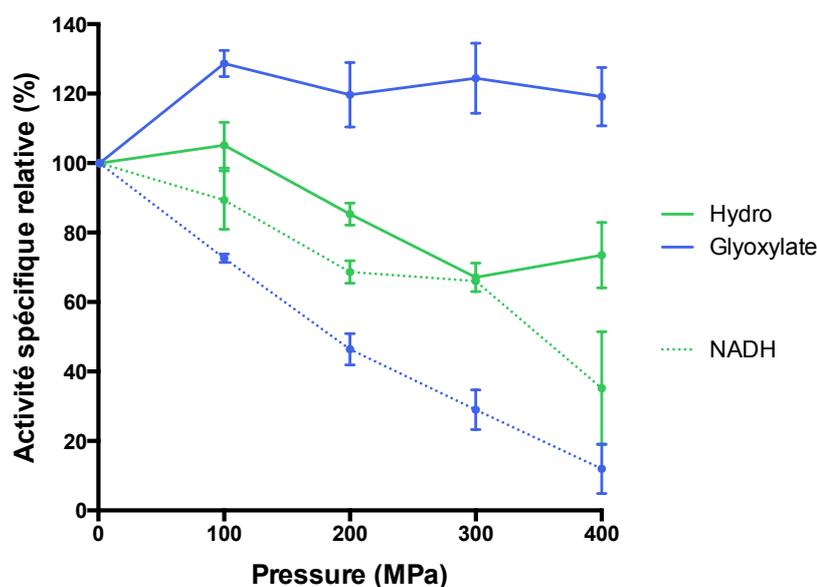


Figure 5.3. Courbes d'activité relative de PhoGRHPR en fonction de la pression à 50 °C. Les mesures ont été réalisées en duplicat à une concentration en hydroxypyruvate (vert) et glyoxylate (bleu) de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH ou NADPH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. NADPH (ligne pleine) et le NADH (pointillé)

L'effet de la pression sur l'enzyme est guidé par le choix du cofacteur et du substrat. La présence du glyoxylate induit une réponse sous pression très contrastée de l'enzyme en fonction du cofacteur. En effet, à 300 MPa, l'enzyme est active à 120 % en présence de NADPH alors qu'elle maintient seulement 20 % de son activité en présence de NADH.

A 25 °C, la différence de comportement de PhoGRHPR en présence de glyoxylate et d'hydroxypyruvate est moins marquée (cf. Annexe 5.4). Les courbes avec différents substrats sont similaires, et le comportement sous pression est seulement guidé par le choix du cofacteur comme pour PyaGRHPR.

5.2.3. Comparaison du comportement vis-à-vis de la pression entre enzymes issues d'organismes de surfaces et abyssaux

Pour répondre à cette question, nous avons comparé les données obtenues pour les différentes enzymes (cf. Annexe 4-7). Pour comparer les effets de la pression sur l'activité spécifique, nous disposons de plusieurs facteurs. A partir de

l'activité spécifique exprimée en logarithme, il est possible de calculer le ΔV de la réaction (cf. chapitre 1). Dans le cas des GRHPR, nous disposons de trop peu de points pour extraire les valeurs de ΔV . Nous pouvons aussi comparer les optimums de pression, c'est à dire la pression pour laquelle la vitesse est maximale. L'activité spécifique de PfuGRHPR n'est jamais augmentée par la pression, quelque soit les conditions considérées (cf. Annexe 5.4). En ce qui concerne, PhoGRHPR et PyaGRHPR, l'activité de ces enzymes est augmentée en présence de NADPH et à 25 °C (Figure 5.4).

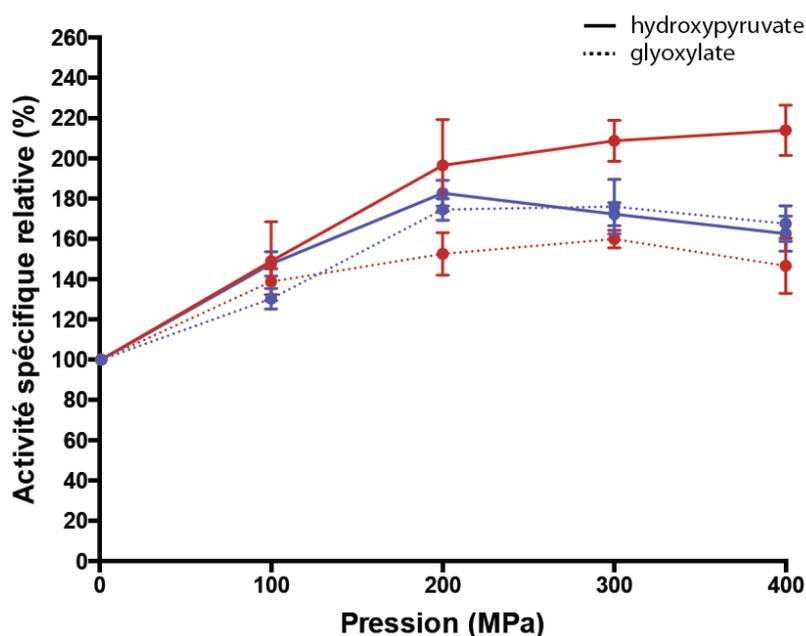


Figure 5.4 Courbes d'activité relative des GRHPR en fonction de la pression à 25 °C. Les mesures ont été réalisées en duplicat à une concentration en hydroxypyruvate de 0,8 mM ou de glyoxylate et 0,2 mM de NADPH. L'activité spécifique a été calculée en $\text{umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. PhoGRHPR (rouge) et PyaGRHPR (bleu)

A partir de ces courbes, il est difficile de définir un optimum de pression, puisque l'activité se maintient entre 200 et 400 MPa. On remarque cependant que les courbes de PhoGRHPR et PyaGRHPR sont similaires. Toutefois, l'activité de PhoGRHPR sous pression est légèrement influencée par le substrat vu que l'augmentation d'activité est plus importante en présence d'hydroxypyruvate.

Pour comparer la variation d'activité entre les 3 enzymes, nous avons utilisé le paramètre P_{100} défini dans le chapitre 2. Ce paramètre représente la variation d'activité pour 100 MPa. Les valeurs de P_{100} pour PfuGRHPR, PhoGRHPR et PyaGRHPR ont été calculées à partir des données à 25 °C en présence de NADPH et d'hydroxypyruvate (Tableau 5.1).

	PfuGRHPR	PhoGRHPR	PyaGRHPR
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0,86	0,96	1,40
Activité spécifique à 200 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0,97	1,96	2,57
P ₁₀₀	1,1	1,4	1,5

Tableau 5.1. Valeurs absolues d'activité spécifique des GRHPR à différentes pressions à 25 °C. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en duplicat avec de l'hydroxypyruvate et du NADPH. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa.

Les valeurs de P₁₀₀ confirment les observations précédentes. L'activité de PfuGRHPR est très peu impactée par la pression. L'augmentation d'activité induite par la pression est similaire pour PhoGRHPR et PyaGRHPR (1,4 et 1,5 respectivement)

Les mesures d'activités présentées dans ce chapitre, ne reflètent pas directement la stabilité de l'enzyme. Toutefois, nous pouvons remarquer que l'activité spécifique est maintenue à 100 % jusqu'à 400 MPa dans de nombreuses conditions (cf. Annexe 4-7).

Afin d'appréhender les phénomènes moléculaires à l'origine des propriétés de ces 3 enzymes, nous avons entrepris une caractérisation structurale sous haute pression hydrostatique.

Sachant que l'activité spécifique relative diminue en présence de NADH et augmente en présence de NADPH, nous avons voulu savoir si l'activité spécifique était plus importante en présence de NADPH sous pression. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons représentées les courbes d'activités spécifiques en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour PhoGRHPR et PyaGRHPR en présence d'hydroxypyruvate à 25 °C.

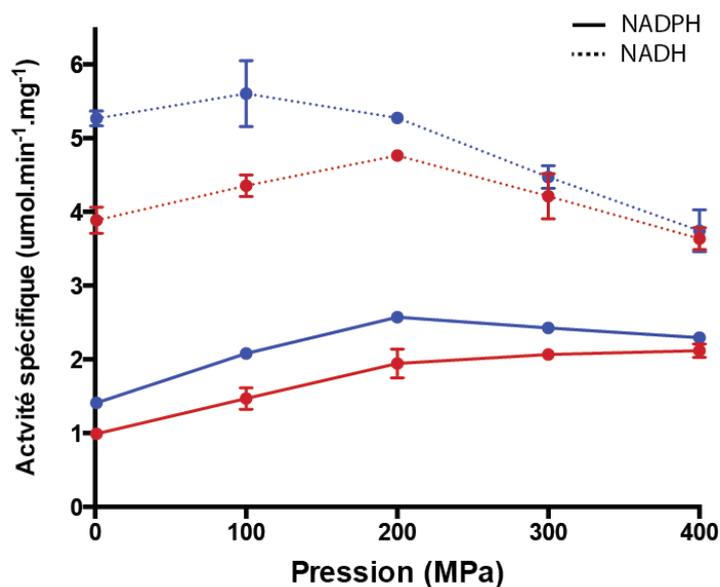


Figure 5.5. Courbes d'activité relative des GRHPR en fonction de la pression. Les mesures ont été réalisées en duplicat à une concentration en hydroxypyruvate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH ou NADPH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Les mesures ont été faites à 25 °C . PhoGRHPR (en rouge) et PyaGRHPR (en bleu). NADPH (ligne pleine) et le NADH (pointillé)

Malgré la diminution de l'activité en présence de NADH, et l'augmentation en présence de NADPH sous pression, l'activité spécifique pour PhoGRHPR et PyaGRHPR est plus importante en présence de NADH même à haute pression. Il est probable que les valeurs de k_{cat} en présence de NADH soient toujours plus élevées que celles en présence de NADPH même sous haute pression. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait effectuer des mesures sur une gamme de concentration en substrat à différentes pressions.

En conclusion, les données actuelles ne permettent pas de conclure sur un possible inversement de la spécificité des enzymes par rapport aux cofacteurs. Cependant, les implications sur le métabolisme des archées hypertermophiles abyssales de la modulation par le NADPH de l'activité des GRHPR sous pression seront discutées dans le paragraphe 5.5.

5.2.4. Effet des basses températures sur l'activité des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases sous hautes pression

Précédemment, nous avons remarqué un comportement différent des enzymes à 25 °C et 50 °C (Figure 5.2). J'ai représenté les variations relatives d'activité spécifique des GRHPR sous pression à différentes températures en présence d'hydroxypyruvate et de NADPH (Figure 5.6).

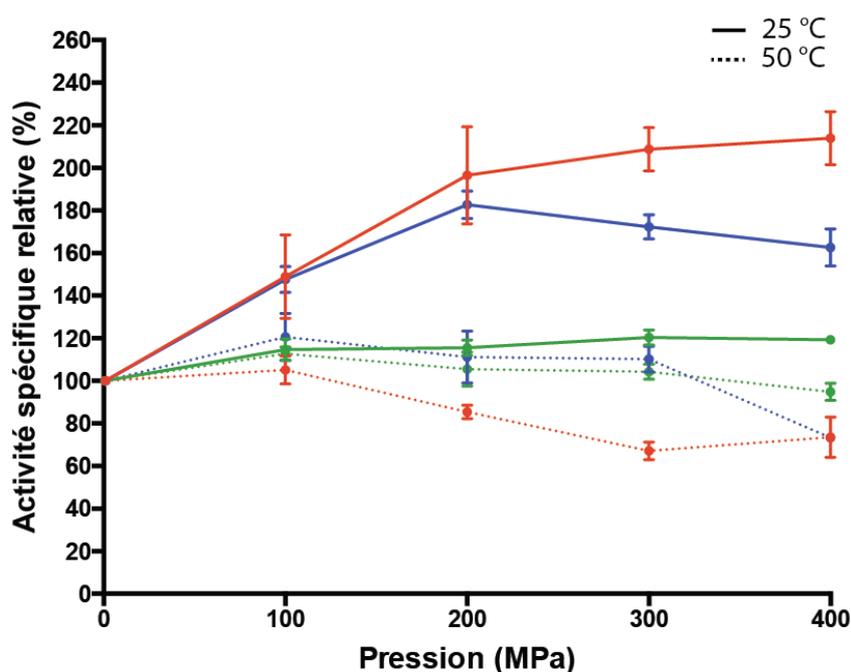


Figure 5.6. Courbes d'activité relative des GRHPR en fonction de la pression à différentes températures. Les mesures ont été réalisées en duplicat à une concentration en hydroxypyruvate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADPH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. PfuGRHPR (en vert), PhoGRHPR (en rouge) et PyaGRHPR (en bleu). 25 °C (ligne pleine) et 50 °C (pointillé)

A 50 °C, l'activité des GRHPR sous pression est similaire. Par contre, à 25 °C, l'activité des enzymes PhoGRHPR et PyaGRHPR est augmentée alors que celle de PfuGRHPR reste constante. La basse température favorise l'augmentation d'activité induite par la pression.

Nous avons déjà fait la même remarque pour les mesures d'activité en présence de NADPH. Le choix du cofacteur ainsi que de la température module les effets de la pression sur l'activité des GRHPR. En effet, le NADH et les hautes températures (50 °C) favorisent une diminution de l'activité spécifique sous pression. A l'inverse, Le NADPH et les basses températures (25 °C) favorisent une augmentation de l'activité spécifique sous pression. Cette tendance est visible pour l'ensemble des enzymes et des conditions testées (cf. Annexe 4-7).

Toutefois, le comportement de l'enzyme de *P. furiosus* se distingue nettement de celui des enzymes de *P. horikoshii* et *P. yayanosii*. Comme dans le cas du NADPH, l'enzyme PfuGRHPR est très peu sensible aux effets de la pression ainsi qu'aux différents modulateurs (changement de cofacteurs ou variation de température).

5.3. Détermination de la structure cristalline sous hautes pressions hydrostatique des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases de *P. furiosus* et *P. yayanosii*.

5.3.1. Enregistrement et traitement des données de diffraction obtenues en cellule à enclumes diamant

Pour PfuGRHPR, nous avons enregistré trois jeux de données sur la ligne de lumière CRISTAL de SOLEIL : un jeu de référence à pression ambiante, un jeu à 260 MPa et un jeu à 370 MPa. Nous avons réalisé une étude HPMX sur les cristaux de PfuGRHPR et PyaGRHPR. A température ambiante, les cristaux de PfuGRHPR diffractent jusqu'à 450 MPa. Après avoir enregistré un jeu de référence a pression ambiante, nous avons enregistré deux jeux de données sous hautes pressions, à 260 et 370 MPa. La résolution est de 2,0 pour les jeux à haute pression et 2,4 pour celui a pression ambiante.

Comme indiqué dans le chapitre 3, paragraphe 2.3.3, nous utilisons le même protocole tout au long du traitement des données et de l'affinement de la structure afin d'être sûr que les différences décrites seront dues à l'effet de la pression et non à des biais liés aux conditions expérimentales. Il convient de noter que, pour chacun des jeux de données, un seul cristal a été utilisé. Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont indiquées dans le tableau 5.1.

	0,1 MPa	260 MPa	370 MPa
Longueur d'onde (Å)	0,5103	0,5103	0,5103
Groupe d'espace	I4 ₁	I4 ₁	I4 ₁
a,b,c (Å)	116,4 - 116,4 – 120,3	115,5 - 115,5 – 118,7	115,1 - 115,1 – 118,2
Volume de la maille (%)	100	97,7	96,5
Résolution (Å)	83,67 - 2,40 (2,55- 2,40)	82,98 – 2,00 (2,11- 2,00)	82,43 – 2,05 (2,16- 2,05)
Réflexions uniques	25 955 (3 881)	49 240 (7 173)	45 074 (6 554)
R _{sym} (%)	26,5 (147,8)	18,0 (152,0)	19,2 (176,0)
R _{pim} (%)	16,8 (94,3)	9,2 (77,1)	9,8 (88,6)
CC _{1/2} (%)	100,0 (22,6)	100,0 (37,8)	100,0 (28,5)
I/σ(I)	3,8 (0,8)	6,2 (1,0)	4,9 (0,9)
Complétude (%)	83,4 (85,4)	93,8 (93,8)	93,5 (93,7)
Multiplicité	2,1 (2,0)	3,6 (3,5)	3,7 (3,7)

Tableau 5.1. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à température ambiante de PfuGRHPR à pression ambiante, à 260 MPa et à 370 MPa.

Malgré les contraintes liées à un enregistrement en CED, les données obtenues sont à une résolution comprises entre 2,4 et 2,0 Å. On peut d'ores et déjà constater que la maille des cristaux à 370 MPa est réduite de 3,5 % ce qui est en accord avec la variation de 1 % par 100 MPa généralement observé (Ascone et al., 2010; Girard et al., 2010).

Pour PyaGRHPR, nous avons enregistré deux jeux de données sur la ligne de lumière CRISTAL de SOLEIL: un jeu de référence à pression ambiante et un jeu à 300 MPa. Le détecteur utilisé était un MarCCD 165mm, tout comme pour les jeux de données de PfuGRHPR.

A nouveau, le même protocole est utilisé tout au long du traitement des données et de l'affinement de la structure. Il convient de noter que, pour chacun des jeux de données, un seul cristal a été utilisé. Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont indiquées dans le tableau 5.2.

	0,1 MPa	300 MPa
Longueur d'onde (Å)	0,6682	0,6682
Groupe d'espace	P 6 ₂ 2 2	P 6 ₂ 2 2
a,b,c (Å)	143,57 - 143,57 – 258,88	141,66 - 141,66 – 257,44
Volume de la maille (%)	100	97,68
Résolution (Å)	89,74 - 2,55 (2,65-2,55)	88,87 – 2,55 (2,69-2,55)
Réflexions uniques	51 709 (7 375)	50 149 (7 120)
R _{sym} (%)	29,9 (241)	27,9 (208)
R _{pim} (%)	11,6 (95,1)	13,2 (98,7)
CC _{1/2} (%)	100,0 (30,9)	100,0 (28,5)
I/σ(I)	6,4 (1,0)	5,5 (1,0)
Complétude (%)	99,6 (99,2)	99,7 (99,0)
Multiplicité	6,2 (6,2)	4,3 (4,3)

Tableau 5.2. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à température ambiante de PyaGRHPR à pression ambiante et à 300 MPa.

Les données obtenues sont à une résolution de 2,55 Å. On peut d'ores et déjà constater que la maille des cristaux à 300 MPa est réduite de 2,3 % ce qui est un peu plus faible que ce qui est généralement observé (variation de 1 % par 100 MPa)(Ascone et al., 2010; Colloc'h et al., 2006).

5.3.2. Détermination et affinement des structures obtenues en cellule à enclumes diamant

Les structures de PfuGRHPR ont été déterminées par la méthode du remplacement moléculaire avec le logiciel PHASER (McCoy et al., 2007). Le modèle de départ est le monomère sous forme de Polyala de la structure PfuGRHPR déterminée à 100 K. Les statistiques fournies par PHASER après le remplacement moléculaire sont indiquées dans le tableau 5.3. Le nombre de résidus reconstruits avec le logiciel BUCCANEER (Cowtan, 2006), après amélioration des phases avec le programme DM avec 75 % de solvant, est aussi indiqué (Levin, Kondrashov,

Wesenberg, & Phillips, 2007) (333 résidus correspondant à un monomère dans l'unité asymétrique sont attendus).

	0,1 MPa	260 MPa	370 MPa
LLG	4551	6916	5234
TZF	36,6	57,9	42,8
Résidus reconstruits avec BUCCANEER	214 sur 15 chaines	104 sur 8 chaines	161 sur 10 chaines

Tableau 5.3. Résultat du remplacement moléculaire avec PHASER des jeux de données à pression ambiantes et à hautes pressions de PfuGRHPR.

Le modèle partiel produit par BUCCANEER a été complété manuellement à l'aide du logiciel COOT (Emsley et al., 2010). L'affinement a été mené avec le logiciel PHENIX selon le protocole décrit dans le chapitre 2 paragraphe 2.3.3 (Adams et al., 2010). Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

	0,1 MPa	260 MPa	370 MPa
Résolution (Å)	83,6 - 2,40	82,9 – 2,00	82,4 – 2,1
R _{factor} (%)	16,91	14,53	14,75
R _{free} (%)	21,72	16,99	17,79
Nombres de réflexions utilisées	25 955	49 240	45 074
Composition (nbre d'atomes)			
Protéine	2833	2758	2776
H ₂ O	104	261	211
Ligands	52	52	72
Res. hors Ramachandran (%)	0,3	0,0	0,0
Ecart types (globaux)			
Liaisons longueurs (Å)	0,008	0,009	0,009
Liaisons angles (°)	1,079	0,924	0,936
B _{moyen} protéine (Å ²)	37,2	36,35	46,9
B _{moyen} eau (Å ²)	43,3	48,4	56,41
B _{moyen} ligands (Å ²)	31,9	29,1	52,9

Tableau 5.4. Statistiques d'affinement des trois structures de PfuGRHPR à pression ambiante, à 260 MPa et à 370 MPa respectivement.

Dans les 3 structures, j'ai identifié deux densités électroniques résiduelles dans le site actif que j'ai modélisé comme étant un cofacteur NADPH et une molécule de glycolate. Les deux ligands ont été affinés avec un taux d'occupation final de 1 et des facteurs d'agitation thermique en accord avec les résidus qui les coordonnent. La structure à pression ambiante a une résolution un peu plus basse que les deux autres. J'ai modélisé 104, 261 et 21 molécules d'eau dans la structure à pression ambiante, à 260 MPa et 370 MPa respectivement.

Les structures de PyaGRHPR ont été déterminées par la méthode du remplacement moléculaire avec le logiciel PHASER. Le modèle de départ est le dimère sous forme de Polyala de la structure PyaGRHPR déterminée à 100 K. Les statistiques fournies par PHASER après le remplacement moléculaire sont indiquées dans le tableau 5.5. Le nombre de résidus reconstruits avec le logiciel BUCANEER,

après amélioration des phases avec le programme DM avec 75 % de solvant, est aussi indiqué (666 résidus correspondant à un monomère dans l'unité asymétrique sont attendus).

	0,1 MPa	300 MPa
LLG	5317	4522
TZF	45,5	71,5
Résidus reconstruits avec BUCANEER	521 sur 12 chaînes	541 sur 10 chaînes

Tableau 5.5. Résultat du remplacement moléculaire avec PHASER des jeux de données à pression ambiantes et à hautes pressions de PyaGRHPR.

Le modèle partiel produit par BUCCANEER a été complété manuellement à l'aide du logiciel *COOT*. L'affinement a été mené avec le logiciel PHENIX selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

	0,1 MPa	300 MPa
Résolution (Å)	89,7 - 2,55	88,8 - 2,55
R _{factor} (%)	14,64	15,27
R _{free} (%)	18,27	19,72
Nombres de réflexions utilisées	51 709	50 149
Composition (nbre d'atomes)		
Protéine	5554	5401
H ₂ O	134	169
Ligands	109	109
Res. hors Ramachandran (%)	0,0	0,3
Ecart types (globaux)		
Liaisons longueurs (Å)	0,010	0,015
Liaisons angles (°)	1,05	1,67
B _{moyen} protéine (Å ²)	52,94	54,84
B _{moyen} eau (Å ²)	51,6	50,32
B _{moyen} ligands (Å ²)	44,5	47,8

Tableau 5.6. Statistiques d'intégration des données de PyaGRHPR à pression ambiante et à 300 MPa.

Pour les deux structures, j'ai identifié deux densités électroniques résiduelles dans le site actif que j'ai modélisé comme étant un cofacteur NADPH et une molécule de D-glycérate. Les deux ligands ont été affinés avec un taux d'occupation final de 1 et avec des facteurs d'agitation thermique en accord avec les résidus qui les coordonnent. La résolution des deux jeux de données est identiques (2,55 Å). J'ai modélisé 134 molécules dans la structure à pression ambiante et 169 dans la structure à haute pression.

5.4. Analyse structurale

Dans cette partie, nous avons analysé le comportement sous pression de la structure de PfuGRHPR et de PyaGRHPR. Pour ce faire, nous avons déterminé, pour chaque protéine, la structure à pression ambiante et à haute pression. Dans le cas de PfuGRHPR, nous avons obtenu deux structures à haute pression, à 260 et 370 MPa. En ce qui concerne PyaGRHPR, nous avons obtenu une structure à 300 MPa.

Pour commencer, nous avons regardé la différence dans le positionnement des atomes entre les structures à pression ambiante et à haute pression. Dans ce but, nous avons utilisé le programme THESEUS (Theobald & Steindel, 2012) dont le fonctionnement est décrite dans le chapitre 2. Pour rendre compte de la qualité de la superposition, le programme fournit des valeurs normalisées des résiduelles qui peuvent être vues comme représentant l'écart à la meilleure superposition. Nous avons représenté sur la figure 5.7 les résultats obtenus pour PfuGRHPR et PyaGRHPR.

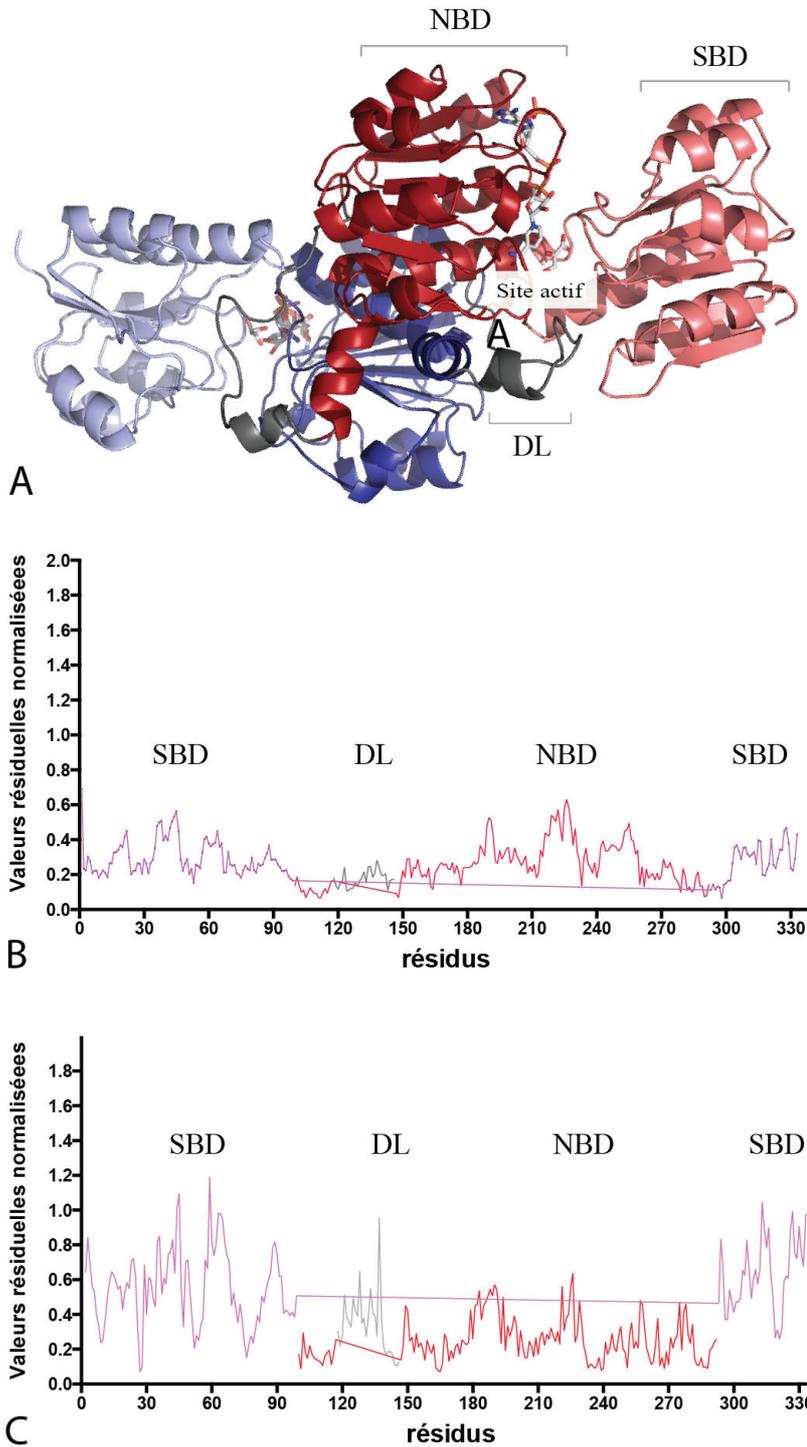


Figure 5.7. Résultat de l'analyse avec le programme THESEUS.

(A) Représentation du dimère des GRHPR. Le domaine NBD (domaine de fixation du NADPH) est largement impliqué dans l'interface ainsi que la boucle de dimérisation (DL). Le site actif se situe à l'interface du domaine NBD et SBD (domaine de fixation du substrat). (B) Valeurs résiduelles normalisées en fonction du numéro de résidu obtenues après superposition avec THESEUS des structures de PfuGRHPR à pression ambiante et à 370 MPa. (C) Valeurs résiduelles normalisées en fonction du numéro de résidu obtenues après superposition avec THESEUS des structures de PyaGRHPR à pression ambiante et à 300 MPa.

Les valeurs résiduelles normalisées obtenues pour la superposition de la structure à pression ambiante et à 370 MPa de PfuGRHPR sont homogènes indiquant que les deux structures sont très similaires (Figure 5.7 A). Les comparaisons similaires ont été effectuées entre la structure ambiante et celle à 280 MPa et entre les deux structures à haute pression. Dans tous les cas, la répartition des valeurs résiduelles est homogène. Les résidus proches du site catalytique présentent les valeurs résiduelles les plus faibles. À l'inverse, ceux éloignés du site actif correspondent aux valeurs résiduelles les plus élevées. Cette observation semble indiquer que la présence du substrat, et surtout du cofacteur, stabilise la structure de PfuGRHPR sous pression.

Contrairement à PfuGRHPR, les valeurs résiduelles normalisées obtenues pour la superposition de la structure à pression ambiante et à 300 MPa de PyaGRHPR sont moins homogènes (Figure 5.7 B). Les valeurs associées au domaine SBD sont plus importantes que celles associées au domaine NBD. L'augmentation des valeurs résiduelles normalisées dans le cas du domaine SBD traduit un mouvement global du domaine. L'analyse de ce mouvement est détaillée dans le paragraphe 5.4.1.

En revanche les valeurs correspondant au domaine NBD de PyaGRHPR sont similaires à celles du domaine NBD de PfuGRHPR (Figure 5.7 A). Cette observation indique que la structure de PyaGRHPR sous pression est peu impactée au niveau du domaine NBD qui est largement impliqué dans l'interface dimérique. Les valeurs obtenues pour la boucle dimérique sont équivalentes à celles du domaine NBD.

Les résultats de l'analyse avec THESEUS semblent indiquer que l'interface dimérique n'est que peu impactée par la pression aussi bien chez PfuGRHPR que chez PyaGRHPR.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons tout d'abord analysé les variations de distances des interactions présentes à l'interface. Nous n'avons pas observé de différences entre les structures à pression ambiante et à haute pression aussi bien chez PfuGRHPR que chez PyaGRHPR. Ensuite, nous avons comparé les facteurs d'agitation thermique (facteur B) des résidus impliqués dans l'interface. Ce paramètre rend compte de la dynamique de la structure et une augmentation des facteurs B à haute pression pourrait indiquer que la zone est impactée par la pression même si l'effet n'est pas encore visible en mesurant les distances d'interaction. À nouveau, nous n'avons pas vu de différences notables dans les valeurs des facteurs B des résidus impliqués dans l'interface. Malgré le nombre plus élevé de molécules d'eau dans les structures à haute pression qu'à pression ambiante (261-211 contre

104 pour PfuGRHPR et 169 contre 124 pour PyaGRHPR), nous n'avons pas identifié d'entrée de molécules d'eau au niveau de l'interface dimérique à haute pression.

En conclusion, l'analyse de la comparaison des structures à pression ambiante et sous haute pression, aussi bien dans le cas de PfuGRHPR que dans le cas de PyaGRHPR, renforcent l'hypothèse que l'interface dimérique n'est que faiblement impactée par la pression.

5.4.1. Mouvement de domaine dans la structure de PyaGRHPR

L'analyse faites précédemment des structures de PyaGRHPR à pression ambiante et haute pression à l'aide du programme *THESEUS*, nous a conduit à identifier un mouvement de domaine. En effet, les valeurs des résiduelles normalisées au niveau du domaine NBD est relativement faible (autour de 0,5) (figure 5.7). En revanche, la moyenne des valeurs est multipliée par 2,3 pour le domaine SBD (figure 5.8). L'augmentation des valeurs résiduelles du domaine SBD se traduit par un mouvement global du domaine. Celui-ci se rapproche du domaine NBD formant une structure plus compacte.

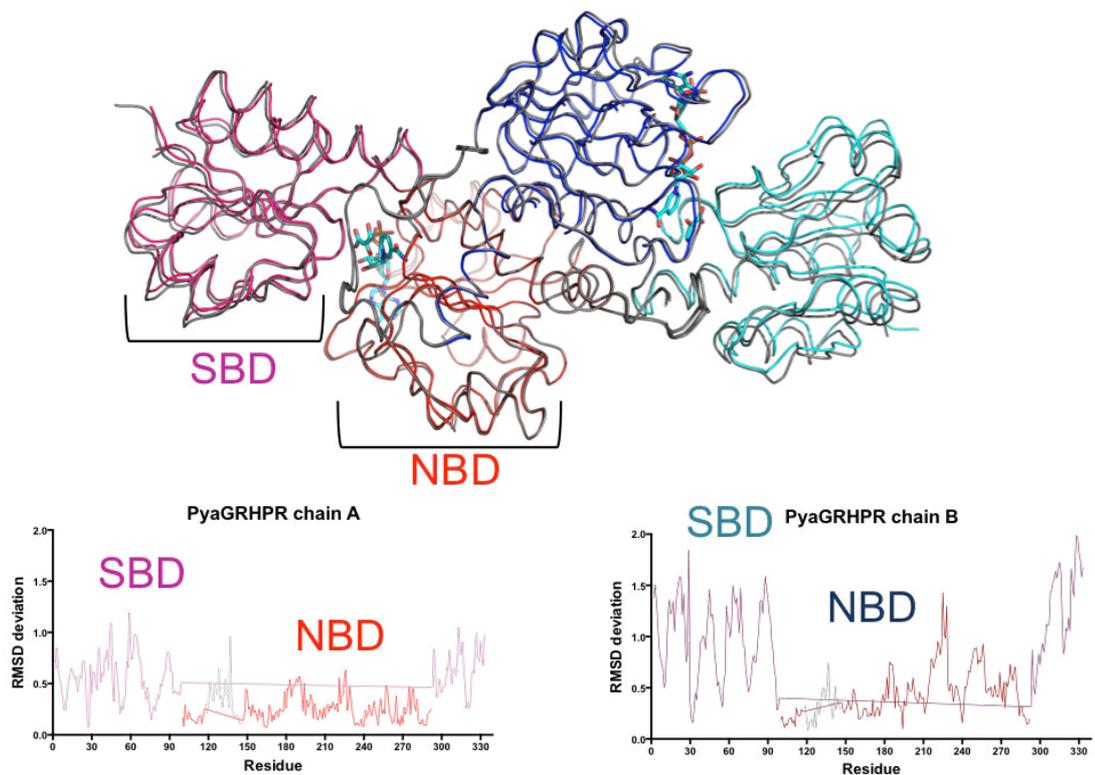


Figure 5.8. Représentation des mouvements entre la structure de PyaGRHPR à pression ambiante et à haute pression. Superposition avec le programme THESEUS de la structure de PyaGRHPR à pression ambiante et de celle à 300 MPa. Les domaines du substrat (SBD) et du cofacteur (NBD) sont indiqués. Les valeurs des résiduelles normalisés sont indiquées en fonction du domaine pour la chaîne A (panneau de gauche) et pour la chaîne B (panneau de droite)

Dans la structure de PyaGRHPR, l'unité asymétrique contient un dimère, ce qui implique que la chaîne A n'est pas complètement identique à la chaîne B. Ainsi, les valeurs des résiduelles normalisés sont plus élevées au niveau de la chaîne B. Le mouvement du domaine SBD est donc moins marqué sur la chaîne A car celle-ci est stabilisée par des contacts cristallins plus nombreux que dans le cas de la chaîne B (cf. chapitre 4).

Nous n'avons pas identifié de mouvement de ce genre dans la structure de PfuGRHPR. Même si la moyenne des valeurs résiduelles entre la structure à haute pression et à pression ambiante chez PfuGRHPR est plus élevée que pour PyaGRHPR, la répartition des valeurs résiduelles est homogène comme indiqué précédemment.

Le mouvement du domaine SBD est en lien direct avec la fonction de l'enzyme. En effet l'angle d'ouverture entre les deux domaines différencie la forme apo de la forme holo chez cette famille d'enzyme (Booth et al., 2006). Pour rappel,

les structures cristallographiques ont été obtenues à 25 °C et sous forme d'un complexe ternaire avec du NADPH. Dans ces conditions, nous avons montré précédemment que l'enzyme PfuGRHPR était relativement insensible à la pression (cf. 5.2.4). A l'inverse, l'activité spécifique de PyaGRHPR est augmentée sous pression en présence de NADPH. Ce mouvement de domaine qui mime le processus catalytique pourrait être en lien avec l'augmentation d'activité détectée pour PyaGRHPR. A l'inverse, la position des domaines dans les structures de PfuGRHPR est peu impactée par la pression ce qui est en accord avec les données spécifiques.

5.4.2. Structure du site actif

Les structures de PyaGRHPR et de PfuGRHPR ont été obtenues à partir de la même forme cristalline que les structures respectives à 100 K. En particulier, les structures de PyaGRHPR à température ambiante sont sous forme de complexe ternaire avec du D-glycérate et du NADPH. Nous n'avons pas observé de changement dans le positionnement ou le taux d'occupation du substrat et du cofacteur par rapport à la structure à 100 K décrite dans le chapitre 4.

Les structures de PfuGRHPR à pression ambiante contiennent du glycolate et du NADPH. Nous n'avons pas observé de changement dans le positionnement ou le taux d'occupation du substrat et du cofacteur par rapport à la structure à 100 K décrite dans le chapitre 4. Toutefois, la double conformation du résidu qui stabilise le substrat, l'Arg241, n'est pas retrouvée dans les structures à température ambiante (Figure 5.9).

Pour expliquer la disparition de la double conformation à température ambiante, nous pouvons faire plusieurs hypothèses. Il est possible que la cryo-congélation ait capturée des conformations qui ne sont pas majoritaires à température ambiante (Fraser et al., 2011). De plus, la résolution à température ambiante est moindre ce qui rend plus difficile l'identification de conformation intermédiaire (1,4 et 2,0 Å pour la structure à 100 K et à température ambiante respectivement).

Dans la structure de PfuGRHPR à 100 K, une double conformation avait aussi été détectée sur l'Arg297. Celle-ci se situait proche du site actif sans interagir avec le substrat. L'Arg297 fait partie du réseau composé du Trp138 et de la Ser291 qui ont été proposé comme participant à la spécificité de l'enzyme (cf. chapitre 4). Dans les structures PfuGRHPR à température ambiante, l'Arg297 adopte une seule conformation différente de celle retrouvée dans les structures de PyaGRHPR.

5.4.3. Fixation du cofacteur

Les données spécifiques pointent vers un fort impact du cofacteur sous pression. Nous avons donc analysé la fixation du cofacteur dans les structures à pression ambiante et à haute pression. Nous avons représenté la superposition des structures de PfuGRHPR au niveau du site actif. (Figure 5.9).

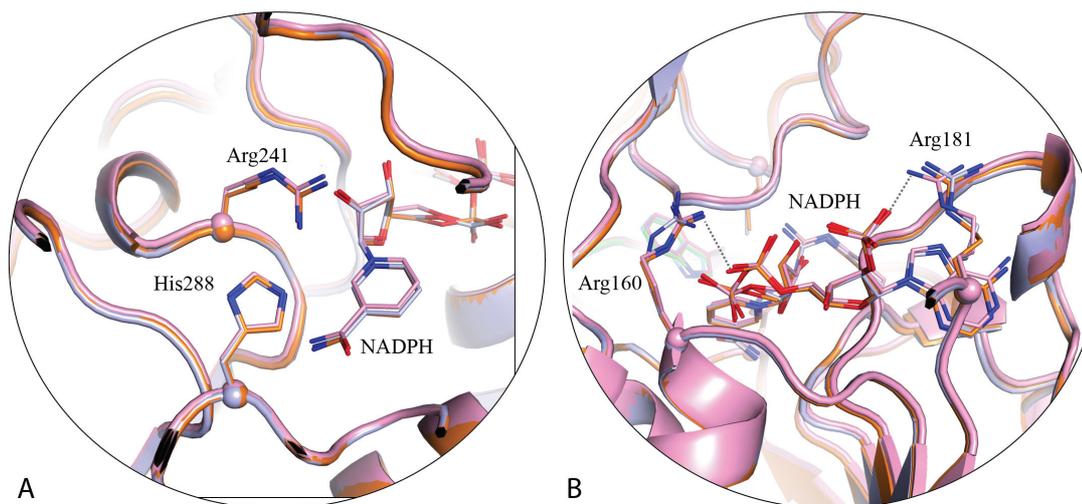


Figure 5.9 Site de fixation du NADPH dans la structure de PfuGRHPR. Superposition de la structure de PfuGRHPR obtenue à pression ambiante (rose), à 280 MPa (orange) et 370 MPa (bleu). (A) Vue du site actif avec l'histidine catalytique (His288), l'arginine qui stabilise le substrat (Arg241) et le NADPH. (B) Vue des arginines stabilisant le NADPH. L'Arg181 interagit avec le phosphate seulement présent dans la molécule de NADPH et pas dans le NADH.

Les résidus catalytiques (His288 et Arg241) se superposent parfaitement dans les trois structures (Figure 10.A). L'Arg241 est orientée à l'intérieur du site actif comme dans les structures de PyaGRHPR. Par contre, nous observons un déplacement des Arg160 et Arg181 qui interagissent avec le cofacteur (Figure 10.B). L'Arg181 est particulièrement intéressante car elle coordonne le phosphate supplémentaire du NADPH. La distance d'interaction de l'Arg181 et du phosphate est de 2,60, 2,93 et 3,05 Å à pression ambiante, 280 MPa et 370 MPa respectivement. Dans le cas de l'Arg160, une conformation alternative dans la structure à 370 MPa apparaît qui rompt l'interaction de l'azote NE avec le phosphate.

Il est intéressant de remarquer que bien que aucun mouvement global ne soit visible sur les structures de PfuGRHPR, une analyse fine des interactions permet de mettre en évidence des changements entre la structure à pression ambiante et celles

aux hautes pressions. Ces changements semblent indiquer une atténuation de l'interaction du NADPH avec l'enzyme. Il est difficile d'interpréter cette observation en lien avec nos résultats de mesures d'activité. Nous pouvons proposer que la pression pourrait diminuer l'affinité de l'enzyme pour le cofacteur (en tout cas chez PfuGRHPR). Dans ce cas, l'activité catalytique serait diminuée. Mais il est possible que cet effet impact seulement la constante de dissociation et dans ce cas en relâchant plus rapidement le produit de la réaction, l'enzyme augmenterait son activité catalytique. Nous pouvons remarquer que si la pression affecte l'Arg181 qui interagit seulement avec le NADPH, cela pourrait être une clé pour expliquer les différences de comportement spécifiques en présence de NADH ou NADPH.

Nous avons aussi comparé les structures obtenues pour PyaGRHPR, en mesurant plus particulièrement les distances d'interactions entre le NADPH et les Arg181 et Arg160. Nous n'avons pas détecté de différences significatives. Les différences les plus frappantes sont visibles dans la structure de PfuGRHPR à 370 MPa, il est possible qu'à 300 MPa, les effets de la pression sur la fixation du NADPH ne soient pas encore visible dans la structure de PyaGRHPR.

5.4.3.1. Accessibilité du site actif

Nous avons identifié dans la structure à 100 K de PfuGRHPR un état intermédiaire qui semblait lié à la présence de glyoxylate dans la structure (cf. chapitre 4). Cet état se caractérisait par la présence d'un tunnel reliant le site actif à l'extérieur. Ce tunnel était fermé dans la structure à 100 K de PyaGRHPR qui contenait du D-glycérate.

Nous avons étudié l'évolution sous pression du tunnel permettant l'entrée du substrat dans le site actif. De manière similaire à ce qui a été fait dans le chapitre 4, nous avons visualisé avec le programme HOLLOW la cavité autour du Trp138 dans les structures de PfuGRHPR (Figure 5.10). Ce programme représente l'espace accessible autour d'un résidu.

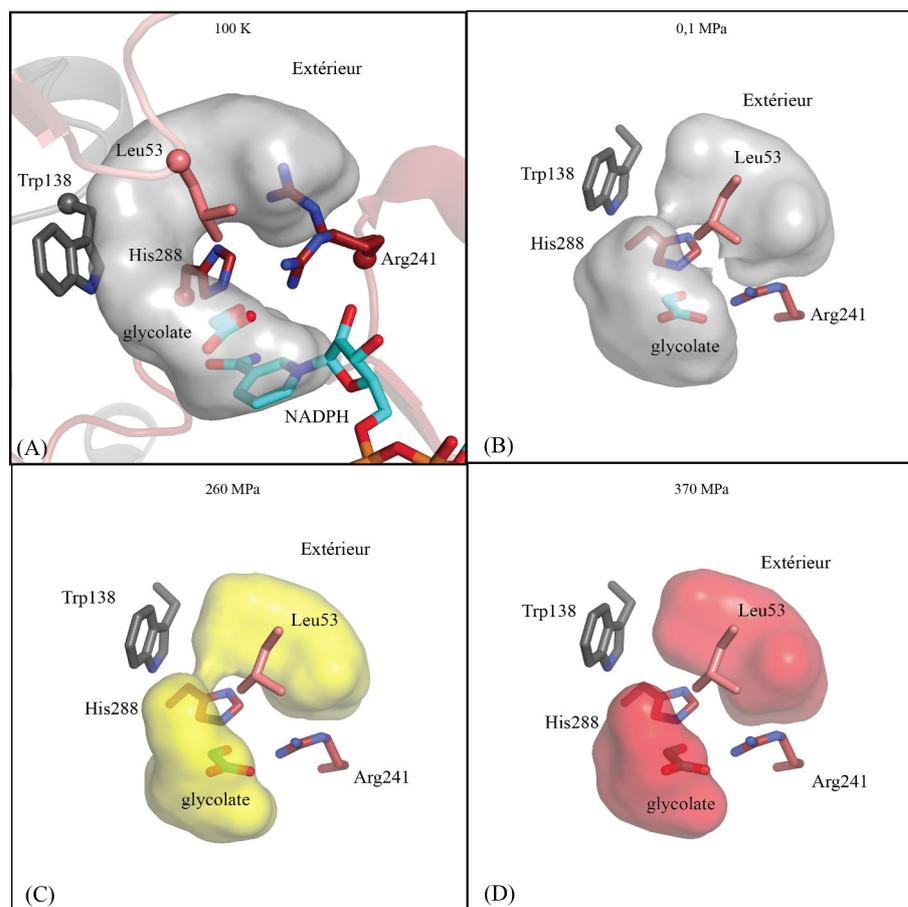


Figure 5.10. Evolution de l'accessibilité du site actif de PfuGRHPR sous pression. Représentation sous PYMOL du résultat de l'analyse avec le logiciel HOLLOW. Représentation des résidus participant à la formation du tunnel en bâton. (A) Structure de PfuGRHPR à 100 K. (B) Structure de PfuGRHPR à 0,1 MPa. (C) Structure de PfuGRHPR à 260 MPa. (D) Structure de PfuGRHPR à 370 MPa.

A pression ambiante et à température ambiante, le tunnel est moins ouvert qu'à 100 K. La taille du tunnel diminue à 280 MPa jusqu'à sa fermeture complète à 370 MPa.

Après comparaison des structures à 100 K de PfuGRHPR et PyaGRHPR (cf. chapitre 4), nous avons proposé que la Leu43 et le Trp138 participe à l'ouverture et la fermeture du tunnel. En comparant les structures de PfuGRHPR obtenues à différentes pressions, nous avons identifié un léger décalage de la Leu53 et du Trp138. Les observations faites sous pression confirment l'implication de ces deux résidus dans l'ouverture et la fermeture du tunnel.

Dans les structures de PyaGRHPR à températures ambiantes, le tunnel est fermé, quelle que soit la pression appliquée, ce qui correspond aux observations faites sur la structure à 100 K de PyaGRHPR.

5.5. Discussion

Nous avons réalisé une étude exhaustive du comportement spécifique sous pression des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* à différentes températures. Cet ensemble de données nous a permis d'identifier des caractéristiques différentes entre les enzymes. L'enzyme PfuGRHPR est relativement peu sensible aux effets de la pression, surtout à 25 °C. En effet, la valeur de P_{100} reste égale ou inférieure à 1, c'est à dire que son activité n'est jamais augmentée par la pression, quelque soit les conditions. A l'inverse, l'activité des enzymes de PhoGRHPR et PyaGRHPR est augmentée sous pression, notamment en présence de NADPH et à 25 °C (1,4 et 1,5 respectivement). La sensibilité de PyaGRHPR sous pression est reflétée par le comportement de la structure cristallographique de cette enzyme à 300 MPa. En comparant la structure à 300 MPa à celle obtenue à pression ambiante, nous avons pu détecter un mouvement de domaine. Le domaine SBD se rapproche du domaine NDB, mimant le processus catalytique

A partir de l'activité spécifique exprimée en logarithme, il est possible de calculer le ΔV de la réaction (cf. chapitre 1). Pour les GRHPR, nous disposons de trop peu de points pour extraire les valeurs de ΔV . Dans le cas de PhoGRHPR et PyaGRHPR dont l'activité est augmentée par la pression, l'optimum de pression se situe autour de 200 MPa.

Le NADPH favorise l'augmentation d'activité induite par la pression. Cet effet est particulièrement visible pour les enzymes PhoGRHPR et PyaGRHPR. Le phosphate supplémentaire du NADPH est en interaction avec l'Arg181. L'analyse des structures de PfuGRHPR à différentes pressions a mis en évidence une augmentation des distances d'interaction entre l'Arg181 et ce phosphate. Il est difficile d'interpréter cette observation en lien avec les données spécifiques car cette interaction est impliquée dans le K_m de l'enzyme pour le substrat mais aussi dans la constante de dissociation du produit. Nous pouvons toutefois remarquer que si la pression affecte l'Arg181 qui interagit seulement avec le NADPH, cela pourrait être une clé pour expliquer les différences de comportement spécifiques en présence de NADH ou NADPH.

Nous avons observé une différence de comportement spécifique des enzymes aux différentes températures. En effet, la basse température favorise l'activité spécifique sous pression. A 25 °C, les enzymes dont l'activité diminuaient fortement sous pression, maintiennent leur activité à 100 % sur toute la gamme de pression testée (0,1 à 400 MPa). Les GRHPR étant des enzymes hyperthermophiles avec une température optimale de 85 °C, il est peu probable que la différence entre les données obtenues à 25 et 50 °C soient dues à un effet de la température sur la stabilité de l'enzyme.

CHAPITRE VI

ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DE LA PRESSION SUR LES MALATE DÉSHYDROGÉNASES PROVENANT DE BACTÉRIES ISOLÉES À DIVERSES PROFONDEURS

6.1. Introduction

L'adaptation du vivant à la pression peut porter sur différents composants et processus cellulaires (Abe, 2007; Oger & Jebbar, 2010). Nous nous intéressons à révéler une éventuelle adaptation portant sur les protéines elles mêmes. L'effet de la pression sur les protéines mésophiles a été largement décrit (Akasaka, 2006; Balny et al., 2002; Royer, 2002). Sachant que la pression peut affecter l'activité autant que la stabilité, nous avons choisi des enzymes multimériques pour suivre les deux paramètres. Nous avons choisi comme enzyme modèle la malate déshydrogénase tétramérique (MDH). Les MDH tétramériques appartiennent à la superfamille spécifique des malate et lactate déshydrogénase (LDH). Les malate désydrogénases se scindent en deux groupes distincts l'un regroupant les enzymes dimériques, l'autre les enzymes tétramériques. Les MDH tétramériques présentent des similarités de séquences plus élevés avec les LDH qu'avec les enzymes du groupe des MDH dimériques (Madern, 2002). Les MDH catalysent l'oxydation du malate en oxaloacétate en utilisant le NADH comme donneur d'électrons. Ce sont des homotétramères de 120 kDa.

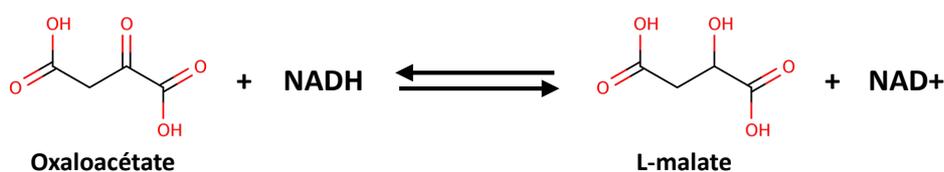


Figure 6.1. Réaction de réduction de l'oxaloacétate en L-malate catalysée par la MDH et accompagnée par la réduction du NADH en NAD⁺.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi de caractériser les MDH issues de 6 bactéries qui ont été isolées à différentes profondeurs. Nous avons choisi deux organismes isolés dans la Fosse des Mariannes, *Thermaerobacter marianensis* (Tma) (Takai et al., 1999) et *Geobacillus kaustophilus* (Gka) (Takami et al., 2004). Ces organismes, appartenant au phylum *Firmicutes*, sont des thermophiles (optimum de croissance de 60 °C pour *G. kaustophilus* et 75 °C pour *T. marianensis*). Dominique Madern de l'équipe ELMA à l'IBS a réalisé une analyse des séquences des MDH tétramériques dans ce phylum afin d'identifier des référents de surface

thermophile ayant le minimum de divergence de séquence (cf. annexe). Nous avons choisi comme référents de surface : *Chloroflexus aurantiacus* (Cau) (Pierson & Castenholz, 1974), *Pelotomaculum thermopropionicum* (Pth) (Imachi et al., 2002) et *Thermaerobacter nagasakiensis* (Tna) (Nunoura et al., 2002). La séquence de l'enzyme de *T. nagasakiensis* a été déterminée par Philippe Oger (laboratoire LGLTPE ENS à Lyon). Pour compléter l'étude, nous avons choisi *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Dku) (Nazina et al., 1988) qui a été isolé à une profondeur intermédiaire (-3000 mètres). La profondeur d'isolement ainsi que la température optimale de croissance pour chaque organisme sont indiquées dans la figure 6.1. Les bactéries n'ont pas été caractérisées en laboratoire du point de vue de leur comportement sous pression. Nous nous baserons dans cette étude sur la profondeur à laquelle elles ont été isolées. Notre objectif est de savoir si, comme la température ou la salinité, la pression constitue une contrainte susceptible de provoquer une adaptation via la sélection de mutations favorisant la stabilité ou le fonctionnement des enzymes dans les conditions abyssales. Les organismes sélectionnés sont tous des thermophiles ce qui permet de limiter l'influence de la température dans notre étude comparative de l'influence de la pression.

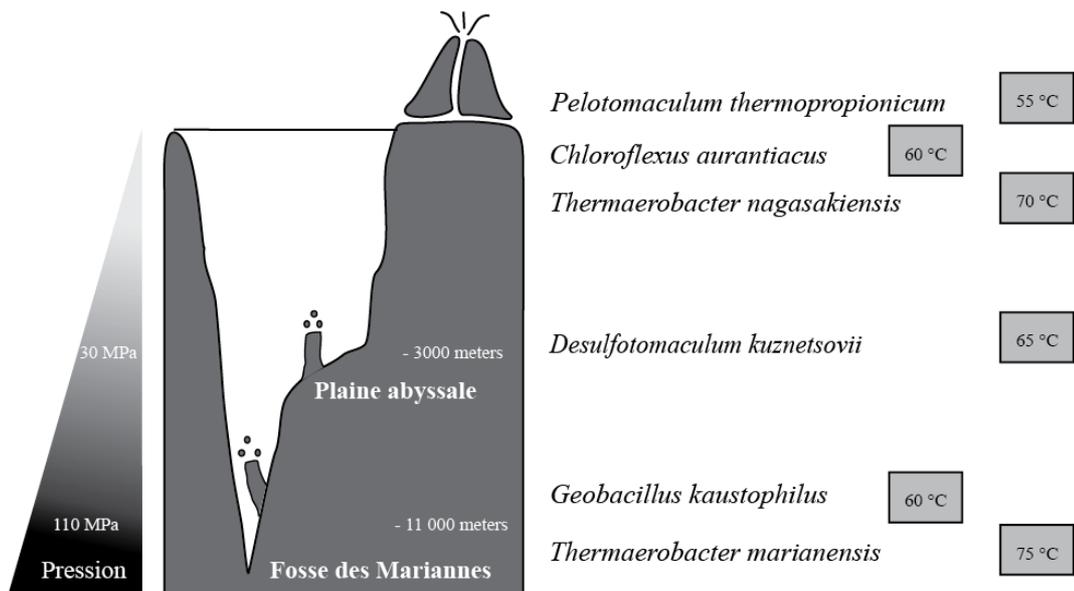


Figure 6.2. Coupe transversale des fonds marins. Les organismes sont positionnés selon la profondeur à laquelle ils ont été isolés. La température optimale de croissance pour chaque organisme est indiquée dans le rectangle gris. La pression correspondant à la colonne d'eau est indiquée à gauche du schéma.

L'ensemble des MDH de cette étude partage entre 74 et 86 % de similarité de séquence, allant jusqu'à 98 % entre les MDH de *T. marianensis* et *T. nagasakiensis*. Pour illustrer les similarités de séquence entre les différentes MDH de cette étude, nous avons représenté un arbre où la longueur des branches indique le pourcentage de similarité de séquence (Figure 6.2).

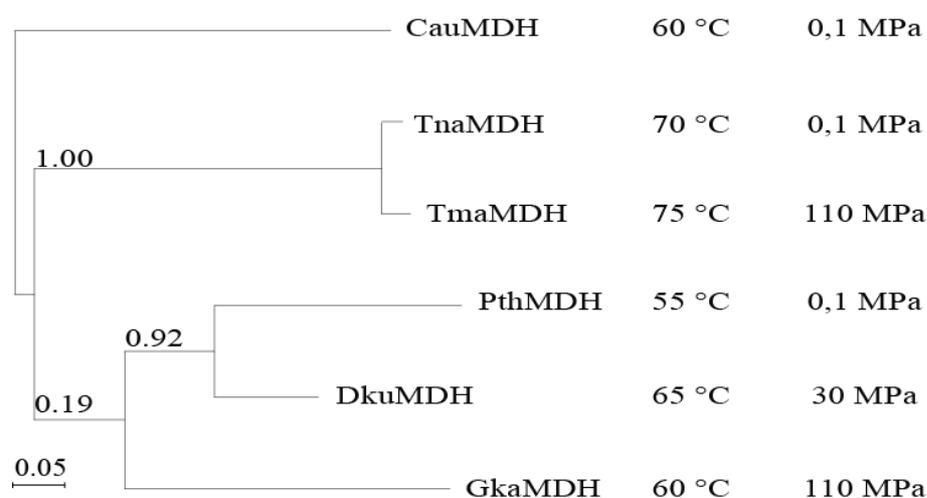


Figure 6.3. La similarité de séquence des différentes MDH est représentée par un arbre schématique. La température optimale de croissance pour chaque organisme est indiquée dans la seconde colonne. La pression correspondant à la colonne d'eau est indiquée dans la troisième colonne. Les valeurs reportées sont identiques à celles de la figure 6.2

Les MDH de *T. marianensis* et *T. nagasakiensis* sont séparées par des branches courtes car elles partagent 98 % de similarité de séquence (soit 13 résidus non similaire). A l'inverse, la séquence de la MDH de *C. aurantiacus* est relativement éloignée par rapport aux cinq autres MDH. La similarité des séquences des MDH de *P. thermopropionicum* et *D. kuznetsovii* est en lien avec la proximité des génomes des deux espèces identifiée récemment par analyse génomique (Visser et al., 2013). La MDH de *G. kaustophilus* est plus proche en séquence des MDH de *P. thermopropionicum* et *D. kuznetsovii* que des MDH provenant du genre *Thermaerobacter*. Les mêmes observations peuvent être faites au niveau de l'arbre phylogénétique décrit précédemment (cf. Annexe 6.2)

Nous avons appliqué la même approche intégrative que celle développée dans le cadre de l'étude des GRHPR (chapitre 4 et 5). Nous avons cherché à mettre en lumière des différences de propriétés au niveau de l'activité et de la stabilité. Nous avons aussi associé à cette étude la détermination de leurs structures par cristallographie des rayons X conventionnelle et sous hautes pressions hydrostatiques.

6.2. Analyse de la composition en acides aminés des malate déshydrogénases

J'ai analysé la composition en acides aminés des séquences de MDH. J'ai utilisé le programme *PROTPARAM* (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>). La composition en acides aminés pour chaque enzyme est rapportée dans le tableau 6.1. Comme les enzymes ont une séquence de longueur similaire (à 1 acide aminé près), j'ai indiqué le nombre absolu d'acide aminé pour chaque type de résidu.

	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	GkaMDH
Ala	40	40	34	31	33	27
Arg	14	13	20	12	20	13
Asn	11	15	6	9	7	11
Asp	16	18	19	17	19	18
Cys	1	3	1	2	1	1
Gln	7	3	8	6	8	7
Glu	19	17	20	20	18	23
Gly	28	29	30	30	30	30
His	2	2	5	3	5	1
Ile	22	25	19	24	19	24
Leu	28	25	29	24	28	29
Lys	15	17	12	20	13	21
Met	11	9	10	10	10	10
Phe	7	7	9	8	9	8
Pro	16	13	14	15	14	13
Ser	16	18	15	12	16	14
Thr	16	14	15	19	14	19
Trp	1	1	1	1	1	0
Tyr	9	10	8	12	8	12
Val	30	33	34	35	36	31

Tableau 6.1. Contenu en acides aminés de la séquence des malates déshydrogénases. Le calcul du contenu en acide aminé a été effectué par le programme ProtParam (Wilkins et al., 1999). Pour chaque enzyme, le nombre absolu d'acide aminé est reporté

Pour analyser ce tableau, j'ai, dans un premier temps, analysé les différences entre le groupe des enzymes provenant d'organismes de surface (CauMDH,

PthMDH et TnaMDH, gauche du tableau 6.1) et celles provenant d'organismes abyssaux (DkuMDH, TmaMDH et GkaMDH, droite du tableau 6.1). Je n'ai pas identifié de tendance claire sur la composition en acide aminé entre les deux groupes.

Par contre, si l'on exclut TnaMDH, il apparaît que les séquences protéiques d'enzymes provenant d'organismes abyssaux contiennent moins d'alanine (27-33 alanines) que celles provenant d'organismes de surface (40 alanines).

De plus, la séquence protéique de TmaMDH, ainsi que celle de TnaMDH, contient plus d'arginines que les autres séquences de MDH. Cette tendance a été observée chez les lactates déshydrogénase de poissons provenant des fonds marins (Brindley et al., 2008). A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas expliquer pourquoi cette caractéristique est seulement présente chez les MDH provenant de *Thermaerobacter*.

Il est à noter que, contrairement aux 5 autres MDH, l'enzyme GkaMDH ne possède pas de tryptophane.

Des études menées sur un ensemble de génome d'organismes piézophiles et non-piézophiles caractérisés en laboratoire n'ont pas mis en évidence d'acides aminés liés au caractère piézophile (Vincent Daubin et collaborateurs, LBBE à Lyon, données non publiées). Il n'est donc pas aberrant que l'on ne détecte pas de différence dans la composition en acides aminés des 6 MDH.

J'ai aussi réalisé un alignement de séquences de l'ensemble des MDH. Il est présenté en annexe (cf. Annexe 6.1). L'analyse des mutations entre les différentes MDH sera faite dans le contexte de leur position dans la structure de l'enzyme. Cependant, on peut remarquer que l'enzyme GkaMDH comporte de nombreuses mutations différentes des 5 autres MDH.

6.3. Effets de la pression sur l'activité spécifique des différentes malate déshydrogénases

6.3.1. Caractérisation des malate déshydrogénases à pression ambiante

Pour étudier les propriétés spécifique des MDH et en caractériser ultérieurement le comportement sous pression, nous avons fait synthétiser les fragment d'ADN correspondant aux gènes codants pour les enzymes de *C. aurantiacus*, *P. thermopropionicum*, *T. nagasakiensis*, *D. kuznetsovii*, *T. marianensis* et *G. kaustophilus*. Ces fragments on été clonés dans le plasmide Pet 41a. La purification des enzymes sur-exprimées est décrite dans la partie Matériels et Méthodes (chapitre 2). Le choc thermique a été adapté à leur température optimale d'activité. La concentration en protéine a été déterminée par la méthode d'absorbance à 280 nm. La pureté des échantillons, vérifiée par spectrométrie de masse et gel de polyacrylamide, étant supérieure à 99 %, nous avons utilisé le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de chaque enzyme rapporté dans le tableau ci-dessous :

	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
CauMDH	18910
PthMDH	20525
DkuMDH	23250
TnaMDH	17420
TmaMDH	17420
GkaMDH	17880

Tableau 6.2. Valeurs des coefficients d'extinction molaire (ϵ) des MDH

En premier lieu, j'ai défini les conditions optimales pour mesurer l'activité de chacune des enzymes. J'ai déterminé l'optimum de pH, de concentration en sels

et les paramètres cinétiques. Les données pour les 6 enzymes sont indiquées dans le tableau 6.2. Les mesures ont été faites en triplicat. Les paramètres cinétiques ont été déterminés en mesurant l'activité spécifique sur une large gamme de concentration en substrat allant de 0,04 à 4 mM à 15 concentrations différentes. Ensuite, les données ont été analysées grâce au logiciel PRISM afin d'obtenir les valeurs de l'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_m) et l'activité catalytique ou « turn over » (k_{cat}). Les équations utilisées sont décrites dans le chapitre 2, paragraphe 2.1.1.

Nom de l'enzyme	Optimum de pH	Optimum de concentration en KCl (M)	K_M OAA (μ M)	k_{cat} (s^{-1})
CauMDH	8,5	0,5	165 +/- 20	0,04 +/- 0,02
PthMDH	> 9	0,5	150 +/- 50	0,06 +/- 0,02
TnaMDH	8,5	0,5	50 +/- 20	0,8 +/- 0,06
DkuMDH	> 9	0,5	170 +/- 50	0,11 +/- 0,06
TmaMDH	8	0,5	140 +/- 60	0,09 +/- 0,03
GkaMDH	> 9	0,5	248 +/- 80	0,11 +/- 0,02

Tableau 6.3. Caractérisation à pression ambiante des 6 MDH. Les mesures ont été faites en triplicat à 50 °C. Pour la détermination des paramètres cinétiques, les mesures d'activités ont été effectuées en triplicat à 15 concentrations en substrats différentes de 0,04 à 4 mM en oxaloacétate avec une concentration en NADH de 0,36 mM. La concentration en enzyme est comprise entre 0,3 et 0,5 μ g/ml.

L'optimum de pH se situe à un pH relativement basique pour l'ensemble des MDH. Une concentration de 0,5 M de KCl favorise l'activité spécifique. Les paramètres cinétiques ont été obtenus en dérivant l'équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition par le substrat. L'enzyme TnaMDH présente une affinité forte ainsi que des valeurs de k_{cat} supérieures aux autres MDH.

Outre le pH, j'ai aussi déterminé la température optimale pour l'activité de chaque enzyme. Les résultats sont portés sur le tableau 6.3, ainsi que la température de croissance des organismes correspondant et la vitesse maximale d'activité obtenue à température optimale.

Nom de l'enzyme	Température optimale l'organisme (°C)	Température optimale l'enzyme (°C)	Activité spécifique maximale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
CauMDH	60	60	400
PthMDH	55	60	850
TnaMDH	70	70	623
DkuMDH	65	70	840
TmaMDH	75	80	600
GkaMDH	60	60	823

Tableau 6.4. Température optimale des enzymes et des organismes correspondant.

Ces enzymes ont une activité optimale comprise entre 60 et 80 °C. Ce sont donc des enzymes thermophiles. Cette valeur se corrèle avec la température optimale de croissance des organismes dont elles ont été isolées.

6.3.2. Caractérisation de l'activité spécifique des MDH à haute pression

Les conditions expérimentales sont décrites dans le chapitre 3, notamment le choix du tampon (Tris-Phosphate 100 mM pH 8). J'ai exploré pour chaque enzyme leur comportement spécifique sous pression à température optimale et à des températures plus basses (10 et 25 °C). Suite à des limitations techniques (cf. chapitre 3), nous n'avons pas pu réaliser des expériences à des températures plus basses telles que celles retrouvées dans les océans profonds (2-3 °C).

Pour quantifier l'augmentation d'activité observée sous HPH et effectuer des comparaisons entre enzymes, nous utilisons le P_{100} , qui correspond à la variation d'activité pour 100 MPa suivant l'équation 2.9.

L'ordre de présentation des résultats reflète les isolats allant de la surface jusqu'au fond de la Fosse des Mariannes.

6.3.2.1. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Chloroflexus aurantiacus*

Le comportement spécifique de CauMDH a été exploré sous pression à différentes températures et est présenté en figure 6.4. Les données sont représentées en pourcentage d'activité spécifique afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues à pression ambiante sont de $401 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 60°C , de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25°C et de $9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10°C .

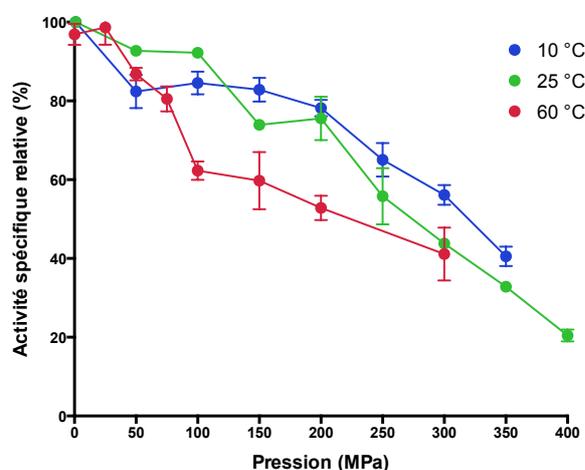


Figure 6.4 Comportement spécifique sous pression de CauMDH. Les expériences ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de $0,8 \text{ mM}$ et $0,2 \text{ mM}$ de NADH. L'activité a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ et est exprimée en pourcentage d'activité. Les données obtenues à 60°C sont représentées en rouge, celles à 25°C en vert et celles à 10°C en bleu.

L'activité spécifique semble décroître de manière quasi monotone à toutes les températures. A 60°C , les mesures à 100 MPa pourraient indiquer un changement de régime dans le processus de désactivation si on considère que la pente entre 0 et 100 MPa est plus forte de que celle obtenue entre 100 et 400 MPa . Dans la figure 6.4, les données sont représentées en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. En général, les variations d'activité en fonction de la pression sont représentées en échelle logarithmique. En effet, la pente du logarithme de l'activité ou de k_{obs} en fonction de la pression correspond au ΔV_{obs} de la réaction selon l'équation suivante :

$$\frac{\partial \ln k_{obs}}{\partial P} = -\frac{\Delta V_{obs}}{RT} \quad (6.1)$$

Les données obtenues à 60 °C pour CauMDH sont représentées sur la figure 6.6. Les valeurs d'activités absolues ont été transformées en logarithme.

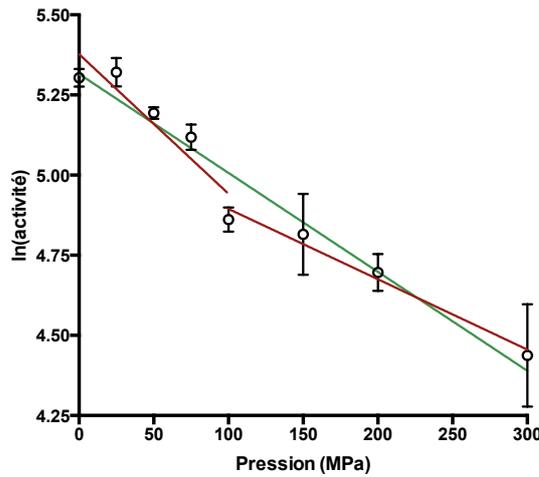


Figure 6.6. Activité spécifique de CauMDH en fonction de la pression à 60 °C. Les expériences ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ et exprimée en logarithme. La courbe en vert représente le fit 1 sur l'ensemble des données. Les courbes en rouge représente le fit 2 sur les données de 0,1 à 100 MPa et 100-300 MPa .

Les mesures d'activité spécifique de CauMDH obtenue à 60 °C peuvent être décrites par un seul régime (fit 1, droite verte) ou par deux régimes (fit 2, droites rouges). J'ai calculé le ΔV associé à chacun des régimes.

	ΔV (ml.mol ⁻¹)
Fit 1	
0,1-300 MPa	15,2
Fit 2	
0,1-100 MPa	21,4
100-300 MPa	10,8

Tableau 6.4. Calcul du ΔV à partir des données d'activités de CauMDH à 60 °C. Le ΔV est calculé à partir de l'équation 6.1. Les valeurs sont exprimées en ml.mol⁻¹

D'un point de vue biologique, une modification de régime peut être dû à un changement de l'étape limitante de la réaction, un changement dans la compressibilité de l'enzyme ou une déstabilisation de l'édifice tétramérique. A ce stade, il est difficile de donner une explication précise. Le ΔV associé aux faibles pressions (0,1-100 MPa) est deux fois plus important que celui associé aux fortes pressions (100-300 MPa).

J'ai reproduit la même analyse pour les basses températures afin de suivre l'évolution du système à deux régimes en fonction de la température. Les données obtenues à 25 °C pour CauMDH sont représentées sur la figure 6.6. Les valeurs d'activités absolues ont été transformées en logarithme.

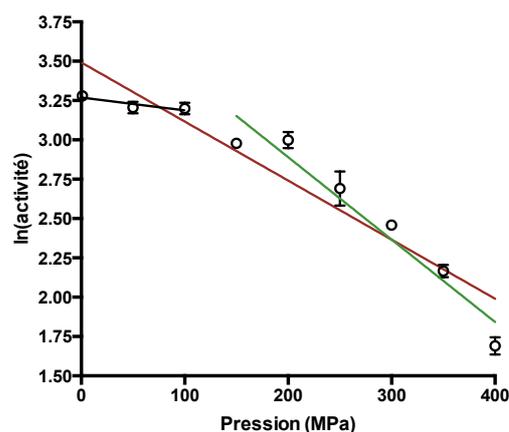


Figure 6.6 Activité spécifique de CauMDH en fonction de la pression à 25 °C. Les expériences ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ et exprimée en logarithme. La courbe en rouge représente le fit 1 sur l'ensemble des données. Les courbes en vert représentent le fit 2 sur les données de 0,1 à 100 MPa et 100-400 MPa

Les données d'activités de CauMDH obtenue à 25 °C peuvent, à nouveau, être décrites par un seul régime (fit 1, courbe verte) ou par deux régimes (fit 2, courbes rouges). J'ai calculé le ΔV associé à chacun des régimes (Tableau 6.5).

	ΔV (ml.mol ⁻¹)
Fit 1	
0,1-400 MPa	7,7
Fit 2	
0,1-100 MPa	1,7
100-400 MPa	12,7

Tableau 6.5. Calcul du ΔV à partir des données d'activités de CauMDH à 25 °C. Le ΔV est calculé à partir de l'équation 6.1. Les valeurs sont exprimées en ml.mol⁻¹

Au vu des courbes, le second fit semble mieux décrire le comportement de CauMDH sous pression. Jusqu'à 100 MPa, l'activité n'est que très peu impactée par la pression ($\Delta V=1,9$). Ensuite, l'activité diminue fortement à mesure que la pression augmente. Aux faibles pressions, le comportement à 25 °C contraste avec celui observé à 60 °C. A 60 °C, l'activité est fortement impactée avec un ΔV de 21 ml.mol⁻¹ alors qu'il n'est que de 1,9 à 25 °C. Aux fortes pressions, le ΔV est similaire à 25 et 60 °C (12,7 et 10,8 ml.mol⁻¹ respectivement).

Pour confirmer l'inversion du comportement de ΔV aux basses températures, j'ai effectué la même analyse avec les données à 10 °C. Les données obtenues à 10 °C pour CauMDH sont représentées sur la figure 6.7. Les valeurs d'activités absolues ont été transformées en logarithme.

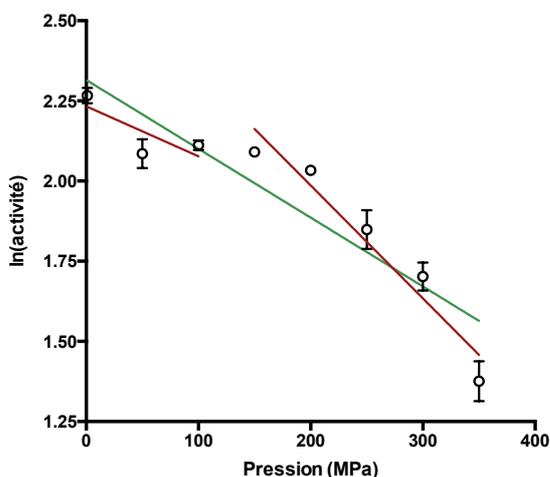


Figure 6.7. Activité spécifique de CauMDH en fonction de la pression à 10 °C. Les expériences ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ et exprimée en logarithme. La courbe en vert représente le fit 1 sur l'ensemble des données. Les courbes en rouge représentent le fit 2 sur les données de 0,1 à 100 MPa et 100-400 MPa

Les données d'activités de CauMDH obtenue à 10 °C peuvent être décrites par un seul régime (fit 1, courbe verte) ou par deux régimes (fit 2, courbes rouges). J'ai calculé le ΔV associé à chacun des régimes ainsi que l'écart type des résidus pour chaque droite (Tableau 6.6).

	ΔV (ml.mol ⁻¹)
Fit 1	
0,1-400 MPa	1,8
Fit 2	
0,1-100 MPa	1,3
100-400 MPa	3,4

Tableau 6.6. Calcul du ΔV à partir des données d'activités de CauMDH à 10 °C. Le ΔV est calculé à partir de l'équation 6.1. Les valeurs sont exprimées en ml.mol⁻¹

Aux faibles pressions, le ΔV est similaire à 10 et 25 °C (1,3 et 1,7 ml.mol⁻¹ respectivement). Aux fortes pressions, il est plus élevé à 25 qu'à 10 °C (12,8 et

3,4 ml.mol⁻¹ respectivement). A basse température, l'activité spécifique de CauMDH est moins impactée par la pression.

Pour analyser la variation de ΔV en fonction de la température, les valeurs de ΔV aux faibles pressions (0,1-100 MPa) et aux fortes pressions (100-400 MPa) ont été reportées dans le tableau 6.7.

ΔV (ml.mol ⁻¹)	0,1-100 MPa	100-400 MPa	Rapport
10 °C	1,3	3,4	2,6
25 °C	1,7	12,7	7,5
60 °C	21,4	10,8	0,5

Tableau 6.7. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour CauMDH exprimées en ml.mol⁻¹. La troisième colonne indique le rapport entre le second et le premier régime.

Le ΔV est positif indépendamment des conditions de pression ou de température c'est à dire que la pression ne favorise pas l'activité de l'enzyme. L'activité spécifique de la malate tétramérique de *C. aurantiacus* présente donc une très forte sensibilité vis-à-vis de l'augmentation de pression. Le comportement bimodal de l'activité spécifique de CauMDH sous pression est indépendant de la température. Par contre, la valeur de ΔV fluctue en fonction de la température, sans qu'il soit possible d'identifier une tendance claire. Cependant, le rapport entre le ΔV aux faibles (0,1-100 MPa) et aux fortes (100-300 MPa) pressions subit un changement drastique entre les hautes (60 °C) et les basses (10 et 25 °C) températures. En effet, dans le premier cas, le ΔV est diminué par deux alors qu'il est multiplié par 7,5 et 2,6 aux basse températures (25 et 10 °C respectivement).

6.3.2.2. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Pelotomaculum thermopropionicum*

Les résultats obtenus pour l'enzyme PthMDH sont représentés dans la figure 6.8. Comme précédemment, l'activité spécifique est indiquée en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues à pression ambiante sont de 850 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 60 °C, de 112 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25 °C et de 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10 °C.

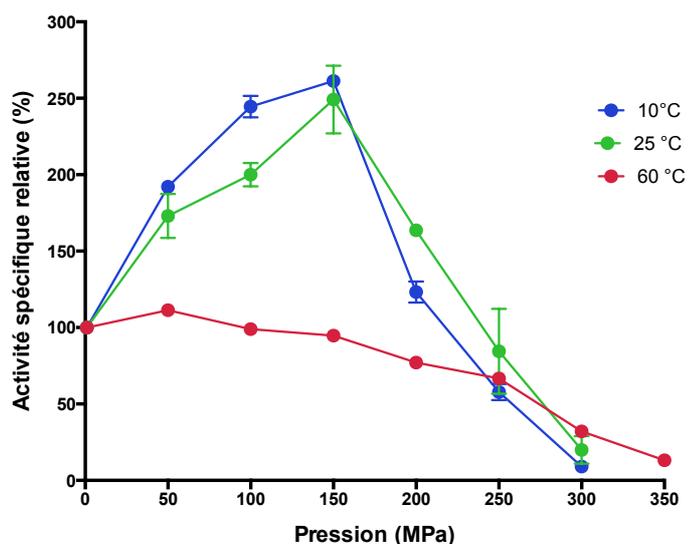


Figure 6.8. Comportement spécifique sous pression de PthMDH. Les mesures ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

A haute température, le comportement spécifique de PthMDH sous pression est similaire à celui de CauMDH. Par contre, aux basses températures (10 et 25 °C), l'activité spécifique de PthMDH est augmentée par la pression avec un optimum aux alentours de 150 MPa. Le pourcentage d'activation et la pression optimale sont identiques à 10 et 25 °C. Après l'optimum, l'activité diminue fortement. Le pourcentage d'activité à 300 MPa est alors proche de 30 % de l'activité initiale.

Les données en valeurs absolues d'activité exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour chaque température et à différentes pressions sont portées dans le tableau 6.8.

	60 °C	25 °C	10 °C
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	900	110	30
Activité spécifique à 150 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	800	280	80
P ₁₀₀	0,9	1,5	1,5

Tableau 6.8. Valeurs absolues d'activité spécifique de PthMDH à différentes pressions et températures. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en triplicat. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa.

L'activité spécifique est multipliée par 8 entre 25 et 60 °C et par 3,6 entre 10 et 25 °C à pression ambiante. La valeur de Q₁₀, c'est à dire la variation d'activité pour 10 °C, est de 2,3 pour PthMDH. Elle se situe dans la gamme de valeur identifiée pour d'autres enzymes thermophiles (Elias, Wieczorek, Rosenne, & Tawfik, 2014). Le P₁₀₀, c'est à dire la variation d'activité pour 100 MPa, est de 1,5. Il est identique à 10 et 25 °C (Equation 2.9). L'activité spécifique étant inhibée par la pression à 60 °C, la valeur de P₁₀₀ est inférieure à 1.

Le ΔV a été obtenu pour chaque température suivant l'équation 6.1. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.9.

	ΔV entre 0,1-150 MPa	ΔV entre 150-350 MPa
10 °C	-5,1	18,4
25 °C	-11,9	34,7
60 °C	2,8	59,0

Tableau 6.9. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour PthMDH exprimées en $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$

Les valeurs de ΔV sont en accord avec les observations faites précédemment à partir des courbes d'activité exprimées en activité relative (Figure 6.7). Le ΔV est positif à 60 °C. Aux basses températures (10 et 25 °C), le ΔV est négatif avant l'optimum (0,1-150 MPa) et positif après l'optimum (150-350 MPa). La valeur de

ΔV est plus faible à 10 °C qu'à 25 °C, ce qui indique que l'activité spécifique de PthMDH est moins sensible à la pression aux très basses températures.

Comme déjà mentionné précédemment, une modification dans le signe du ΔV peut être dû à un changement de l'étape limitante de la réaction, un changement dans la compressibilité de l'enzyme ou une déstabilisation de l'édifice tétramérique. D'autre part, les mesures sous hautes pressions ont été faites à de fortes concentrations en oxaloacétate (OAA) pour lesquelles un phénomène d'inhibition de l'activité spécifique par le substrat est observable avec les malate déshydrogénases étudiées.

Pour étudier plus finement le phénomène d'inhibition et l'influence que peut avoir la pression sur ce phénomène, les valeurs d'activité spécifique de PthMDH en fonction du substrat à pression ambiante et à 150 MPa sont reportées sur la figure 6.9. Les mesures ont été faites à 10 °C.

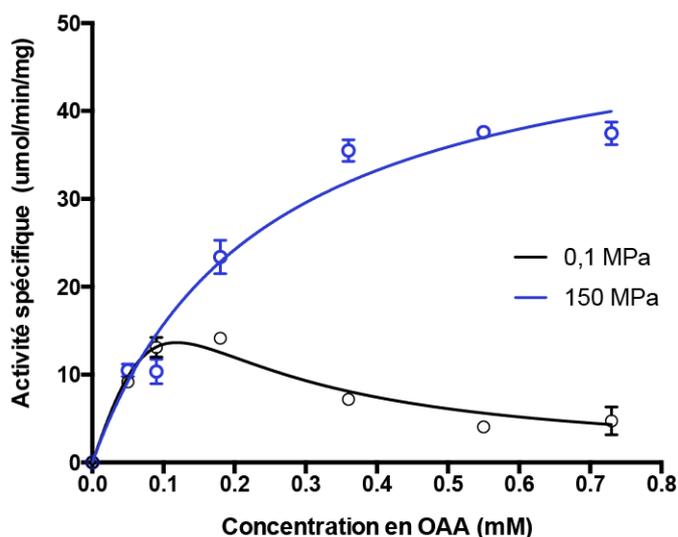


Figure 6.9. Variation de l'activité spécifique de PthMDH en fonction de la concentration en oxaloacétate (OAA) à deux pressions. Les mesures ont été réalisées en triplicat sur une gamme de concentration en oxaloacétate de 0,005-0,75 mM et avec 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$.

A pression ambiante, un phénomène d'inhibition est visible à partir de 0,1 mM d'oxaloacétate. Une pression de 150 MPa conduit à une levée de l'inhibition sur toute la gamme de concentrations mesurées. Il est possible que l'inhibition par le substrat soit présente à 150 MPa mais à des concentrations en substrat plus élevées. Il n'a pas été possible d'obtenir les paramètres cinétiques à pression ambiante car le nombre de points mesurés était insuffisant. Cependant, au vue de la courbe, l'activité spécifique maximale de l'enzyme est 4 fois plus importante à 150 MPa qu'à pression ambiante à 0,6 mM en oxaloacétate. A cause de

contraintes techniques, il n'a pas été possible d'effectuer des mesures à des températures plus élevées.

6.3.2.3. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter nagasakiensis*

Les résultats obtenus pour l'enzyme TnaMDH sont représentés sur la figure 6.10. Comme précédemment, l'activité spécifique est indiquée en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues à pression ambiante sont de $650 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 70°C , de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25°C et de $24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10°C .

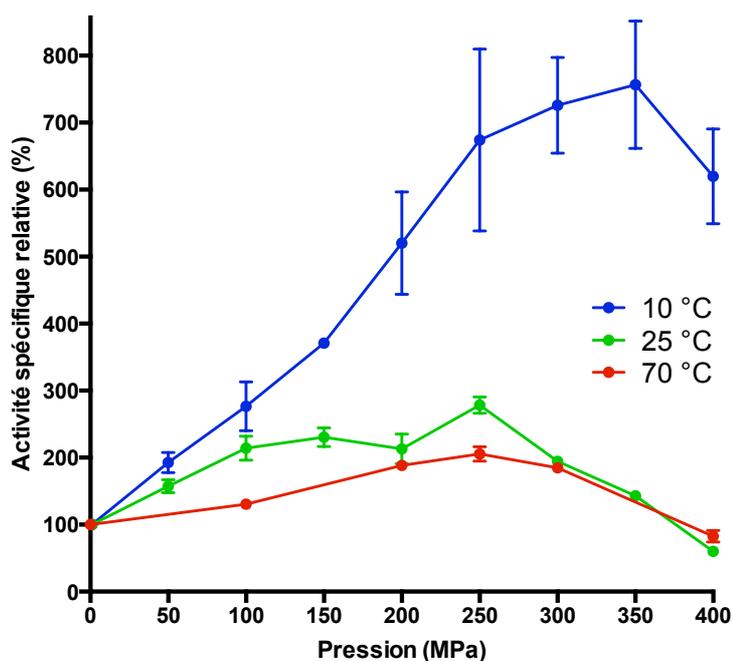


Figure 6.10. Comportement enzymatique sous pression de TnaMDH. Les mesures ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

L'activité spécifique de TnaMDH varie fortement avec la pression. A 70 et 25°C , l'activité spécifique est multipliée par deux. Par contre, à 10°C , l'activité spécifique est multipliée par 6. L'optimum de pression est de 250-350 MPa, indépendamment de la température. Le comportement spécifique de TnaMDH est très différent de ceux précédemment observés pour CauMDH et PthMDH.

Les données en valeurs absolues d'activité exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour chaque température et à différentes pressions sont portées dans le tableau 6.10.

	70 °C	25 °C	10 °C
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	346	66	28
Activité spécifique à 250 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	712	122	203
P ₁₀₀	1,3	1,3	2,2

Tableau 6.10. Valeurs absolues d'activité spécifique de TnaMDH à différentes pressions et températures. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en triplicat. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa.

La valeur de Q₁₀ pour TnaMDH est de 1,76. Cette valeur est plus faible que celle de PthMDH (2,3) mais reste dans la gamme de valeur identifiée pour d'autres enzymes thermophiles (Elias et al., 2014). L'activation par la pression varie en fonction de la température. Le P₁₀₀, c'est à dire la variation d'activité pour 100 MPa, est de 1,3 à 70 °C et de 1,27 à 25 °C et de 2,2 à 10 °C (Equation 2.9). Dans le cas de TnaMDH, le P₁₀₀ est impacté par la température. Il diminue lorsque la température augmente.

Le ΔV a été obtenu pour chaque température suivant l'équation 6.1. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.11.

	ΔV entre 0,1-250 MPa	ΔV entre 250-400 MPa
10 °C	- 5,9	1,23
25 °C	- 7,0	20,1
70 °C	- 16,7	36,2

Tableau 6.11. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour TnaMDH exprimées en $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les valeurs de ΔV sont en accord avec les observations faites précédemment à partir des courbes d'activité exprimées en activité relative (Figure 6.9). Le ΔV est négatif avant l'optimum (0,1-250 MPa) et positif après l'optimum (250-400 MPa). La faible valeur de ΔV à 10 °C après l'optimum reflète le peu de variation de

l'activité entre 250 et 400 MPa en prenant en compte les barres d'erreurs. L'enzyme est plus sensible à la pression aux hautes températures.

6.3.2.4. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Desulfotomaculum kuznetsovii*

Les résultats obtenus pour l'enzyme DkuMDH sont représentés dans la figure 6.11. L'activité spécifique est indiquée en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues sont de $840 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 70°C , de $80 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25°C et de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10°C .

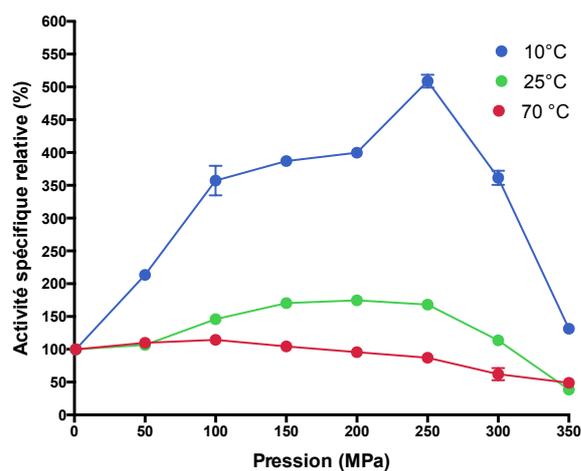


Figure 6.11. Comportement enzymatique sous pression de DkuMDH. Les mesures ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

A haute température, l'activité spécifique de DkuMDH diminue comme dans le cas de CauMDH et PthMDH. Par contre, aux basses températures (10 et 25°C), l'activité spécifique de DkuMDH est augmentée par la pression avec un optimum aux alentours de 250 MPa. La pression optimale est identique à 10 et 25°C . L'optimum d'activité est le même que celui de TnaMDH.

Les données en valeurs absolues d'activité exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour chaque température et à différentes pressions sont portées dans le tableau 6.12.

	70 °C	25 °C	10 °C
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	840	80	20
Activité spécifique à 250 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	680	135	102
P ₁₀₀	0,91	1,2	1,9

Tableau 6.12. Valeurs absolues d'activité spécifique de DkuMDH à différentes pressions et températures. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en triplicat. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa.

La valeur de Q₁₀ pour DkuMDH est de 2,1, elle était de 2,3 pour PthMDH. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa, c'est à dire la variation d'activité pour 100 MPa, est de 1,2 à 25 °C et de 1,9 à 10 °C (Equation 2.9). Dans le cas de DkuMDH, le P₁₀₀ est impacté par la température. Il diminue lorsque la température augmente.

Le ΔV a été obtenu pour chaque température suivant l'équation 6.2. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.13.

	ΔV entre 0,1-250 MPa	ΔV entre 250-400 MPa
10 °C	-4,7	10,6
25 °C	-4,9	43,1
70 °C	1,7	40,8

Tableau 6.13. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour DkuMDH exprimées en $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les valeurs de ΔV sont en accord avec les observations faites précédemment à partir des courbes d'activité exprimées en activité relative (Figure 6.10). Le ΔV est positif à 70 °C. Aux basses températures (10 et 25 °C), le ΔV est négatif avant l'optimum (0,1-250 MPa) et positif après l'optimum (250-400 MPa). La valeur de ΔV avant l'optimum est similaire à 10 °C et à 25 °C. Après l'optimum, la valeur de ΔV est similaire à 25 et 70 °C mais 4 fois plus faible à 10 °C.

Comme dans le cas de PthMDH, j'ai voulu vérifier si l'augmentation d'activité visible à 10 °C sous HPH était liée à l'absence d'inhibition par le substrat.

Les valeurs d'activité spécifique de DkuMDH en fonction du substrat à pression ambiante et à 150 MPa sont reportées sur la figure 6.12. Les mesures ont été faites à 10 °C.

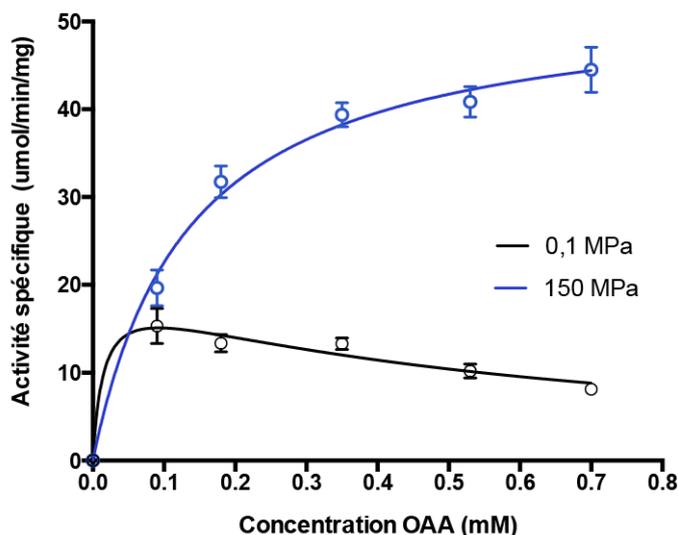


Figure 6.12. Variation de l'activité spécifique de DkuMDH en fonction de la concentration en oxaloacétate à différentes pressions. Les mesures ont été réalisées en triplicat sur une gamme de concentration en oxaloacétate (OAA) de 0,005-0,75 mM et avec 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les variations d'activité en fonction du substrat suit la même évolution que dans le cas de PthMDH : on observe une absence d'inhibition par le substrat à 150 MPa alors qu'elle est présente à pression ambiante. A 150 MPa, l'inhibition par le substrat est peut-être présente à des concentrations en substrats supérieures. L'activité maximale de l'enzyme est 4 fois plus importante à 150 MPa qu'à pression ambiante sur la gamme de concentration testée. Il n'a pas été possible d'obtenir les paramètres cinétiques à pression ambiante car le nombre de points mesurés était insuffisant.

6.3.2.5. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter marianensis*

Les résultats obtenus pour l'enzyme TmaMDH sont représentés sur la figure 6.13. L'activité spécifique est indiquée en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues sont de $600 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 80 °C, de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25 °C et de $13 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10 °C.

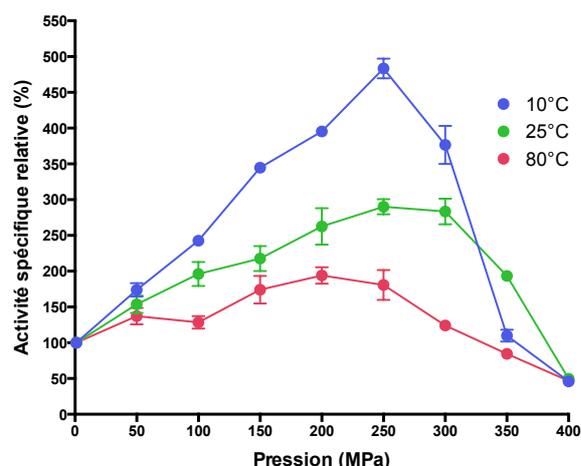


Figure 6.13. Comportement spécifique sous pression de TmaMDH. Les mesures ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

A haute température, l'activité spécifique de TmaMDH est activée par la pression. Ce comportement se confirme aux basses températures (10 et 25 °C). L'optimum de pression se situe aux alentours de 250 MPa et reste constant aux différentes températures, même s'il semble un peu plus faible à 80 °C (plutôt aux alentours de 200 MPa).

Les données en valeurs absolues d'activité exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour chaque température et à différentes pressions sont portées dans le tableau 6.14.

	80 °C	25 °C	10 °C
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	600	50	13
Activité spécifique à 250 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	1400	150	63
P_{100}	1,4	1,6	1,9

Tableau 6.14. Valeurs absolues d'activité spécifique de TmaMDH à différentes pressions et températures. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en triplicat. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P_{100} représente la variation d'activité pour 100 MPa

La valeur de Q_{10} pour TmaMDH est de 2,1 (elle était de 2,3 pour PthMDH et de 2,1 pour DkuMDH). Le P_{100} , c'est à dire la variation d'activité pour 100 MPa, est de 1,4 à 80 °C, de 1,6 à 25 °C et de 1,9 à 10 °C (Equation 2 .11). La valeur de P_{100} à

10 °C est proche de celle obtenue pour DkuMDH (1,9) mais plus faible que celle de TnaMDH (2,2). Comme dans le cas de DkuMDH et TnaMDH, le P_{100} diminue lorsque la température augmente.

Le ΔV a été obtenu pour chaque température suivant l'équation 6.1. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.15.

	ΔV entre 0,1-250 MPa	ΔV entre 250-400 MPa
10 °C	-5,0	13,1
25 °C	-8,3	22,6
80 °C	-15,7	58,1

Tableau 6.15. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour TmaMDH exprimées en $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les valeurs de ΔV sont en accord avec les observations faites précédemment à partir des courbes d'activité exprimées en activité relative (Figure 6.12). Le ΔV est négatif avant l'optimum (0,1-250 MPa) et positif après l'optimum (250-400 MPa) indépendamment de la température. La valeur du ΔV augmente quand la température augmente sur toute la gamme de pression (0,1-400 MPa) ce qui indique que l'activité spécifique de TmaMDH est moins sensible à la pression aux basses températures. La variation du ΔV face à la température est identique à celle observée pour TnaMDH.

Comme dans le cas de DkuMDH et PthMDH, j'ai voulu vérifier si l'augmentation d'activité visible à 10 °C sous HPH variait en fonction de la concentration en substrat. Les valeurs d'activité spécifique de TmaMDH en fonction du substrat à pression ambiante et à 150 MPa sont reportées sur la figure 6.14. Les mesures ont été faites à 10 °C.

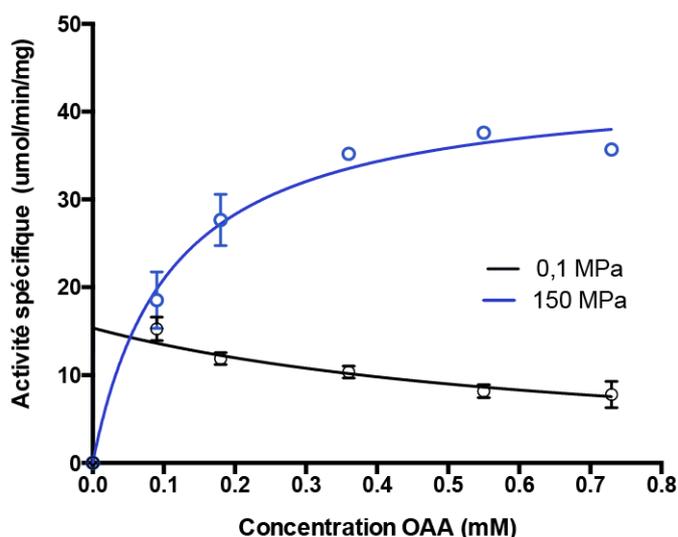


Figure 6.14. Variation de l'activité spécifique de TmaMDH en fonction de la concentration en oxaloacétate à différentes pressions. Les mesures ont été réalisées en triplicat sur une gamme de concentration en oxaloacétate (OAA) de 0,005-0,75 mM et avec 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les observations sont identiques à celles faites précédemment pour PthMDH et DkuMDH, la pression induit une levée de l'inhibition par le substrat. Il n'est pas exclu qu'une inhibition par le substrat soit présente à 150 MPa mais à des concentrations en substrat plus fortes. L'activité maximale de l'enzyme est 4 fois plus importante à 150 MPa qu'à pression ambiante sur la gamme de concentration testée. Il n'a pas été possible d'obtenir les paramètres cinétiques à pression ambiante car le nombre de points mesurés était insuffisant.

6.3.2.6. Caractérisation de la malate déshydrogénase de *Geobacillus kaustophilus*

Les résultats obtenus pour l'enzyme GkaMDH sont représentés sur la figure 6.15. L'activité spécifique est indiquée en pourcentage d'activité afin de comparer les effets de la pression à différentes températures. Les valeurs absolues sont de $823 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 80°C , de $105 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 25°C et de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ à 10°C .

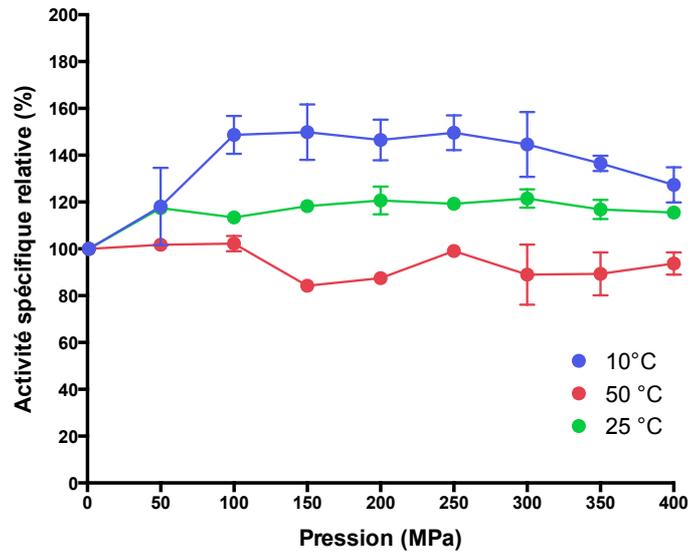


Figure 6.15. Comportement spécifique sous pression de GkaMDH. Les mesures ont été réalisées en triplicat à une concentration en oxaloacétate de 0,8 mM et 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

A haute température, l'activité spécifique de GkaMDH est légèrement activée par la pression. Ce comportement se confirme aux basses températures (10 et 25 °C). La forme très plane des courbes ne permet pas d'identifier une pression optimale avec certitude. L'activité atteint un plateau entre 100 et 300 MPa. L'activité spécifique de GkaMDH est maintenue jusqu'à aux très hautes pressions. A 400 MPa et à température optimale, GkaMDH conserve 80 % de son activité spécifique contre 40 % pour TmaMDH et 30 % pour DkuMDH.

Les données en valeurs absolues d'activité exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour chaque température et à différentes pressions sont portées dans le tableau 6.16.

	80 °C	25 °C	10 °C
Activité spécifique à 0,1 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	823	105	40
Activité spécifique à 200 MPa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	700	126	60
P ₁₀₀	0,92	1,1	1,3

Tableau 6.16. Valeurs absolues d'activité spécifique de TmaMDH à différentes pressions et températures. Les valeurs indiquées sont la moyenne de mesures réalisées en triplicat. L'activité spécifique est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Le P₁₀₀ représente la variation d'activité pour 100 MPa.

La valeur de Q₁₀ pour GkaMDH est de 1,8 (elle était de 2,3 pour PthMDH et de 2,1 pour DkuMDH et TmaMDH). Pour calculer le P₁₀₀, j'ai choisi l'activité moyenne à 200 MPa. Le P₁₀₀ est de 1,1 à 25 °C et de 1,3 à 10 °C (Equation 2.9). Les valeurs de P₁₀₀ sont plus faibles que celles reportées pour TmaMDH et DkuMDH en accord avec les observations faites sur la figure 6.14. Cependant, le P₁₀₀ diminue lorsque la température augmente suivant la même tendance que pour DkuMDH et TmaMDH.

Le ΔV a été obtenu pour chaque température suivant l'équation 6.1. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.17.

	ΔV entre 0,1-400 MPa
10 °C	1,3
25 °C	-0,5
80 °C	-0,4

Tableau 6.17. Valeurs de ΔV en fonction de la pression et de la température pour GkaMDH exprimées en $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les valeurs de ΔV sont en accord avec les observations faites précédemment à partir des courbes d'activité exprimées en activité relative. Le ΔV est quasiment nul sur toute la gamme de pression (0,1-400 MPa) ce qui indique que l'activité spécifique de GkaMDH est très peu sensible à la pression.

6.3.3. Analyse du comportement spécifique des malate déshydrogénases face à la pression

Le ΔV est le paramètre qui guide les effets de la pression. Les ΔV obtenus dans cette étude représentent la variation de volume de l'ensemble de la réaction spécifique. Dans l'ensemble, l'activité spécifique des MDH montre une relation bimodale vis-à-vis de la pression.

En dessous de l'optimum de pression, défini précédemment pour chaque enzyme, l'activité spécifique est souvent associée à un ΔV négatif (Tableau 6.18).

	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	GkaMDH
T_{opt} (°C)	60	60	70	70	80	60
P_{opt} (MPa)	150	150	250	250	250	ND
ΔV à 10 °C	1,9	- 5,1	- 5,9	- 4,7	- 5,0	1,3
ΔV à 25 °C	1,7	- 11,9	- 7,0	- 4,9	- 8,3	- 0,5
ΔV à T_{opt}	21,4	2,8	- 16,7	1,7	- 15,4	- 0,4

Tableau 6.18. Valeurs de ΔV correspondant aux pressions inférieures à l'optimum. La température et la pression optimales sont indiquées pour chaque enzyme. Les valeurs de ΔV sont exprimées en ml.mol^{-1} .

Dans le cas de GkaMDH, l'optimum de pression n'a pas pu être déterminé. Les valeurs de ΔV retranscrite sur le tableau 6.15 et 6.16 sont celles obtenues sur la gamme de 0,1 à 400 MPa. Cette enzyme est très peu sensible à la pression. CauMDH est la seule enzyme dont l'activité est fortement défavorisée par la pression ($\Delta V = 21,4 \text{ ml.mol}^{-1}$ à 60 °C). Les hautes températures induisent un inversement du signe du ΔV particulièrement dans le cas de PthMDH et de DkuMDH. En effet, elles sont inactivées par la pression aux températures optimales comme CauMDH, par contre leur activité est augmentée aux basses températures. L'activité de TmaMDH et de TnaMDH est associée à un ΔV négatif qui est plus élevé aux hautes températures. Les valeurs de ΔV de TmaMDH et TnaMDH sont très proches.

Au delà de l'optimum de pression, l'activité spécifique est associée à un ΔV positif (Tableau 6.19).

	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	GkaMDH
T_{opt} (°C)	60	60	70	70	80	60
P_{opt} (MPa)	150	150	250	250	250	ND
ΔV à 10 °C	3,4	18,4	1,2	10,6	13,1	1,3
ΔV à 25 °C	12,7	34,7	20,1	43,1	22,6	- 0,5
ΔV à T_{opt}	10,8	59,0	36,2	40,8	58,1	- 0,4

Tableau 6.19. Valeurs de ΔV correspondant aux pressions supérieures à l'optimum. La température et la pression optimales sont indiquées pour chaque enzyme. Les valeurs de ΔV sont exprimées en $ml.mol^{-1}$.

Dans le cas de PthMDH, TmaMDH et TnaMDH, le ΔV augmente lorsqu'augmente la température, ce qui suggère l'activité de l'enzyme est plus sensible à la pression aux hautes températures. On remarquera que les valeurs de ΔV sont similaires entre 25 °C et la température optimale pour CauMDH et DkuMDH alors qu'elles sont multipliées par 4 entre 10 et 25 °C.

Les valeurs absolues du ΔV sont représentées sur la figure 6.16 pour l'ensemble des MDH.

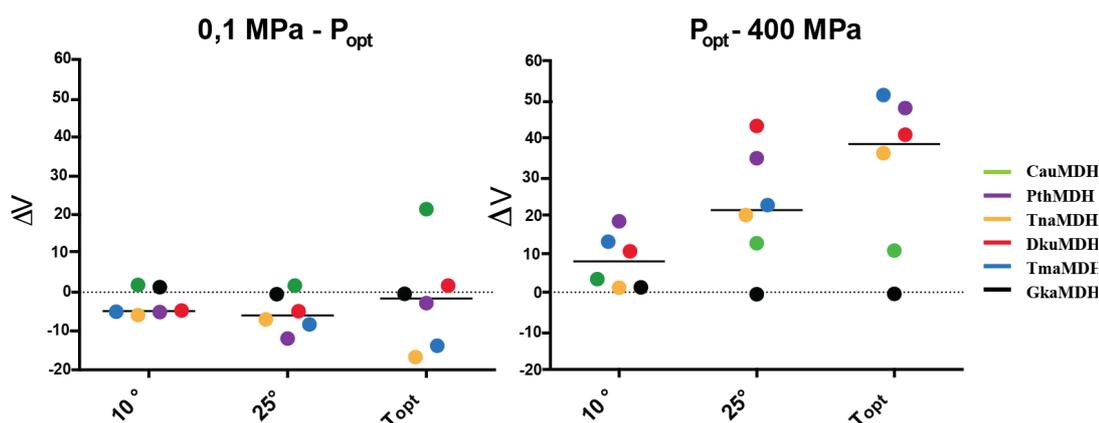


Figure 6.16. Représentation des ΔV des MDH à 10 °C, 25 °C et à température optimale. Panneau de gauche : valeurs obtenues avant l'optimum de pression ; panneau de droite : valeurs obtenues après l'optimum pression. La ligne noire représente la médiane.

La médiane des valeurs de ΔV avant l'optimum de pression est plutôt négative ou proche de zéro. Elle n'évolue pas en fonction de la température. A

l'inverse, la médiane des valeurs de ΔV après l'optimum de pression est largement positive. Cette valeur augmente avec la température. Les valeurs élevées de ΔV après l'optimum laissent supposer que les effets de la pression sont principalement dus à un effet sur la stabilité de l'édifice tétramérique. Cependant, les valeurs de ΔV lors de la dénaturation par la pression sont en général de l'ordre de la centaine de millilitre par mole (Morild, 1981). Les différences dans la valeur du ΔV et son signe suggèrent que les effets de la pression avant et après l'optimum ont des causes différentes.

Dans le cas de PthMDH, DkuMDH et TmaMDH, l'augmentation d'activité sous HPH est en lien avec l'absence d'une inhibition par le substrat (Figure 6.9, 6.12 et 6.14 respectivement). La variation d'activité spécifique en fonction de l'oxaloacétate (OAA) sous HPH est reportée sur la figure 6.17 pour PthMDH, DkuMDH et TmaMDH à pression ambiante et à 150 MPa. Pour rappel, les mesures ont été faites à 10 °C.

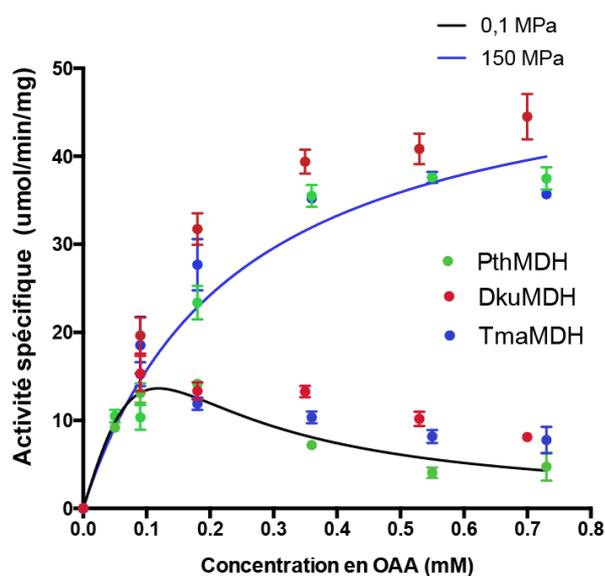


Figure 6.17. Variation de l'activité spécifique des MDH en fonction de la concentration en oxaloacétate à différentes pressions et à 10 °C. Les mesures ont été réalisées en triplicat sur une gamme de concentration en oxaloacétate (OAA) de 0,005-0,75 mM et avec 0,2 mM de NADH. L'activité spécifique a été calculée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Les mesures correspondant à PthMDH sont en vert, celles de DkuMDH en rouge et celles de TmaMDH en bleu.

Sur la figure 6.16, les valeurs d'activité spécifique sont exprimées en valeur absolue. Comme discuté précédemment, la pression induit une levée de l'inhibition par le substrat à 150 MPa et à 10 °C. De plus, l'augmentation d'activité en valeurs absolues induite par la levée de l'inhibition est similaire pour PthMDH, DkuMDH et TmaMDH. Cette observation suggère que les différences d'optimum entre enzymes

ne sont pas guidées par le mécanisme qui augmente l'activité à basse pression mais par celui qui diminue l'activité à haute pression. Autrement dit, les MDH ne se distinguent pas par leur capacité à augmenter leur activité sous pression mais par leur capacité à maintenir leur activité même à très haute pression.

La levée d'inhibition induite par la pression est intéressante d'un point de vue mécanistique car son effet sur les paramètres cinétiques est différent de ce qui a été décrit précédemment dans la littérature. En effet, chez les LDH, la levée de l'inhibition par une mutation ponctuelle près du site actif entraîne une diminution du k_{cat} et le K_M est multiplié par 600 (Eszes, Sessions, Clarke, Moreton, & Holbrook, 1996; Hewitt et al., 1999). Dans notre cas, nous pouvons déduire d'après l'allure des courbes une augmentation des valeurs de k_{cat} et le K_M bien moindre, de l'ordre de 4 fois supérieure aux valeurs obtenues à pression ambiante.

Après avoir détaillé les différents effets de la pression sur les MDH à travers la variation du ΔV et le lien avec la température, nous avons analysé les données aux températures optimales. La figure 6.18 reprend la variation d'activité spécifique sous HPH de l'ensemble des MDH mesurées à la température optimale de chaque enzyme.

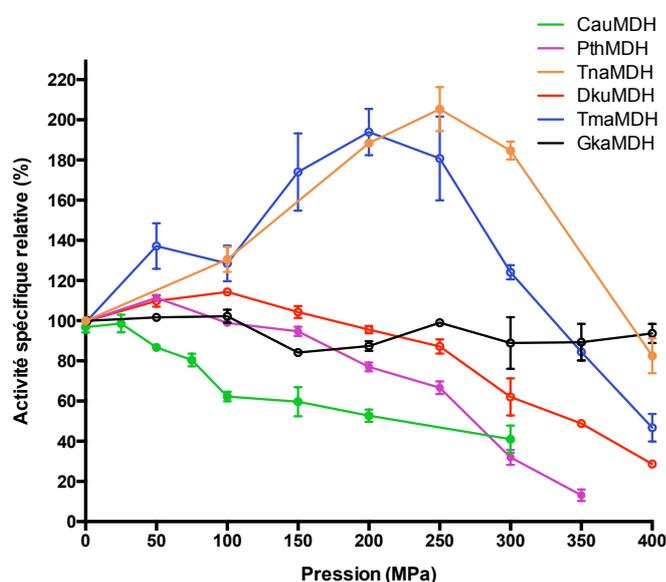


Figure 6.18. Représentation de la variation d'activité spécifique sous HPH des 6 MDH aux températures optimales. Les températures optimales sont de 60 °C pour CauMDH (vert), PthMDH (violet) et GkaMDH (noir), de 70 °C pour TnaMDH (orange) et DkuMDH (rouge) et de 80 °C pour TmaMDH (bleu).

Si l'on ne considère que CauMDH, PthMDH, DkuMDH et TmaMDH (Figure 6.17), il existe une corrélation entre l'augmentation de l'activité quand la

pression augmente et une augmentation de la profondeur où les organismes ont été isolés. Si on prend en compte une gamme de pression allant jusqu'à une valeur légèrement supérieure à la pression hydrostatique environnementale maximale (entre 0,1 et 150 MPa), l'activité de CauMDH décroît, l'activité de DkuMDH et PthMDH ne présente que peu de variation par rapport à celle mesurée à 0,1 MPa alors que l'activité de TmaMDH augmente.

Cette analyse soutient l'hypothèse d'un lien entre la profondeur à laquelle a été isolé l'organisme, son comportement sous pression et le comportement sous pression de son protéome et plus particulièrement des MDH. Nous savons que ce lien existe dans le cas de l'adaptation à température mais il n'a pas été démontré dans le cas de la pression. Par contre, l'absence de mesures de croissance sous HPH de ces organismes rend difficile une analyse fine du comportement des MDH. En effet, l'enzyme TnaMDH a un comportement similaire à celui de TmaMDH sous pression. En étudiant une seule enzyme, il est difficile de savoir si cette caractéristique est la marque du caractère piézophile de l'organisme ou si c'est une particularité de cette enzyme qui partage 98 % de similarité de séquence avec TmaMDH (13 résidus différents). Il faudrait connaître le comportement sous pression des organismes pour conclure sur le cas de TnaMDH.

TmaMDH et GkaMDH sont deux enzymes qui proviennent d'organismes isolés dans la Fosse des Mariannes à -11 000 mètres de profondeur. Cependant, leur comportement est différent. La pression agit favorablement sur TmaMDH (l'activité est augmentée par la pression) alors qu'elle n'a aucun effet dans le cas de GkaMDH. Dans les deux cas, les HPH n'ont pas d'effets défavorables sur l'activité spécifique.

Afin de mieux appréhender les phénomènes qui dictent les propriétés de ces différentes enzymes sous pression, j'ai entrepris une caractérisation structurale des ces différentes MDH aussi bien par cristallographie des rayons X conventionnelle que par cristallographie sous haute pression hydrostatique.

6.4. Détermination des structures cristallographiques des différentes malate déshydrogénases

6.4.1. Obtention des cristaux – conditions de cryo-conservation

Pour l'ensemble des protéines, les conditions de cristallisation ont été déterminées après un échantillonnage automatisé en utilisant la plateforme de criblage HTX lab de l'EMBL Grenoble. Les conditions de cristallisation les plus prometteuses ont ensuite été améliorées manuellement par optimisation des conditions de pH, de concentrations en agents précipitant et en additifs. Toutes les cristallisations ont été effectuées à 293 K par la méthode de diffusion en phase vapeur. La durée moyenne pour obtenir les cristaux est indiquée dans chacun des tableaux respectifs. Les sous paragraphes suivants présentent aussi les conditions de cryo-conservation utilisées pour permettre la congélation des cristaux à 100 K. La solution de congélation consiste en la condition de cristallisation à laquelle est ajoutée un cryoprotectant (indiqué dans les tableaux présentant les conditions optimums de cristallisation où [P] correspond à la concentration de la solution de protéine).

6.4.1.1. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Chloroflexus aurantiacus*

La condition de cristallisation utilisée est inspirée de celle décrite dans la publication de B. Dalhus (Dalhus et al., 2002). Elle a été optimisée par Romain Talon au cours de sa thèse au sein de l'équipe ELMA à l'IBS (Talon, Coquelle, Madern, & Girard, 2014) (Figure 6.19).

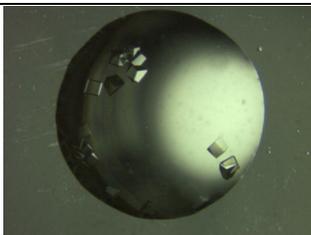
4-14 % de PEG 400	
100 mM acétate de sodium pH 4,6	
40 mM acétate de cadmium	
[P] = 20 mg.ml ⁻¹	300x300x300 μm

Figure 6.19. Conditions de cristallisation de CauMDH. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

6.4.1.2. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Pelotomaculum thermopropionicum*

Dans le cas de PthMDH, une seule condition de cristallisation a été identifiée (Figure 6.20).

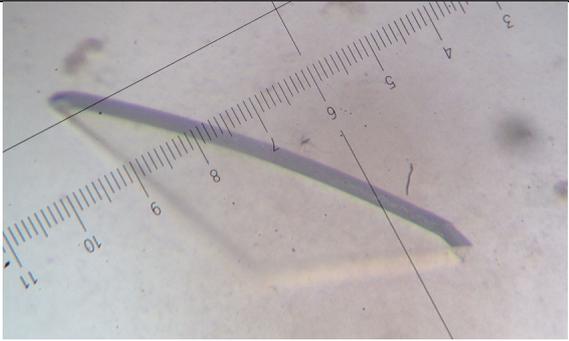
17 % PEG 3350	
100 mM MgCl ₂	
40 % dichlorométhane	
100 mM HEPES pH 7,0	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
5 - 10 jours	
Cryo-protectant : 25 % éthylèneglycol et de l'huile de paraffine	300x50x100 μm

Figure 6.20. Conditions de cristallisation de PthMDH. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

La meilleure condition de cryo-congélation consiste en un premier trempage dans une solution contenant 25 % d'éthylène glycol et en un second trempage dans de l'huile de paraffine.

6.4.1.3. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter nagasakiensis*

Trois conditions prometteuses ont été obtenues après criblage au HTXlab. J'ai donc cherché à reproduire ces conditions en faisant varier le pH et la concentration en agent précipitant :

- Condition 1 : Acétate de sodium 100 mM pH 4,5 / 5 / 5,5 / 6, PEG 6000 de 6 à 16 %.
- Condition 2 : Acétate de sodium 100 mM pH 4,5 / 5, 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD) 30 à 40 %.
- Condition 3 : HEPES 100 mM pH 7 / 7,5 / 8 / 8,5, PEG 400 2 %, sulfate d'ammonium 1,6 à 2,6 M.

La seule condition permettant d'obtenir des cristaux reproductibles est la condition 3. L'agent précipitant est le sulfate d'ammonium. Le PEG 400 favorise des cristaux plus gros, malheureusement à partir de 5-10 %, il se crée une séparation de phase avec le sulfate d'ammonium. La figure ci-dessous montre le faciès des cristaux et les conditions optimales de cristallisation.

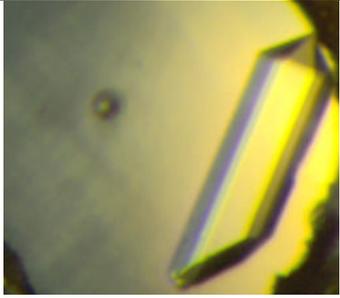
1,8 M Sulfate d'ammonium	
2 % dichlorométhane	
100 mM HEPES pH 8,0	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
3 - 5 jours	
Cryo-protectant : 25 % PEG 400	
	400x100x100 µm

Figure 6.21. Conditions de cristallisation de TnaMDH. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

6.4.1.4. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Desulfotomaculum kuznetsovii*

Dans le cas de DkuMDH, plusieurs conditions de cristallisation ont été obtenues après criblage au HTXlab mais une seule condition a permis d'obtenir des cristaux reproductibles (Figure 6.22).

18 % PEG 3350	
100 mM LiSO ₄	
100 mM Bis Tris pH 7,0	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
10 jours	
Cryo-protectant : 25 % PEG 400	

Figure 6.22. Conditions de cristallisation de DkuMDH. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

6.4.1.5. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter marianensis*

L'optimisation des conditions obtenues avec HTXlab a permis d'obtenir des cristaux avec du PEG 20K et du malonate.

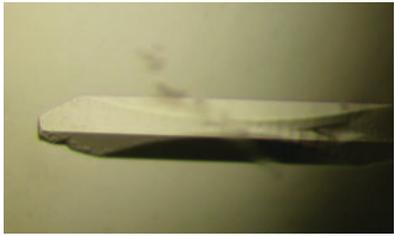
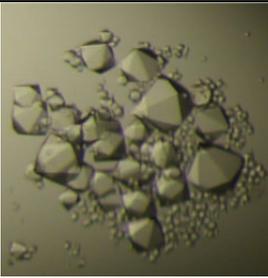
20 % PEG 20K	
100 mM HEPES pH 7,0	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
2 à 4 jours	
Cryo-protectant : 10 % de PEG 400 + 30 % de PEG 20K	800x150x150 µm
0,8 M Malonate pH 7,5	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
2 à 4 jours	
Cryo-protectant : 10 % de PEG 400 + 2 M Malonate	200x150x200 µm

Figure 6.23. Conditions de cristallisation des cristaux de TmaMDH. Les photos montrent la morphologie des cristaux obtenus.

Les cristaux obtenus en présence de malonate ont une morphologie plus favorable, notamment en vue d'expérience de cristallographie sous haute pression. Malheureusement, ils ne diffractent pas à haute résolution (diffraction observée à 4 Å de résolution). En revanche les cristaux obtenus en présence de PEG 20K nous ont permis de déterminer la structure de TmaMDH (Paragraphe 6.4.2.2.4).

6.4.1.6. Cristallisation de la malate déshydrogénase de *Geobacillus kaustophilus*

Dans le cas de GkaMDH, plusieurs conditions de cristallisation ont été obtenues après criblage au HTXlab mais une seule condition a permis d'obtenir des cristaux reproductibles (Figure 6.24).

16 % PEG 3350	
100 mM Acide succinique pH 7,0	
[P] = 10 mg.ml ⁻¹	
8 jours	
Cryo-protectant : 25 % PEG 400	100x70x50 μm

Figure 6.24. Conditions de cristallisation des cristaux de GkaMDH. La photo montre la morphologie des cristaux obtenus.

6.4.2. Détermination des structures par cristallographie conventionnelle à 100 K

6.4.2.1. Structure de la malate déshydrogénase de *Chloroflexus aurantiacus*

La structure à 100 K a été précédemment déterminée par Romain Talon dans l'équipe ELMA à l'IBS. Les statistiques d'intégration et d'affinement sont décrites dans la publication Talon *et al.* de 2014 (Talon et al., 2014). La structure a été déterminée à 1,70 Å de résolution dans le groupe d'espace P 3₁21 avec un dimère dans l'unité asymétrique.

6.4.2.2. Acquisition et traitement des données de diffraction

6.4.2.2.1. Intégration des données de la malate déshydrogénase de *Pelotomaculum thermopropionicum*

Les cristaux obtenus pour PthMDH ont permis d'enregistrer, sur la ligne de lumière BM30A à l'ESRF, un jeu de données à 2,3 Å de résolution. Après intégration et mise à l'échelle, nous avons obtenu les statistiques indiquées dans le tableau 6.20.

	PthMDH, 100K
Longueur d'onde (Å)	0,9783
a,b,c (Å)	88,5– 123,9 – 135,8
α,β,γ (°)	95,7 – 103,0 – 108,6
Groupe d'espace	P 1
Résolution (Å)	57,78 - 2,31 (2,41 – 2,31)
Réflexions uniques	213 274 (30 374)
R _{sym} (%)	13,6 (216,0)
R _{pim} (%)	4,1 (66,0)
CC _{1/2} (%)	100,0 (71,9)
I/ σ (I)	15,2 (1,4)
Multiplicité	11,0 (10,2)
Complétude (%)	99,8 (98,8)

Tableau 6.20. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de PthMDH.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de quatre tétramères dans l'unité asymétrique avec 51 % de solvant.

6.4.2.2.2. Intégration des données de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter nagasakiensis*

Pour TnaMDH, nous avons pu enregistrer des données à 2,01 Å de résolution sur la ligne BM30A à l'ESRF. Après intégration et mise à l'échelle, nous avons obtenu les statistiques indiquées dans le tableau 6.21.

	TnaMDH, 100K
Longueur d'ondes (Å)	0,9796
a,b,c (Å)	179,2 – 179,2 – 180,6
Groupe d'espace	P 6 ₃ 22
Résolution (Å)	47,67 - 2,01 (2,11 – 2,01)
Réflexions uniques	112 474 (15 529)
R _{sym} (%)	13,4 (207,7)
R _{pim} (%)	3,6 (56,3)
CC _{1/2} (%)	100 (84,9)
I/σ(I)	11,9 (1,4)
Multiplicité	14,1 (12,7)
Complétude (%)	99,2 (95,2)

Tableau 6.21. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de TnaMDH.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de un tétramère dans l'unité asymétrique avec 62 % de solvant.

6.4.2.2.3. Intégration des données de la malate déshydrogénase de *Desulfotomaculum kuznetsovii*

En ce qui concerne les cristaux de DkuMDH, ils nous ont permis d'enregistrer un jeu de données à 1,8 Å de résolution. A nouveau, les données ont été obtenues sur la ligne de lumière BM30A à l'ESRF. Après intégration et mise à l'échelle, nous avons obtenu les statistiques indiquées dans le tableau 6.22.

	DkuMDH, 100K
Longueur d'ondes (Å)	0,9796
a,b,c (Å)	142,04– 142,04 – 191,02
Groupe d'espace	P 3 ₁ 2 1
Résolution (Å)	56,99- 1,80 (1,90 – 1,80)
Réflexions uniques	203 548 (29 163)
R _{sym} (%)	13,6 (216,0)
R _{pim} (%)	4,1 (66,0)
CC _{1/2} (%)	100 (84,9)
I/σ(I)	15,2 (1,4)
Multiplicité	11 (10,2)
Complétude (%)	99,8 (98,8)

Tableau 6.22. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de DkuMDH.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de 6 monomères dans l'unité asymétrique avec 56 % de solvant.

6.4.2.2.4. Intégration des données de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter marianensis*

L'enregistrement d'un jeu de données sur les cristaux de TmaMDH a été effectué sur la ligne de lumière BM30A (FIP) à l'ESRF et a permis d'obtenir un jeu de données à 1,94 Å de résolution. Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont données dans le tableau 6.23.

	TmaMDH, 100K
Longueur d'ondes (Å)	0,9768
a,b,c (Å)	69,45 – 126,92 – 158,95
Groupe d'espace	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Résolution (Å)	48,41 – 1,94 (2,04 – 1,94)
Réflexions uniques	103 195 (13 445)
R _{sym} (%)	8,8 (35,8)
R _{pim} (%)	2,8 (13,3)
CC _{1/2} (%)	100 (95,4)
I/σ(I)	21,3 (5,4)
Multiplicité	9,6 (6,4)
Complétude (%)	98,2 (88,8)

Tableau 6.23. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de TmaMDH.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de 4 monomères dans l'unité asymétrique avec 62 % de solvant.

6.4.2.2.5. Intégration des données de la malate déshydrogénase de *Geobacillus kaustophilus*

L'enregistrement d'un jeu de données sur les cristaux de GkaMDH a été effectué sur la ligne de lumière BM30A (FIP) à l'ESRF et a permis d'obtenir un jeu de données à 2,6 Å de résolution. Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont données dans le tableau 6.24.

	GkaMDH, 100K
Longueur d'ondes (Å)	0,9768
a,b,c (Å)	78,69 – 127,59 – 129,41
Groupe d'espace	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ou P 121
Résolution (Å)	57,78- 2,61 (2,71 – 2,61)
Réflexions uniques	40 683 (5 765)
R _{sym} (%)	17,2 (167,1)
R _{pim} (%)	6,0 (59,1)
CC _{1/2} (%)	100,0 (41,9)
I/σ(I)	13,5 (1,4)
Multiplicité	8,0 (7,7)
Complétude (%)	99,8 (98,8)

Tableau 6.24. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à 100 K de GkaMDH.

Le coefficient de Matthews prédit la présence de 4 monomères dans l'unité asymétrique avec 49 % de solvant. Le groupe d'espace a été difficile à identifier. L'analyse des données avec le programme XTRIAGE de la suite PHENIX a indiqué la présence de macles *pseudo*-mériédrique. La présence de mâcles ne nous a pas permis de résoudre le problème de phase. Les cristaux de GkaMDH étant en forme d'aiguilles, il est possible que les données proviennent de deux cristaux différents.

6.4.2.3. Détermination des structures et affinement des modèles obtenus

Pour la détermination de phase et l'affinement du modèle, j'ai suivi le protocole explicité dans le matériel et méthode (paragraphe 2.3.3) pour l'ensemble des structures résolues durant ma thèse. Je présenterai donc essentiellement dans cette partie les statistiques relatives aux résultats des différents programmes utilisés. Dans le cas où la détermination de structure a été plus complexe (TnaMDH et DkuMDH), la démarche utilisée pour résoudre les différents problèmes a été explicitée.

La présentation ci-après respecte celle utilisée pour les résultats des mesures d'activité. Toutefois, historiquement, la structure de TnaMDH a été déterminée en premier. Elle a donc été utilisée comme modèle pour les remplacements moléculaires.

6.4.2.3.1. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de *Pelotomaculum thermopropionicum*

La structure de PthMDH a été déterminée par la méthode du remplacement moléculaire avec le logiciel PHASER (McCoy et al., 2007). Le modèle de départ est le tétramère sous forme de polyALA de TnaMDH. Comme indiqué précédemment, l'analyse du coefficient de Matthews prédit la présence de 4 tétramères dans l'unité asymétrique (Kantardjieff & Rupp, 2003). Une solution contenant les 4 tétramères dans l'unité asymétrique est obtenue conduisant aux statistiques suivantes : LLG : 5269 et TFZ : 20,2. Après amélioration des phases avec le programme DM (Levin et al., 2007), le logiciel BUCCANEER a reconstruit 4223 résidus sur 5324 soit 80 % des résidus attendus sur 16 chaînes (Cowtan, 2006). Les tétramères ont été reconstruits manuellement dans COOT (Emsley et al., 2010) sur la base du modèle proposé par BUCCANEER.

Le nombre de réflexions uniques (212 999) ne permettant pas d'affiner les quatre tétramères, nous avons choisi d'utiliser la symétrie non-cristallographique (NCS) pour l'affinement. Nous avons décidé de travailler sur un tétramère, les trois autres étant obtenus par application de la NCS. En fin d'affinement, nous avons obtenu un R_{factor} de 21,35 % et un R_{free} de 27,77 %. Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

PthMDH, 100 K	
Résolution (Å)	57,71 – 2,35
R _{factor} (%)	21,35
R _{free} (%)	27,17
Nombres de réflexions utilisées	212999
Composition (nbre d'atomes)	
Protéine	37371
H ₂ O	1455
Ligands	0
Res. hors Ramachandran (%)	2,44
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,012
Liaisons angles (°)	1,246
B _{moyen} protéine (Å ²)	40,60
B _{moyen} eau (Å ²)	37,26
B _{moyen} ligands (Å ²)	ND

Tableau 6.25. Statistiques d'affinement pour la structure de PthMDH à 100 K.

Aucune densité électronique résiduelle correspondant aux substrats potentiels n'a été observée au niveau du site catalytique. J'ai pu modéliser 1455 molécules d'eau soit une moyenne de 90 molécules d'eau par monomère.

6.4.2.3.2. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter nagasakiensis*

Comme dans le cas de PthMDH, la structure de TnaMDH a été déterminée par la méthode du remplacement moléculaire. Toutefois, j'ai fait face à quelques difficultés. Selon le programme MATTHEWS, le nombre de monomères le plus probable dans l'unité asymétrique était de 5. Toutefois un tel nombre ne correspondait pas à l'unité biologique attendue (tétramère). Je me suis aussi basée sur l'estimation de la proportion de solvant dans l'unité asymétrique fournie par le

programme TRUNCATE (Suite CCP4), utilisé lors du traitement des données. En considérant la présence d'un tétramère dans l'unité asymétrique, ce logiciel estimait la quantité de solvant à 53 %. Le pourcentage de solvant étant proche de la proportion moyenne retrouvée dans les cristaux de protéines, j'ai supposé que l'unité asymétrique contenait un tétramère.

J'ai tout d'abord tenté de déterminer une solution par remplacement moléculaire à l'aide du programme PHASER. Mais quel que soit le modèle de départ choisi ou le nombre de molécules prédit dans l'unité asymétrique, le programme se mettait en erreur lors de la recherche d'une fonction de translation. J'ai ensuite essayé de résoudre le problème de phase avec le logiciel BALBES (Long et al., 2008). Ce logiciel est un programme de remplacement moléculaire automatique qui prend en charge la recherche de modèle dans la pdb à partir d'une séquence, la construction du modèle, le phasage avec MOLREP, l'amélioration des phases et l'affinement avec REFMAC. Ce programme a fourni une solution avec un $R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ final de 36/38 % correspondant à des valeurs usuelles après un premier tour d'affinement.

La solution proposée par BALBES contenait un trimère dans l'unité asymétrique. En comparant avec le tétramère de TmaMDH, je me suis aperçu que le dimère permettait de reconstruire le tétramère entier par les éléments de symétrie du cristal, le monomère restant faisant partie d'un autre dimère.

Toutefois, après un premier cycle d'affinement, les facteurs d'accord restaient relativement haut ($R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ de l'ordre de 30%). Cela indiquait que le modèle construit ne correspondait pas complètement à la densité électronique. Par conséquent, je me suis à nouveau intéressée au monomère unique. L'état oligomérique de la protéine en solution étant en principe tétramérique, la présence d'un dimère isolé dans la structure m'a surpris. En superposant le monomère isolé avec le tétramère de TmaMDH, j'ai identifié de la densité électronique résiduelle proche de ce monomère. Au final, l'unité asymétrique contenait deux dimères, la symétrie du cristal permettant alors de reconstruire deux tétramères (Figure 6.25).

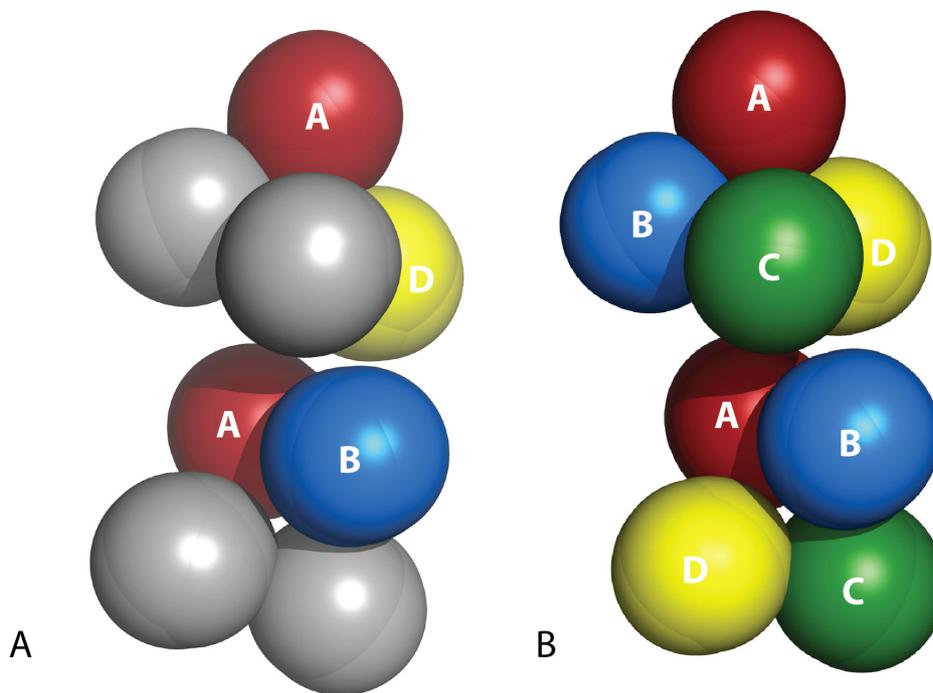


Figure 6.25. Représentation de l'unité asymétrique de la structure de TnaMDH. (A) L'unité asymétrique contient 4 monomères dont le dimère AB (rouge et bleu) et le dimère AD (rouge et jaune) appartenant au tétramère adjacent. (B) Deux tétramères peuvent être reconstitués à partir de des monomères contenus dans l'unité asymétrique du cristal de TnaMDH.

Chaque couleur représente la position du monomère dans le tétramère. L'unité asymétrique de TnaMDH contient donc deux dimères différents : le bleu-rouge selon l'axe horizontale et le rouge-jaune selon l'axe verticale. La densité électronique correspondant au dernier monomère modélisé (jaune) est de plus mauvaise qualité que celle correspondant au trois autres monomères. Ce monomère est effectivement très exposé au solvant et présente peu de contacts cristallins, or, ces derniers permettent en général de stabiliser la structure quaternaire.

Lors des cycles d'affinement, l'utilisation de groupe TLS a fortement amélioré les statistiques. Nous avons défini chaque monomère comme étant un groupe TLS. Le R_{factor} et le R_{free} ont alors diminué de 4 %.

Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

TnaMDH, 100 K	
Résolution (Å)	47.57 - 2.01
R _{factor} (%)	19,86
R _{free} (%)	24,22
Nombres de réflexions utilisées	1 536 316
Composition (nbre d'atomes)	
Protéine	8969
H ₂ O	469
Ligands	169
Res. hors Ramachandran (%)	1,08
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,015
Liaisons angles (°)	1,50
B _{moyen} protéine (Å ²)	69,76
B _{moyen} eau (Å ²)	64,16
B _{moyen} ligands (Å ²)	142,70

Tableau 6.26. Statistiques d'affinement pour la structure de TnaMDH à 100 K.

La structure est sous forme apo, comme pour les autres MDH. La protéine a été cristallisée en présence d'une concentration importante de sulfate d'ammonium. J'ai ainsi modélisé 14 ions SO_4^{2-} dans la structure dont un dans chacun des sites actifs. Les ions sulfate ont déjà été décrits comme mimant la place du substrat dans le site actif des MDH et sont stabilisés par l'arginine catalytique (Bell et al., 2001; Irimia et al., 2004). Comme pour le site actif, les ions SO_4^{2-} sont souvent stabilisés par une arginine. Les sites de fixation des ions sulfates sont communs à tous les monomères.

6.4.2.3.3. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de *Desulfotomaculum kuznetsovii*

La structure de DkuMDH a été déterminée par la méthode du remplacement moléculaire avec le logiciel *PHASER* à partir d'un jeu de données à 2,5 Å. Le coefficient de Matthews indiquait sept monomères pour 50 % de solvant. Nous avons recherché un tétramère ou un octamère dans l'unité asymétrique avec comme modèle de départ le tétramère de TmaMDH sous forme de polyALA. Le phasage n'ayant pas fonctionné, nous avons essayé un second modèle qui consistait en un monomère de CauMDH et en recherchant quatre monomères. Nous avons ainsi obtenu une solution avec les statistiques suivantes : LLG de 2058 et TFZ de 17,3. Après amélioration des phases avec le programme DM avec 70 % de solvant, nous avons lancé la reconstruction avec BUCCANEER (Cowtan, 2006). Le programme a reconstruit très peu de résidus. Nous avons donc choisi de partir du modèle de PHASER et nous avons ajouté les chaînes latérales à chacun des résidus.

Après un premier tour d'affinement, les R_{factor} et R_{free} restaient relativement hauts, supérieurs à 40 %. Après notre expérience avec la détermination de la structure de TnaMDH, nous avons recherché d'autres monomères dans l'unité asymétrique. Nous avons pu modéliser un dimère en plus du tétramère. Ce dimère permet de reconstituer un tétramère grâce à la symétrie du cristal. Nous avons ainsi six monomères dans l'unité asymétrique ce qui correspond à un pourcentage de solvant de 55 %.

Après une optimisation des cristaux, nous avons obtenu un jeu de données à 1,8 Å de résolution. Nous avons réalisé un phasage avec comme modèle de départ la structure à 2,5 Å. Nous avons ensuite procédé à l'affinement. Les statistiques d'affinement indiquées ci-dessous correspondent au jeu de données à 1,8 Å de résolution.

	DkuMDH, 100 K
Résolution (Å)	51,51 – 1,80
R _{factor} (%)	18,32
R _{free} (%)	22,02
Nombres de réflexions utilisées	203 415
Composition (nbre d'atomes)	
Protéine	13 781
H ₂ O	1333
Ligands	35
Res. hors Ramachandran (%)	1,2
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,012
Liaisons angles (°)	1,20
B _{moyen} protéine (Å ²)	47,60
B _{moyen} eau (Å ²)	42,50
B _{moyen} ligands (Å ²)	100,80

Tableau 6.27. Statistiques d'affinement pour la structure de DkuMDH à 100 K.

Aucune densité électronique résiduelle correspondant aux substrats potentiels n'a été observée au niveau du site catalytique. J'ai pu modéliser 1333 molécules d'eau et 7 ions sulfates.

6.4.2.3.4. Affinement de la structure de la malate déshydrogénase de *Thermaerobacter marianensis*

Dans le cadre de ma thèse, la structure de TmaMDH a été chronologiquement déterminée en premier, et ce par la méthode du remplacement moléculaire avec le logiciel PHASER (McCoy et al., 2007). Le modèle de départ est le monomère sous forme de polyALA de la MDH de *Salinibacter ruber* (PDB ID 3NEP) qui présente une identité de séquence avec TmaMDH de 56 %. L'analyse du coefficient de Matthews indiquait la présence d'un tétramère dans l'unité asymétrique. Une solution contenant le tétramère dans l'unité asymétrique est obtenue conduisant aux statistiques suivantes : LLG : 2611 et TFZ : 46,4. Après optimisation des phases avec DM, le logiciel BUCCANEER (Cowtan, 2006) a reconstruit 1020 résidus sur les 1240 attendus soit 90 % des résidus sur 22 chaînes. Le tétramère complet a été reconstruit manuellement dans COOT (Emsley et al., 2010) sur la base du modèle proposé par BUCCANEER. En fin d'affinement, nous avons obtenu un Rfactor de 19,30 % et un Rfree de 24,88 %. Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

	TmaMDH
Résolution (Å)	46,84 – 1,94
R _{factor} (%)	19,30
R _{free} (%)	24,88
Nombres de réflexions utilisées	103 082
Composition (nbre d'atomes)	
Protéine	9294
H ₂ O	1188
Ligands	1380
Res. hors Ramachandran (%)	1,46
Ecart types (globaux)	
Liaisons longueurs (Å)	0,013
Liaisons angles (°)	1,49
B _{moyen} protéine (Å ²)	20,17
B _{moyen} eau (Å ²)	29,60
B _{moyen} ligands (Å ²)	30,3

Tableau 6.28. Statistiques d'affinement pour la structure de TmaMDH à 100 K.

Aucune densité électronique résiduelle correspondant aux substrats potentiels n'a été observée au niveau du site catalytique. J'ai pu modéliser en moyenne 400 molécules d'eau par monomère ainsi que des molécules de PEG, de glycérol et d'HEPES.

6.4.3. Détermination des structures par cristallographie sous hautes pressions hydrostatique

6.4.3.1. Acquisition et traitement des données de diffraction de la malate

déshydrogénase de *Chloroflexus aurantiacus*

Pour CauMDH nous avons enregistré deux jeux de données sur la ligne de lumière ID27 de l'ESRF : un jeu de référence à pression ambiante et un jeu à 280 MPa.

Comme indiqué dans le chapitre 2 (paragraphe 2.3.3), nous utilisons le même protocole tout au long du traitement des données et de l'affinement de la structure afin d'être sûr que les différences décrites seront dues à l'effet de la pression et non à des biais liés aux conditions expérimentales. Les statistiques après intégration et mise à l'échelle sont indiquées dans le tableau 6.29.

	0,1 MPa	280 MPa
Longueur d'onde (Å)	0,6199	0,6199
a,b,c (Å)	107,2 - 107,2 – 103,8	105,9 – 105,9 – 103,1
Groupe d'espace	P 3 ₁ 2 1	P 3 ₁ 2 1
Volume de la maille (%)	100	96,9
Résolution (Å)	47,12- 2,00 (2,11-2,00)	47,12 - 2,00 (2,11-2,00)
Réflexions uniques	46 216 (6 573)	44 960 (6 505)
R _{sym} (%)	39,0 (273,0)	39,0 (229,0)
R _{pim} (%)	3,9 (27,3)	3,9 (22,3)
CC _{1/2} (%)	100,0 (69,9)	100,0 (73,1)
I/σ(I)	14,0 (4,9)	13,3 (4,3)
Complétude (%)	99,7 (98,3)	100,0 (99,9)
Multiplicité	8,0 (4,9)	8,0 (7,7)

Tableau 6.29. Statistiques d'intégration des données de diffraction mesurées à température ambiante de CauMDH à pression ambiante et à 280 MPa.

Malgré les contraintes liées à un enregistrement en CED, les données obtenues sont à une résolution de 2,1 Å. Dans le cas de la structure à 280 MPa, deux jeux de données obtenues à partir de deux cristaux différents ont été mélangés au moment de la mise à l'échelle. Compte tenu de la haute multiplicité, les statistiques

sont de bonne qualité (R_{pim} de 27 et 22% et CC(1/2) de 70 et 73 % pour le jeu de données à pression ambiante et à haute pression respectivement). On peut d'ores et déjà constater que la maille des cristaux à 280 MPa est réduite de 3,1 % ce qui est en accord avec la variation de 1 % par 100 MPa généralement observé (Colloc'h et al., 2006).

6.4.3.2. Affinement de la structure de CauMDH

Les structures de CauMDH ont été déterminées par remplacement moléculaire avec le programme PHASER (McCoy et al., 2007). Le modèle choisi est le monomère polyALA de la structure de CauMDH à 100 K précédemment déterminée dans l'équipe ELMA à l'IBS par Romain Talon (Talon et al., 2014). Les statistiques fournies par PHASER après le remplacement moléculaire sont indiquées dans le tableau 6.30. Le nombre de résidus reconstruits avec le logiciel BUCCANEER (Cowtan, 2006), après amélioration des phases avec le programme DM avec 44 % de solvant, est aussi indiqué (Cowtan & Zhang, 1999) (618 résidus dans l'unité asymétrique).

	0,1 MPa	280 MPa
LLG	1007	962
TZF	47,9	47,3
Résidus reconstruits avec BUCANEER	610 sur 12 chaînes	605 sur 10 chaînes

Tableau 6.30. Résultat du remplacement moléculaire avec PHASER des jeux de données à pression ambiantes et à haute pression de CauMDH.

Les statistiques d'affinement sont décrites ci-dessous.

	0,1 MPa	280 MPa
Résolution (Å)	37,30- 2,01	41,92- 2,01
R _{factor} (%)	12,44	12,54
R _{free} (%)	17,22	16,94
Nombres de réflexions utilisées	44 920	43 810
Composition (nbre d'atomes)		
Protéine	4581	4900
H ₂ O	293	331
Ligands	8	6
Res. hors Ramachandran (%)	0,65	0,49
Ecart types (globaux)		
Liaisons longueurs (Å)	0,012	0,012
Liaisons angles (°)	1,31	1,28
B _{moyen} protéine (Å ²)	30,2	30,9
B _{moyen} eau (Å ²)	36,7	34,1
B _{moyen} ligands (Å ²)	85,90	60,4

Tableau 6.32. Statistiques d'affinement pour la structure de CauMDH à pression ambiante et à 280 MPa.

Aucune densité électronique résiduelle correspondant aux substrats potentiels n'a été observée au niveau du site catalytique. Les deux structures ont des résolutions identiques. J'ai modélisé 293 et 331 molécules d'eau dans la structure à pression ambiante et à haute pression respectivement.

6.5. Une approche moléculaire des effets de la pression

6.5.1. Description du repliement des malate déshydrogénases

Les MDH considérées dans cette étude sont des homotétramères. Le dimère A et B (ou C et D) correspond au dimère des MDH dimériques (Figure 6.26) et constitue l'état d'association minimale qui autorise la catalyse (Madern et al., 2000). De ce fait, les MDH tétramériques sont souvent décrites comme des dimères de dimères.

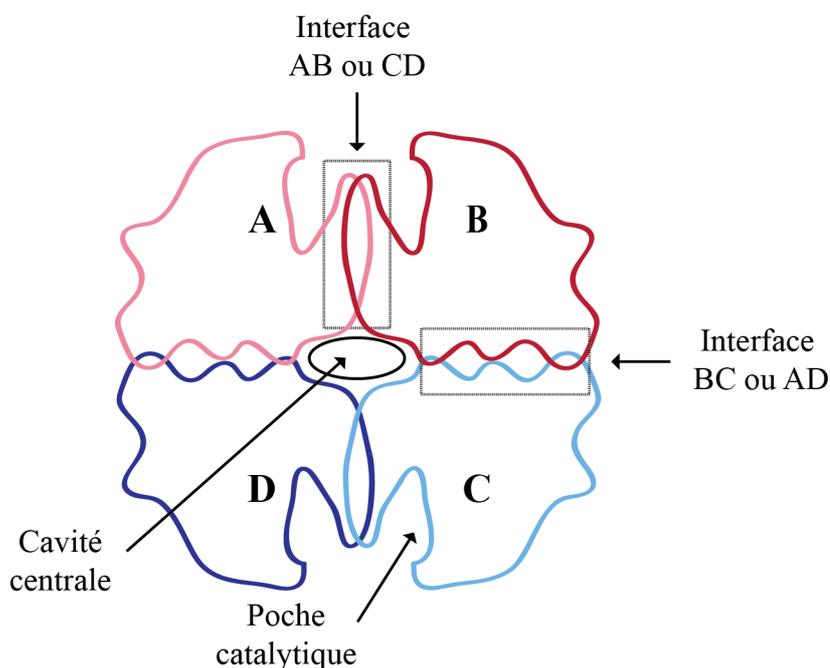


Figure 6.26. Représentation schématique de la structure quaternaire des MDH. D'après (Coquelle et al., 2010).

L'interface AB (ou CD) est l'interface la plus importante composée à 75 % d'interactions hydrophobes. Elle est située proche du site actif. L'interface BC ou

AD a été décrite comme étant impliquée dans la thermostabilité des MDH tétramériques (Coquelle et al., 2007).

Le monomère des MDH comprend deux domaines : le domaine catalytique et le domaine de liaison de cofacteur correspondant au repliement classique de Rossman (« Rossman fold ») (Figure 6.27).

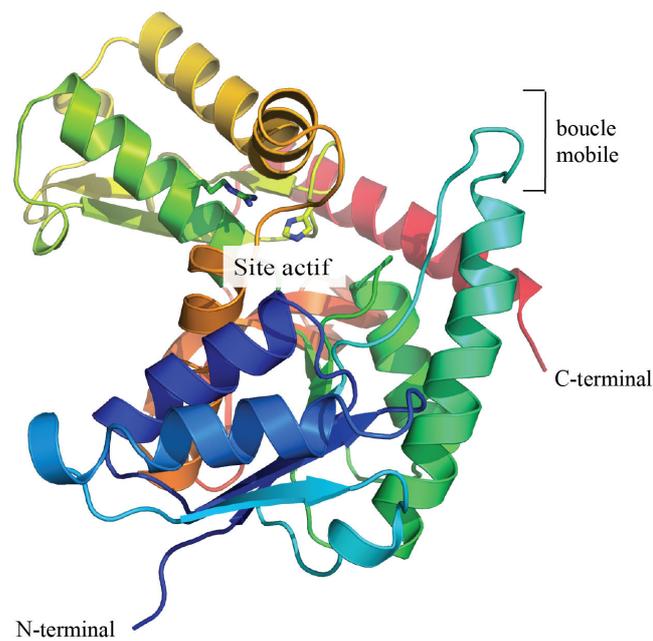


Figure 6.27. Représentation en cartoon du monomère des MDH. La boucle mobile se rapproche du site actif lors de la catalyse. Le code couleur représente la séquence du N-terminal au C-terminal bleu-vert-jaune-orange-rouge.

L'architecture du site actif est similaire à celui décrit pour les MDH dimériques ou pour les LDH (Chapman, Cortés, Dafforn, Clarke, & Brady, 1999; Clarke et al., 1989). L'histidine catalytique contribue à la réduction de l'oxaloacétate en malate. L'état de protonation de l'histidine est induit par l'Asp148 adjacent. L'Arg151, conservée chez les MDH et LDH, oriente et fixe le substrat (Figure 6.28).

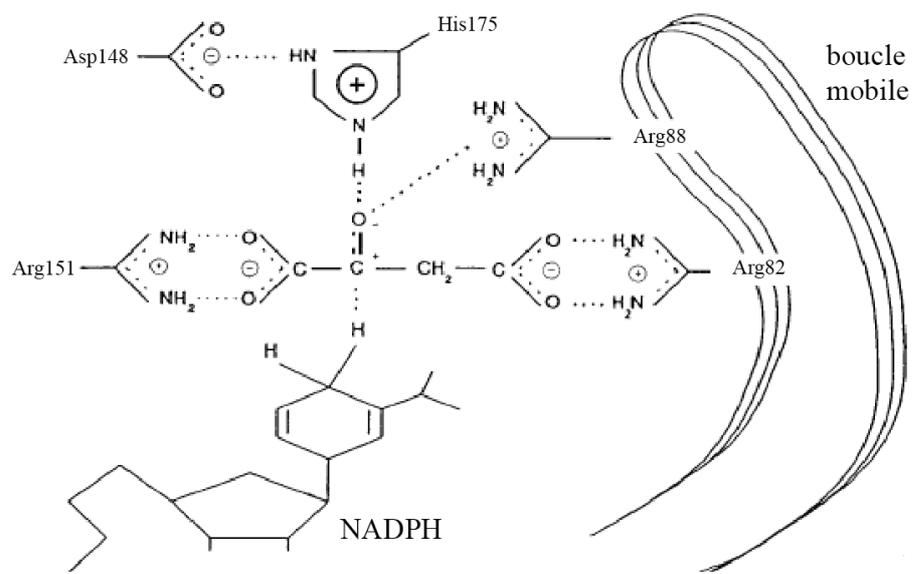


Figure 6.28. Représentation schématique du site actif des MDH. D'après (Goward & Nicholls, 1994)

6.5.2.

6.5.3. Analyse des effets moléculaires de la pression

Dans le but de comprendre les potentiels effets de la pression, l'analyse structurale des MDH s'appuie d'une part, sur la comparaison de 5 structures cristallographiques obtenues à 100 K qui permet d'étudier l'influence des mutations sur les différentes interactions et d'autre part, sur la comparaison des structures cristallographiques de CauMDH obtenues à pression ambiante et 280 MPa pour appréhender les effets induits par la pression et éventuellement les transposer aux autres structures de MDH. Les caractéristiques des jeux de données utilisés sont reprises sommairement dans le tableau 6.33.

	0,1 MPa					280 MPa	
	100 K					Température ambiante	
	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	CauMDH	CauMDH
Résolution (Å)	1,70	2,35	2,01	1,80	1,94	2,01	2,01
Unité asymétrique	1 dimère	4 tétramères	2 dimères	1 tétramère et 1 dimère	1 tétramère	1 dimère	1 dimère
R _{factor} (%)	17,02	21,35	19,86	18,32	19,30	12,44	12,44
R _{free} (%)	21,02	27,17	24,22	22,02	24,88	17,22	16,94

Tableau 6.33. Résumé des statistiques des jeux de données des MDH.

L'analyse structurale de l'effet des mutations sur le comportement spécifique des MDH sous pression est basée sur notre connaissance de la dynamique des MDH. Par conséquent, nous avons axé notre analyse sur des zones clés impliquées dans la stabilité et l'activité des MDH : les zones d'interfaces (Colletier et al., 2012; Coquelle et al., 2007), la cavité centrale, ainsi que les zones équivalentes impliquées dans l'allostérie chez les LDH (Arai et al., 2011) ou celles qui concernent l'inhibition par le substrat chez les LDH (Eszes et al., 1996). Ces observations ont été combinées aux effets observés provenant de la comparaison structurale de CauMDH à différentes pressions.

Les programmes utilisés pour analyser les structures cristallographiques sont décrits dans le chapitre 2.

J'ai commencé par comparer les structures à différentes pressions de CauMDH. La superposition des structures à pression ambiante et à haute pression de CauMDH a été effectuée avec le programme THESEUS sur l'ensemble du tétramère (Theobald & Steindel, 2012). THESEUS est un programme de superposition de structure dont le fonctionnement est décrit dans le chapitre 3, paragraphe 3.1.4. Pour rendre compte de la qualité de la superposition, le programme fournit des valeurs normalisées des résiduelles qui peuvent être vues comme représentant l'écart à la meilleure superposition. Le logiciel fournit un fichier pdb dans lequel les valeurs de la colonne correspondant aux facteurs d'agitation thermique sont remplacées par les valeurs normalisées des résiduelles, ce qui permet une visualisation directe de ces valeurs au niveau de la structure.

Le résultat de cette superposition est présenté sur la figure 6.29.

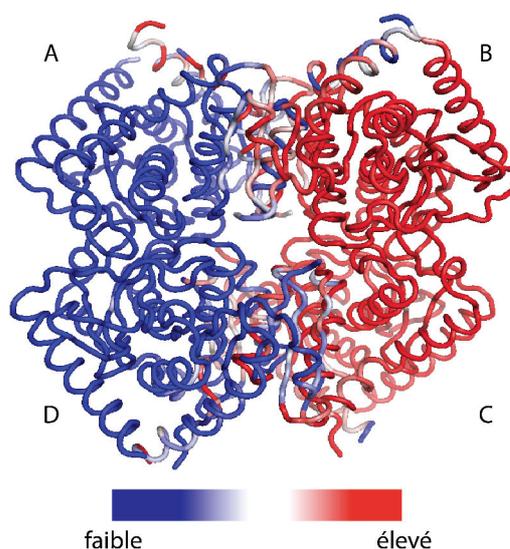


Figure 6.29. Représentation du résultat de superposition des structures à pression ambiante et à haute pression de CauMDH obtenu avec le programme THESEUS. Les résidus colorés en bleu ont des valeurs normalisées des résiduelles faibles et les résidus colorés en rouge ont des valeurs normalisées des résiduelles fortes.

Les monomères A et D sont colorés en bleu ce qui indique que l'écart avec la meilleure superposition est faible. La position des monomères A et D est similaire à pression ambiante et à haute pression. A l'inverse, les monomères B et C sont colorés en rouge ce qui indique que l'écart avec la meilleure superposition est fort. Les monomères B et C ont des positions différentes à pression ambiante et à haute pression. Ceci se traduit par un mouvement du dimère BC vers l'extérieur. Le dimère BC s'éloigne du dimère AD. Ce mouvement est léger, de l'ordre de l'angström. Cependant, ce mouvement est suffisant pour interrompre la majorité des

interactions à l'interface. La distance moyenne des interactions à l'interface AB (ou CD) est augmentée de 1 Å à 300 MPa.

En outre, le réseau hydrophobe qui constitue 75 % des interactions à l'interface AB est lui aussi perturbé (Figure 6.30). La numérotation donnée est celle de CauMDH.

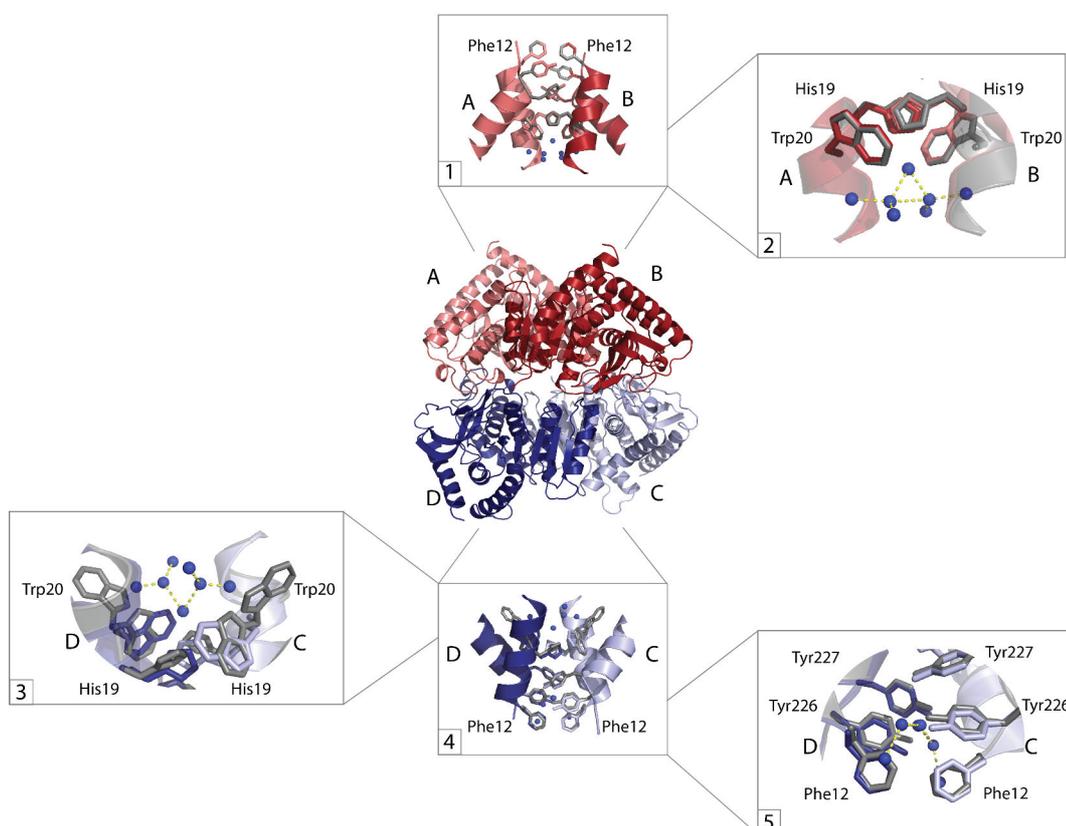


Figure 6.30. Représentation des changements dus à la pression à l'interface AB et CD de la structure de CauMDH. La structure de CauMDH à pression ambiante est représentée en gris. La structure de CauMDH à haute pression est en couleur. Les molécules d'eau qui apparaissent à haute pression sont indiquées par des boules bleues. La numérotation des acides aminés correspond à celle de CauMDH.

A l'interface AB, les résidus Phe12, Trp20, Tyr226 et Tyr227 forment un réseau d'empilement hydrophobe (Figure 6.30, panneau 1 et 4). Les conformations de ces résidus sont identiques dans la structure à pression ambiante et à haute pression (Figure 6.30, panneau 1 et 4). Cependant, on note l'apparition de 7 molécules d'eau proche du Trp20 (Figure 6.30, panneau 2). Ces molécules d'eau forment des interactions entre elles. Ce phénomène est observé à l'identique à l'interface CD (Figure 6.30, panneau 3). A cette interface, on observe en plus l'apparition de 5 molécules d'eau proche de la Phe12, situé du côté opposé au Trp20

(Figure 6.30, panneau 5). De plus, les résidus Trp20, Tyr226 et Tyr227 montrent des conformations alternatives dans la structure à haute pression (Figure 6.30, panneau 5).

La haute pression déstabilise l'interface AB entraînant une hydratation des résidus qui la composent (+7 molécules d'eau à l'interface AB (Figure 6.30, panneau 2) et +12 molécules d'eau à l'interface CD (Figure 6.30, panneau 3 et 5)). L'apparition des molécules d'eau augmente la flexibilité des résidus et entraîne l'apparition de conformations alternatives (Figure 6.30, panneau 3 et 5). L'apparition de molécules d'eau induite par la pression a déjà été décrite dans le cas des IPMDH (Nagae et al., 2012)

Dans le but de comprendre quel pouvait être l'impact de la pression à l'interface AB des autres MDH, j'ai analysé les différentes mutations impactant les résidus décrits dans le paragraphe précédent (Phe12, Trp20, His19, Tyr226 et Tyr227), à partir de l'alignement de séquence des 6 MDH (cf. Annexe 6.1) (Figure 6.31). Pour plus de clarté, seuls les résidus de CauMDH, DkuMDH et TmaMDH sont représentés.

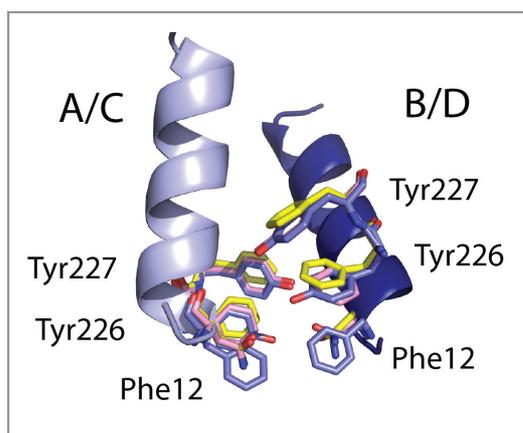


Figure 6.31. Représentation des mutations ponctuelles au niveau de l'interface AB (CD). La numérotation des résidus suit la séquence de CauMDH. Les résidus de CauMDH sont indiqués en bleu, ceux de DkuMDH en rose et ceux de TmaMDH en jaune. Le monomère C est en bleu clair et le monomère D en bleu foncé.

L'His19 et le Trp20 sont conservés à l'exception de l'enzyme de GkaMDH qui ne comporte pas de tryptophane. Chez GkaMDH, l'His19 est mutée en phénylalanine et le Trp20 en leucine. Nous ne disposons pas de la structure de GkaMDH pour analyser les répercussions de ces mutations sur la structure. Les Tyr226 et Tyr227 sont mutées en phénylalanine chez TmaMDH et TnaMDH. Chez

DkuMDH, seulement la Tyr226 est mutée en phénylalanine. Enfin, la Phe12 n'est conservée que chez GkaMDH, elle est mutée en asparagine chez les 4 autres MDH.

Ces mutations n'ont pas un effet que sur l'interface AB (ou CD). En effet, la figure 21 représente les résidus Phe12, Tyr226 et Tyr227 de CauMDH et la protéine entière. Pour visualiser le site actif, nous avons superposé la structure de CauMDH avec celle de la LDH de *Thermus thermophilus* sous forme holo (Code PDB : 2V7P). Ensuite, nous avons visualisé la superposition avec PYMOL en ne gardant que la molécule de NADH de la structure de TthLDH et la structure de CauMDH (Figure 6.32).

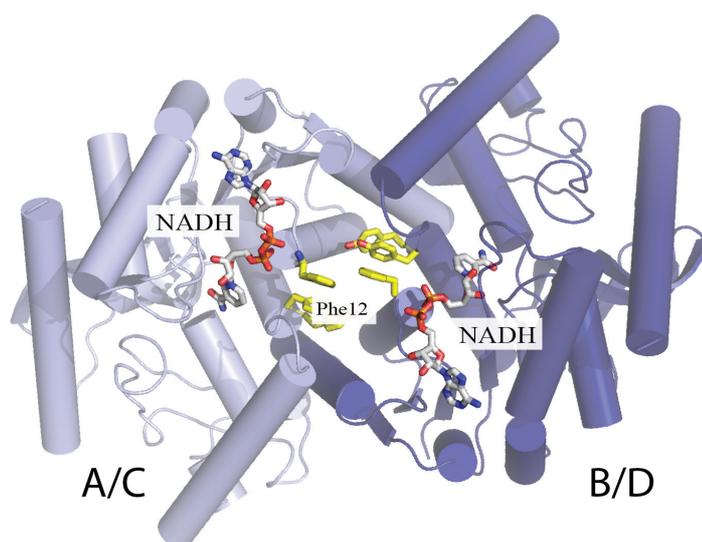


Figure 6.32. Représentation des résidus Phe12, Tyr226 et Tyr227 de CauMDH et la protéine entière de CauMDH. Le NADH a été modélisé après superposition de la structure de CauMDH et de TthLDH (Code PDB : 2V7P).

La proximité entre les positions où il existe des substitutions d'acides aminés entre les enzymes considérées et le NADH est clairement visible sur la figure 6.31. La Phe12, sans interagir directement avec le NADH, se situe proche des deux phosphates.

Ceci n'est pas le seul lien entre le site actif et l'interface AB. Comme décrit précédemment, la distance des interactions présentes à l'interface AB (ou CD) augmente en moyenne de 1 Å. J'ai analysé en détail les interactions qui impactent le site actif (Figure 6.33).

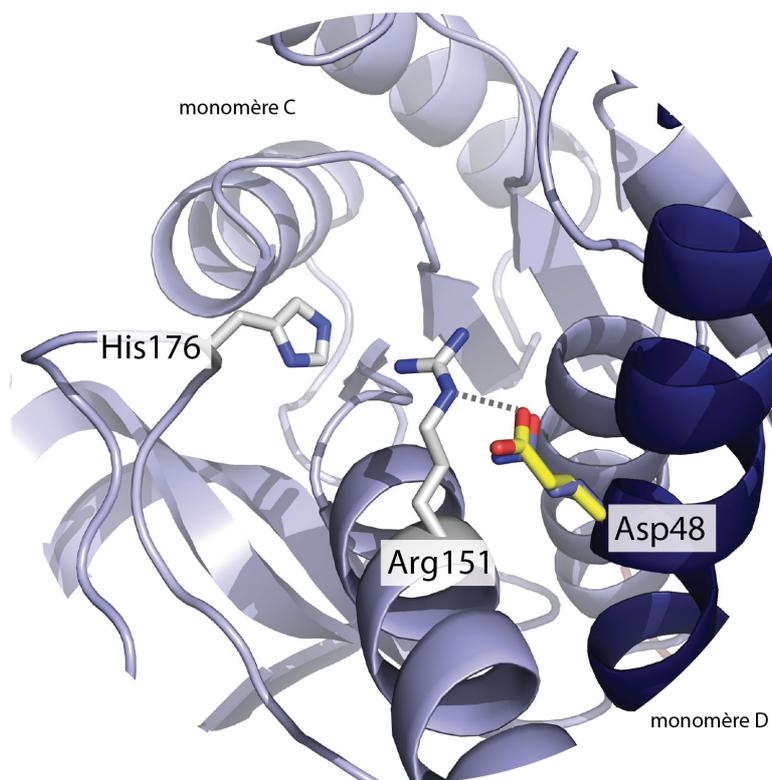


Figure 6.33. Représentation du site actif du monomère C (gris) et D (bleu). Le site actif est représenté par l'His176 et l'Arg151. Le Glu48 du monomère adjacent vient stabiliser l'Arg151. Le Glu48 est mutée en glutamine chez TmaMDH et TnaMDH.

Le résidu Glu48 stabilise l'Arg 151 du monomère adjacent qui oriente le substrat dans le site actif. La distance d'interaction entre l'Arg151 et le Glu48 passe de 2,49 Å à pression ambiante à 4,49 Å à 280 MPa dans les structures de CauMDH. Le résidu Glu48 est muté en glutamine chez TmaMDH et TnaMDH. Cette mutation ne modifie pas la distance d'interaction avec l'arginine (2,84 Å sur les structures de CauMDH et TmaMDH à 100 K) mais modifie légèrement l'environnement et peut moduler la force de l'interaction.

A cette interface, une autre mutation est visible, celle de la Val164 (CauMDH, PthMDH et GkaMDH) en phénylalanine (TmaMDH, TnaMDH et DkuMDH). Elle est représentée figure 6.34.

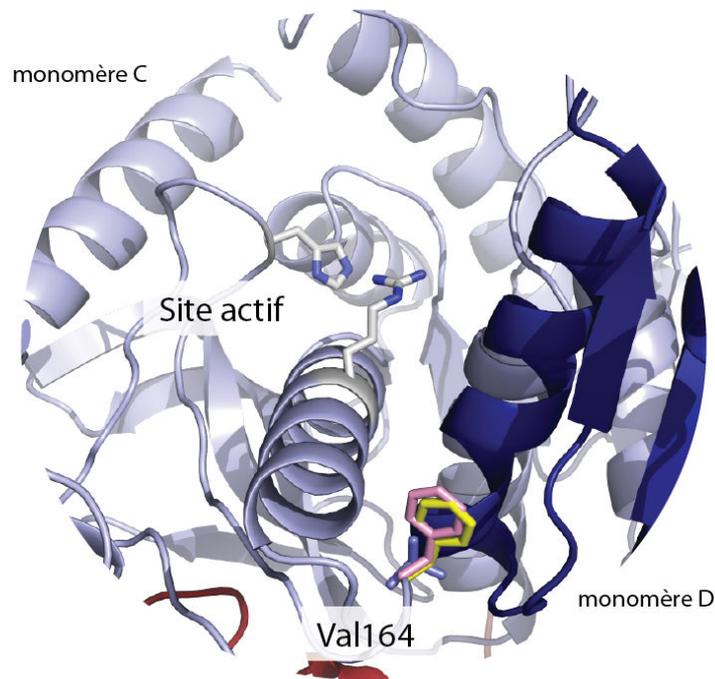


Figure 6.34. Représentation du résidu 164 à l'interface du monomère C (gris) et D (bleu). Le site actif est représenté par l'His175 et l'Arg151. Le résidu de CauMDH est indiqué en bleu, ceux de DkuMDH en rose et ceux de TmaMDH en jaune.

Le changement de volume lié à cette mutation est important. La présence du résidu aromatique chasse les molécules d'eau présentes proche de la Val164 dans la structure de CauMDH. Cette zone est donc plus hydrophobe dans les structures de DkuMDH, TnaMDH et TmaMDH. Ce résidu est en contact avec l'hélice qui porte l'Arg151 et pourrait influencer le mouvement de celle-ci.

L'interface AC (ou BD) présente une surface de contact deux fois moindre que l'interface AB (ou CD) (calcul fait avec le programme PISA). D'après le résultat effectué par THESEUS (Figure 6.28), cette interface semble à première vue faiblement impactée par la pression. Le résidu 168 adopte une double conformation dans la structure sous HPH. Ce résidu est largement muté au sein des MDH (Tableau 6.32). De plus, proche de ce résidu, le résidu 188 est un résidu aromatique à l'exception de CauMDH où il est muté en thréonine (Tableau 6.34).

	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	GkaMDH
168	gln	ser	his	thr	his	thr
188	thr	phe	his	tyr	his	tyr

Tableau 6.34. Mutations à l'interface AD ou BC pour CauMDH, PthMDH, DkuMDH, TnaMDH, TmaMDH et GkaMDH

Dans ce cas, les mutations entre CauMDH et PthMDH sont différentes. Il est difficile d'identifier une tendance claire dans ces mutations.

L'assemblage du tétramère forme une cavité centrale bordée par les interfaces AB, AC et AD. Dans un premier temps, j'ai calculé avec le programme CastP (Dundas et al., 2006) le volume de cette cavité chez les différentes enzymes. Le résultat est présenté sous forme de tableau (Tableau 6.35).

	CauMDH	PthMDH	DkuMDH	TmaMDH
Volume de la cavité centrale (\AA^3)	2229	2845	2294	1661
Différence avec celle de PthMDH (\AA^3)	616		551	1184
Equivalence en molécules d'eau	20		18	40

Tableau 6.35. Volume de la cavité centrale pour CauMDH, PthMDH, DkuMDH et TmaMDH.

Les variations de volume entre les cavités des différentes MDH sont importantes. La cavité centrale de PthMDH est la plus volumineuse. Celles de CauMDH et DkuMDH sont diminuées de 20 % (ce qui correspond au volume de 20 molécules d'eau). Celle de TmaMDH est quasiment deux fois moins volumineuse que celle de PthMDH (ce qui correspond au volume de 40 molécules d'eau).

Pour expliquer ce changement de volume, j'ai analysé les résidus qui bordent la cavité centrale. J'ai identifié un groupe d'acides aminés basiques (arginines et lysines) qui bordent la cavité (Figure 6.35).

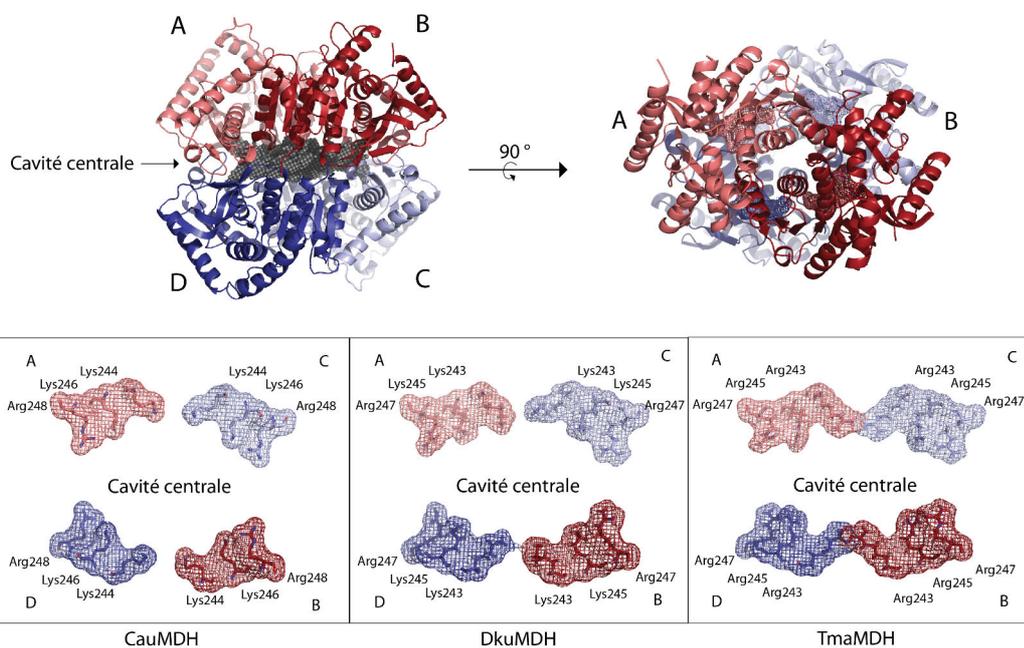


Figure 6.35. Représentation de la cavité centrale chez les MDH. Les résidus arginines et lysines qui bordent la cavité centrale sont représentés pour CauMDH, DkuMDH et TmaMDH. L'orientation est la même que celle du tétramère de droite. Le groupe d'arginine de PthMDH n'est pas représenté car il est équivalent à celui de CauMDH. De même, le groupe arginines de TnaMDH est équivalent à celui de TmaMDH.

Ce groupe d'acides aminés basiques est constitué des Arg243, 245 et 247 chez TmaMDH et TnaMDH. L'Arg247 est conservée dans l'ensemble des MDH, mais les Arg243 et 245 sont mutées en lysine chez CauMDH, PthMDH et DkuMDH. Dans le cas de GkaMDH, l'Arg243 est mutée en lysine mais la 245 est mutée en glutamine. Dans la structure de TmaMDH, on observe que les Arg243 provenant des monomères A et C forment un empilement hydrophobe participant à la stabilisation de l'interface AC (ou BD). La distance entre les Lys243 des monomères A et C (ou B et D) est plus courte dans la structure de DkuMDH que dans celle de CauMDH. Ces observations semblent indiquer que l'interface AC (ou BD) est renforcée dans la structure de DkuMDH et surtout dans celles de TmaMDH et TnaMDH.

Pour confirmer l'importance de ces arginines dans le volume de la cavité, j'ai muté les Arg243-245 dans la structure de TmaMDH en lysine (*in silico*). Le volume de la cavité est augmenté de 20 %. Ce groupe d'arginines joue donc un rôle dans le volume de la cavité centrale. Ce groupe d'acides aminés basiques est aussi impliqué

dans un réseau d'interactions avec des résidus intramonomère largement décrit par Dalhus *et al.* (Dalhus *et al.*, 2002)

La structure de TmaMDH comporte une cavité centrale quasiment deux fois plus petite que celle de PthMDH. Cette observation suggère que la structure de TmaMDH est plus compacte que les autres MDH. J'ai recherché dans la structure de TmaMDH d'autres cavités qui pourraient confirmer cette tendance. C'est le cas d'une cavité enfouie située proche du site actif (Figure 6.36).

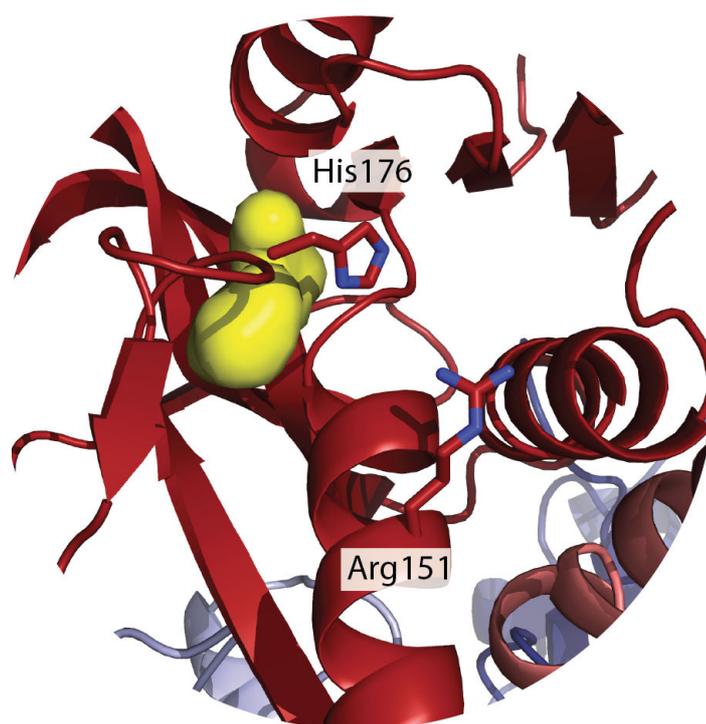


Figure 6.36. Représentation du site actif de CaMDH. La cavité enfouie en jaune est située derrière l'His176.

Cette cavité est séparée du site actif par l'histidine catalytique (His176). Cette cavité a un volume de 40 \AA^3 environ (correspondant au volume d'une molécule d'eau) dans la structure CaMDH à 100 K (volume calculé avec le programme VOIDOO (Kleywegt & Jones, 1994)).

Cette cavité est aussi présente dans les autres structures de MDH mais le volume exact de la cavité n'a pu être déterminé que dans le cas de CaMDH par le programme VOIDOO. J'ai donc effectué une analyse qualitative de cette cavité en représentant le volume de chacune d'elle dans PYMOL (Figure 6.37).

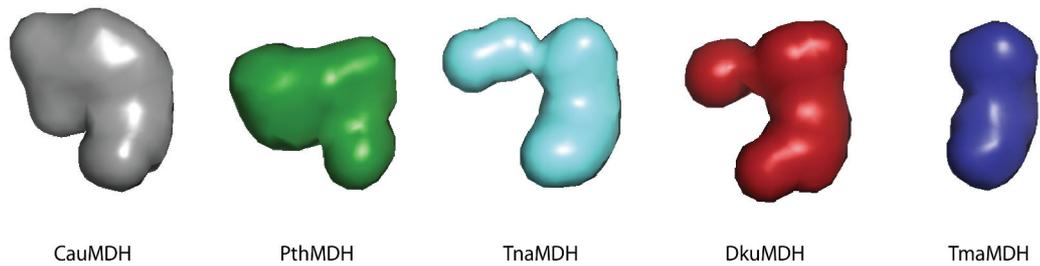


Figure 6.37. Représentation de la cavité située derrière le site actif. CauMDH (gris), PthMDH (vert), TnaMDH (cyan), DkuMDH (rouge) et TmaMDH (bleu foncé)

Les formes sont similaires dans les différents monomères qui composent l'unité asymétrique pour l'ensemble des MDH.

Le volume de la cavité varie en fonction des MDH. Le volume est plus important pour les structures de CauMDH et PthMDH. Par contre, le volume de la cavité est réduit chez DkuMDH et TnaMDH. Celui de TmaMDH est largement plus faible que le reste des MDH.

Pour identifier les mutations à l'origine du changement de volume, j'ai représenté les résidus qui bordent la cavité (Figure 6.38).

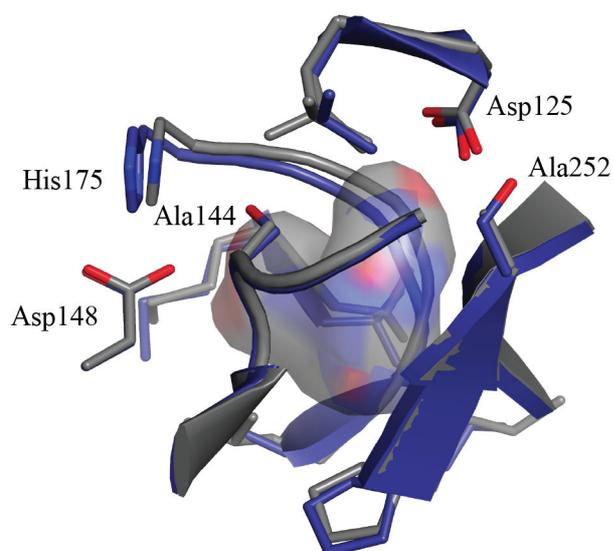


Figure 6.38. Représentation de la cavité située derrière le site actif. CauMDH (gris) et TmaMDH (bleu foncé) avec les résidus bordant le site actif. Les résidus His175, Asp148 et Asp125 sont strictement conservés.

Les résidus His175, Asp148 et Asp125 sont strictement conservés. Deux mutations ponctuelles équivalentes interviennent sur l'Ala252 et Ala144. Ces résidus alanine chez CauMDH et PthMDH sont mutés en sérine chez TmaMDH et TnaMDH. Chez DkuMDH seulement l'Ala252 est mutée en sérine (Tableau 6.36).

	CauMDH	PthMDH	TnaMDH	DkuMDH	TmaMDH	GkaMDH
144	ala	ala	ser	ala	ser	ser
252	ala	ala	ser	ser	ser	leu

Tableau 6.36. Mutations présentes chez les MDH au niveau de la cavité située derrière le site actif.

Curieusement, ce résidu est muté en leucine chez GkaMDH. La différence de volume de la cavité entre TnaMDH et TmaMDH ne s'explique pas par des mutations ponctuelles. La différence de volume semble provenir du positionnement de la chaîne principale.

6.6. Discussion

L'analyse de la variation des ΔV et de l'optimum de pression en fonction de la température, nous a conduit à proposer un modèle pour expliquer les effets de la pression, en lien avec l'adaptation piézophile, sur les MDH.

Nous avons pu établir que la plupart des MDH de cette étude ont un comportement bi-modal face à la pression. Nous pouvons définir deux régimes : aux faibles pressions ou avant l'optimum, le ΔV est négatif et relativement faible ; après l'optimum et aux fortes pressions, avec des ΔV positifs élevés.

Pour approfondir, nous avons voulu identifier le ou les mécanismes responsables de l'augmentation de l'activité sous pression. Le but étant de savoir si ce mécanisme était commun à l'ensemble des MDH ou si les différences d'optimum pouvaient s'expliquer par des mécanismes différents. Dans cet optique, nous avons choisi PthMDH, DkuMDH et TmaMDH qui présente des comportements différents sous pression. Nous avons mis en évidence que l'effet de la pression sur l'activité spécifique était en partie lié au mécanisme d'inhibition par le substrat. En effet, l'inhibition par le substrat est absente à 150 MPa pour les 3 enzymes (Figure 6.16). De plus, les valeurs absolues d'activités entre les trois enzymes sont relativement proches. Cela laisse présager que la différence dans les optimums de pression n'est pas guidée par le mécanisme responsable de l'augmentation de l'activité et qui intervient à des pressions faibles, mais par le mécanisme responsable de la diminution de l'activité spécifique aux fortes pressions. Le mécanisme moléculaire impliqué n'a pas encore été élucidé mais n'aurait pas d'effet sur la MDH de *C. aurantiacus* (CauMDH) (l'activité de l'enzyme n'augmente pas sous pression).

Ensuite, un autre phénomène apparaît aux hautes pressions. Celui-ci entraîne une diminution de l'activité spécifique. Suivant la pression à laquelle il apparaît, il détermine l'optimum de pression pour chaque enzyme (150 MPa pour PthMDH, 250 MPa pour TnaMDH, DkuMDH et TmaMDH). Ce phénomène est accompagné d'un ΔV positif important (Figure 6.15). Les données structurales obtenues à 280 MPa pour CauMDH laissent supposer que la pression induit la déstabilisation de l'édifice tétramérique (Figure 6.29). Des interactions entre des résidus impliqués dans le site actif sont interrompues. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la diminution de l'activité aux fortes pressions.

La malate déshydrogénase de *G. kaustophilus* (GkaMDH) ne subit que très faiblement les effets de la pression. Le ΔV associé à la réaction spécifique est compris entre $-0,5$ et $1,3 \text{ ml.mol}^{-1}$ sur une gamme de pression comprise entre $0,1$ et 400 MPa et une gamme de température comprise entre 10 et $60 \text{ }^\circ\text{C}$. L'alignement de séquence en lien avec la connaissance des zones clés impliquées dans la dynamique des MDH a mis en avant des mutations non équivalentes dans la séquence de GkaMDH. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir la structure cristallographique de cette enzyme durant ma thèse. Un jeu de données a été enregistré mais la présence de macles n'a pas permis de résoudre le problème de phase.

Nous avons remarqué au cours de notre étude que les comportements de TmaMDH et de TnaMDH sous HPH sont similaires, alors que *T. nagasakiensis* a été isolé à la surface. Ces enzymes partagent une similarité de séquence très forte avec seulement 13 résidus différents. Cependant, l'absence de mesures de croissance sous HPH de ces organismes rend difficile l'interprétation de ce résultat. Selon une première caractérisation, *T. marianensis* serait même plus sensible à la pression que *E. coli* (Takai et al., 1999). Les mesures de croissance des organismes sous pression se font dans des cellules hermétiques et l'apport en oxygène est difficile à contrôler. Le caractère aérobique de *T. marianensis* rend plus difficile les mesures de croissances sous pression et pourrait expliquer les résultats de Takai *et al.*

Pour explorer les effets de la pression sur les enzymes, nous avons décidé de faire varier la température. La température module fortement la réponse des enzymes aux HPH. Cet effet s'exprime bien dans la variation du ΔV à différentes températures (Figure 6.15). Après l'optimum d'activité, le ΔV augmente avec la température ce qui signifie que les enzymes sont plus sensibles à la pression aux fortes températures ($60-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Cependant, les valeurs de P_{100} augmentent à basse température et ce pour l'ensemble des MDH. Le phénomène est même légèrement visible dans le cas de GkaMDH. L'activité de CauMDH n'augmente pas avec la pression mais la diminution d'activité induite par la pression est moins sévère à basse température. En conclusion, l'activité des MDH sous pression est dépendante de la température : les valeurs de ΔV sont plus élevées à hautes températures alors que les valeurs de P_{100} sont plus élevées à basse température.

D'un point de vue mécanistique, nous avons comparé les effets de la levée de l'inhibition par la pression sur les paramètres cinétiques à ce qui a été décrit précédemment pour les LDH. L'inhibition par le substrat a été étudiée chez les LDH qui ont un mécanisme catalytique similaire à celui des MDH tétramériques (Chapman et al., 1999). La Ser163 a été identifiée comme étant un résidu clés dans ce mécanisme chez les LDH. La mutation de ce résidu en leucine déplace l'inhibition par le substrat à des concentrations beaucoup plus élevées (valeurs de

K_m : 0,058 mM et 12 mM, valeurs de K_i : 0,77 mM et >500 mM pour la protéine sauvage et le mutant respectivement) (Eszes et al., 1996; Hewitt et al., 1999). Ces changements s'accompagnent d'une diminution par deux du k_{cat} . Dans notre cas, les paramètres cinétiques ne sont pas modifiés de la même manière à 150 MPa. D'après une estimation à partir des courbes, la levée de l'inhibition s'accompagne d'une multiplication par 4 des valeurs du K_m et du k_{cat} . La valeur du k_{cat} augmente alors qu'elle diminue dans le cas des LDH. De même, la valeur de K_m est multipliée par 4 alors qu'elle est multipliée par 600 dans le cas des LDH. A partir de ces observations, il est difficile de conclure que le mécanisme à l'origine de la levée de l'inhibition par le substrat aux HPH soit identique entre les LDH et MDH. Les effets de la pression sur les MDH est intéressant d'un point de vue biotechnologique car il permet de lever l'inhibition par le substrat en augmentant le k_{cat} .

La poursuite de ce travail de recherche impliquera dans un premier temps, de sonder les effets de la pression sur la stabilité des enzymes afin de confirmer les hypothèses émises lors de ce manuscrit. Des expériences préliminaires de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) sous hautes pressions ont été menées durant ma thèse. Elles ont été réalisées sur les MDH en collaboration avec Javier Perez en charge de la ligne de lumière SWING à SOLEIL. La cellule haute pression est en cours de développement et nous n'avons pas pu obtenir pour l'instant des résultats reproductibles. Les expériences de SAXS permettraient de sonder le chemin de l'état natif à l'état déplié sous HPH. En effet, les effets de la pression au delà de l'optimum d'activité sont associés à un ΔV élevé (10,3-51,8 ml.mol⁻¹) ce qui suggère que la pression déstabilise l'édifice tétramérique.

Récemment, nous avons fait sur la plateforme haute pression l'acquisition d'un fluorimètre couplé à une enceinte haute pression. Cet appareil permet de suivre la fluorescence en fonction de la pression (0,1 à 400 MPa) et de la température (10-80 °C). Il serait intéressant de coupler le suivi de la stabilité des protéines par fluorescence du tryptophane avec des mesures d'activité réalisée à pression ambiante pour sonder la réversibilité des effets de la pression.

De plus, l'optimisation des cristaux de GkaMDH pourrait conduire à la détermination de la structure cristallographique afin de comprendre l'implication des mutations identifiées à partir de l'alignement de séquence sur la structure de l'enzyme. Pour compléter les observations obtenues à partir des structures de CauMDH sous HPH, il serait intéressant d'obtenir les structures cristallographiques sous hautes pressions de TmaMDH.

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

Les enzymes que nous avons étudiées sont issues d'organismes naturellement exposés à des pressions très différentes. A l'issue de ce travail, la question est donc de savoir si les différences de comportement que nous révélons sont dues à une adaptation environnementale spécifique de la pression ou aux différences de propriétés dynamiques des édifices liées aux substitutions d'acides aminés, à des différences de thermostabilité, etc. . Le fait que dans la majorité des cas, c'est l'enzyme de surface qui présente un comportement "a priori" défavorable sous pression va dans le sens d'une adaptation. Cependant, pour se prononcer de manière rigoureuse sur le caractère "adaptatif" des différences de comportements observées sous pression, il convient de les discuter au regard des différentes définitions de ce que serait une enzyme *adaptée* aux hautes pressions hydrostatiques (HPH).

Une première définition de la piézophilie spécifique pourrait être une enzyme dont l'activité ne subirait pas l'influence de la pression. Dans ce cas, la variation de volume entre l'état initial et l'état final (ΔV) associé à la réaction spécifique serait proche de zéro et resterait constant. Cette définition a été utilisée dans le cas des α -actines provenant de poissons des fonds marins (Morita et al. 2003). Dans notre étude, cette définition conviendrait à la malate déshydrogénase de *G. kaustophilus* (GkaMDH). Cette enzyme provient d'un organisme isolé dans la Fosse des Mariannes à -11 000 mètres de profondeur. Le ΔV associé à la réaction spécifique est compris entre - 0,5 et 1,3 ml.mol⁻¹ sur une gamme de pression et de température comprise entre 0,1 et 400 MPa et 10 et 60 °C respectivement. L'alignement de séquence, en lien avec la connaissance des zones clés impliquées dans la dynamique des MDH, a mis en avant des mutations ponctuelles non équivalentes dans la séquence de GkaMDH (cf. chapitre 6). Nous n'avons pas pu déterminer la structure cristallographique de GkaMDH durant ma thèse.

Une enzyme *adaptée* peut aussi répondre favorablement à la contrainte des HPH. L'augmentation d'activité sous HPH peut être caractérisée par différents paramètres. Dans un premier temps, l'augmentation d'activité, c'est à dire la différence entre l'activité à pression ambiante et celle à l'optimum, peut être décrite par le paramètre P_{100} (cf. équation 2.9). Ce paramètre a été développé pour les besoins de l'étude par analogie au coefficient de température (Q_{10} , variation de l'activité pour 10 °C, cf. équation 2.8). Les valeurs de P_{100} ont été calculées pour l'ensemble des MDH, à différentes températures. Nous n'avons pas identifié de différence claire dans les valeurs de P_{100} entre les différentes MDH. On peut donc difficilement parler d'adaptation sur la base de ce paramètre-ci dans le cas des MDH. Par contre, dans le cas des glyoxylate hydroxypyruvate réductases (GRHPR), l'enzyme provenant d'un organisme de surface, *P. furiosus*, à un P_{100} inférieur à 1 quelles que soient les conditions, c'est à dire que son activité n'est jamais augmentée par la pression. A l'inverse, l'activité des enzymes de PhoGRHPR et PyaGRHPR est augmentée sous pression, notamment en présence de NADPH et à 25 °C (P_{100} de 1,4 et 1,5 respectivement). Ceci

pourrait témoigner du caractère "adapté" des enzymes provenant d'organismes abyssaux dans certains cas.

Il faut cependant prendre en considération le fait que le P_{100} est dépendant de la température. Il est plus élevé à basse température. Dans notre étude, ce phénomène a été identifié aussi bien chez les MDH que chez les GRHPR. Nous ne connaissons pas les effets de la pression sur le Q_{10} , nous ne savons donc pas si ces deux paramètres sont corrélés. Toutefois, la variation observée du P_{100} (valeur plus élevée à basse température) avec la température est contre-intuitive. En effet, le processus catalytique nécessite une certaine flexibilité de la protéine et plus particulièrement du site actif. Il est surprenant que la somme de deux facteurs qui induisent une certaine rigidité du site actif contribue à l'augmentation de l'activité d'enzymes thermophiles qui possèdent un site actif naturellement rigide pour maintenir leur activité à haute température. D'un autre côté, il est aussi possible que l'activation induite par la température masque les effets de la pression sur l'activité spécifique. C'est la première fois qu'une augmentation de l'activité induite par les HPH est observée à basses températures. Ce résultat ouvre des débouchés vers des applications biotechnologiques pour lesquelles il serait nécessaire d'augmenter l'activité spécifique sans augmenter la température.

La pression conduit le système à un état de plus faible volume, ce qui peut avoir de multiples conséquences sur l'activité, la stabilité et la spécificité de substrat ou de cofacteur des enzymes. Dans le cas des MDH, les valeurs de ΔV que nous obtenons représentent la variation de volume de l'ensemble de la réaction. Une réaction associée à un ΔV négatif sera favorisée par la pression, à l'inverse, une réaction associée à un ΔV positif sera défavorisée par la pression. L'analyse de la variation des ΔV et des optima de pression en fonction de la température (cf. chapitre 6), nous a conduit à proposer un modèle pour expliquer les effets de la pression sur les MDH en lien avec l'adaptation piézophile. Aux faibles pressions, les effets des HPH sont dictées par la levée de l'inhibition par le substrat. Ce mécanisme est commun aux enzymes provenant d'organismes de surface et des abysses et produit une augmentation d'activité équivalente pour chacune des MDH étudiées. Le ΔV associé à ce phénomène est négatif et relativement faible. Le mécanisme moléculaire impliqué n'a pas encore été élucidé mais n'aurait pas d'effet sur la MDH de *C. aurantiacus* (CauMDH) (l'activité de l'enzyme n'augmente pas sous pression).

Ensuite, un autre phénomène apparaît aux valeurs élevées de pression. Celui-ci entraîne une diminution de l'activité spécifique. Suivant la pression à laquelle il apparaît, il détermine l'optimum de pression pour chaque enzyme (150 MPa pour PthMDH, 250 MPa pour TnaMDH, DkuMDH et TmaMDH) (cf. chapitre 6). Ce phénomène, accompagné d'un ΔV positif important, est aussi présent chez CauMDH. Il reste à définir si la diminution d'activité aux valeurs élevées de pression est en lien avec la déstabilisation de l'édifice tétramérique comme observée dans la structure cristallographique de CauMDH obtenue à

280 MPa. Des expériences préliminaires de suivi de l'activité à pression ambiante après incubation sous HPH suggèrent que le processus de déstabilisation du tétramère est réversible pour l'ensemble des MDH. Dans le cas des GRHPR, nous n'avons pas assez de données pour extraire les valeurs de ΔV .

Un autre paramètre qui pourrait indiquer une adaptation est celui qui correspond à la pression à laquelle l'activité maximale est atteinte. Ce paramètre est celui retenu en général pour caractériser les effets de la température sur l'activité. Dans le cas des MDH, ce paramètre a pu être déterminé pour PthMDH, DkuMDH, TnaMDH et TmaMDH. Les enzymes provenant de *T. marianensis* (isolé dans la Fosse des Mariannes, à - 11 000 mètres de profondeur) et de *D. kuznetsovii* (isolé à -3000 mètres) ont des optima de pression de 250 MPa alors que l'enzyme provenant d'un organisme de surface, *P. thermopropionicum*, a un optimum de 150 MPa. Si on prend ce paramètre comme critère pour définir la piézophilie, on peut donc dire que le comportement des MDH indique une "adaptation". Toutefois, le comportement sous HPH de TnaMDH est similaire à celui de TmaMDH alors que *T. nagasakiensis* a été isolé à la surface. Cependant, l'absence de mesures de croissance sous HPH de ces organismes rend difficile l'interprétation de ce résultat. Nous ne savons pas si l'organisme est lui aussi piézophile ou si la MDH a un comportement singulier par rapport à l'ensemble du génome. Dans le cas des GRHPR, lorsque la pression induit une augmentation d'activité, celle-ci atteint en général un maximum à 200 MPa et se maintient jusqu'à 400 MPa. Il est donc difficile de définir un optimum de pression. Nous n'avons pas observé de différence notable entre les GRHPR basée sur la valeur d'activité maximale.

Notre étude sur les GRHPR a également apporté un nouvel éclairage sur les effets de la pression en révélant une modulation induite par la pression sur le choix du cofacteur/substrat. Il avait été montré précédemment que le choix du substrat pouvait modifier les effets de la pression dans le cas d'une carboxypeptidase (Occhipinti et al. 2006). Dans notre cas, l'activité sous HPH des GRHPR est peu sensible au changement de substrat. En revanche, elle est modulée par le choix du cofacteur. Alors que le NADH favorise la réaction catalytique à pression ambiante, c'est le NADPH qui favorise l'activité spécifique sous pression. Cette modulation affecte les valeurs de P_{100} mais faiblement le ΔV et les optimums de pression.

Il faut cependant rester prudent avant d'affirmer qu'une adaptation piézophile existerait pour toutes les enzymes abyssales. Nous rappelons que chaque enzyme possède une structure quaternaire qui lui est propre et réagit, par conséquent, différemment aux contraintes de la haute pression. Ceci est vrai pour tout type d'enzymes "extrêmophiles" mais notre étude indique que cette observation est encore plus pertinente pour la contrainte pression. En effet, l'effet de la pression peut être négatif ou positif suivant le ΔV associé à la réaction. L'effet de la pression sur l'activité spécifique peut donc être bidirectionnelle puisque la pression peut aussi bien favoriser que défavoriser une réaction. ANSI, son effet n'est pas prévisible à ce

jour (en fonction de l'enzyme, du substrat, de la poche catalytique). Si l'on compare à la température, on sait qu'une augmentation de la température entraîne une augmentation de la vitesse de réaction, quelles que soient les conditions.

Nous pouvons aussi discuter de la notion d'organismes "adaptés" à la pression : s'agit-il d'une véritable évolution adaptative à l'échelle des protéomes ou s'agit-il d'une sélection d'organismes possédant des propriétés déjà favorables, de par d'autres caractères adaptatifs (thermophilie, psychrophilie voire halophile), leur permettant un bon fonctionnement sous pression, ou bien est-ce une sélection de protéines au sein de familles spécifique particulièrement sensibles aux hautes pressions (par ex par transfert horizontal de gènes) ? Il est bien évident, au regard des effets subtils et contrastés de la pression révélés par notre travail, que ces réponses peuvent difficilement être obtenues par l'analyse des génomes. Par contre une analyse phylogénomique et des études centrées sur un nombre restreint de protéines pour lesquels on connaîtrait clairement les déterminants structuraux qui favorisent le comportement sous pression pourrait nous éclairer sur ces questions.

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de recherche, nous avons abordé la question de l'adaptation des protéines à la haute pression à travers l'étude de deux familles spécifiques provenant d'organismes piézophiles et non piézophiles. Ce projet de recherche était motivé par les questions suivantes:

1. Est-ce que les protéines provenant d'organismes piézophiles se comportent différemment sous pression de celles provenant d'organismes piézosensibles ?
2. Est-ce que les hautes pressions représentent un paramètre physicochimique suffisant pour contraindre l'activité et/ou la stabilité des enzymes ?
3. Existe-t-il une adaptation piézophile spécifique au niveau moléculaire et métabolique? Si tel est le cas, quelle forme prend-elle ?

Les études comparatives associant enzymologie, biophysique et cristallographie des protéines présentées dans cette thèse révèlent des différences de comportement significatives vis à vis de la pression, chez des protéines d'une même famille spécifique. Nos analyses montrent que ces différences portent sur différents aspects de la dynamique fonctionnelle des protéines.

Dans l'absolu, les différences de comportement sous pression mises à jour dans ce travail sont intéressantes et n'étaient pas aisément prédictibles, compte tenu des fortes homologies de séquence et des similarités structurales entre les protéines étudiées. Nous montrons donc ainsi que la pression peut "potentiellement" représenter un paramètre discriminant susceptible de faire l'objet d'une adaptation. Le caractère "adaptatif" des différences de comportement constaté a été discuté.

Le travail réalisé a permis de poser les bases d'une méthode de comparaison exhaustive des propriétés des protéines vis-à-vis de la pression afin de détecter les traces d'une adaptation piézophile sur d'autres systèmes protéiques.

L'étude intégrative a aussi fait émerger de nouveaux éclairages sur le mécanisme catalytique des GRHPR. L'analyse fine des structures cristallographiques a permis de mettre en évidence un état intermédiaire de la catalyse permettant de confirmer des hypothèses quand à la spécificité des GRHPR.

Notre travail montre également qu'une ingénierie des protéines ou la sélection d'enzymes "performantes" issues de la biodiversité marine sont des voies à explorer dans le cadre d'applications biotechnologiques qui font intervenir les hautes pressions.

Par la suite, la méthodologie développée durant ma thèse pourra être appliquée à d'autres modèles protéiques. Dans notre équipe, nous développons une problématique autour des grands assemblages et plus particulièrement des peptidases. Une première caractérisation sous pression de la peptidase TET de *P. horikoshii* a été faite (Rosembaum et al. 2012). Une étude comparative est en cours pour sonder les propriétés de ces enzymes. Les premiers résultats spécifiques montrent que l'ensemble des TET de *Pyrococcus* voit leur activité augmentée par la pression. Cependant des tests d'activité sur une TET bactérienne mésophile montrent que celle-ci est inhibée par la pression. La capacité à être activée sous pression des TET pourrait être en lien avec le caractère hyperthermophile de ces enzymes.

Nous avons largement étudié le lien entre pression et température. Les effets de la pression à différents pH seraient aussi intéressants. En effet, le pH joue sur l'état de protonation des enzymes et notamment des résidus catalytiques (une histidine dans le cas des MDH et des GRHPR) affectant le comportement spécifique de l'enzyme mais aussi sa stabilité.

Dans l'optique d'étudier de nouveaux organismes, mon choix se porterait sur la comparaison d'organismes piézosensibles et piézophiles adaptés au froid (cf. chapitre 1). Il existe de nombreux organismes psychrophiles et piézophiles caractérisés en laboratoire. L'étude des protéines psychrophiles est un défi biochimique qui pourrait apporter des réponses sur la relation entre l'adaptation à la pression et à la température chez les protéines.

CHAPITRE VIX

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2347–2357.
- Abe, F., & Horikoshi, K. (2000). Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8093–8102.
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., David, Echols, N., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), 213–221. doi:10.1107/S0907444909052925
- Akasaka, K. (2006). Probing Conformational Fluctuation of Proteins by Pressure Perturbation, 1–22. doi:10.1021/cr040440z
- Akasaka, K., Kitahara, R., & Kamatari, Y. O. (2013). Exploring the folding energy landscape with pressure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2), 110–115. doi:10.1016/j.abb.2012.11.016
- Arai, K., Ichikawa, J., Nonaka, S., Miyanaga, A., Uchikoba, H., Fushinobu, S., & Taguchi, H. (2011). A molecular design that stabilizes active state in bacterial allosteric L-lactate dehydrogenases. *Journal of Biochemistry*, 150(5), 579–591. doi:10.1093/jb/mvr100
- Ascone, I., Kahn, R., Girard, E., Prange, T., Dhaussy, A.-C., Mezouar, M., et al. (2010). Isothermal compressibility of macromolecular crystals and macromolecules derived from high-pressure X-ray crystallography. *J. Appl. Cryst* (2010). 43, 407-416 [Doi:10.1107/S0021889810003055], 1–10. doi:10.1107/S0021889810003055
- Balny, C., Masson, P., & Heremans, K. (2002). High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1595(1-2), 3–10.
- Bartlett, D. H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1595(1-2), 367–381.
- Bartlett, G. J., Porter, C. T., Borkakoti, N., & Thornton, J. M. (2002). Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *Journal of Molecular Biology*, 324(1), 105–121.
- Bell, J. K., Yennawar, H. P., Wright, S. K., Thompson, J. R., Viola, R. E., & Banaszak, L. J. (2001). Structural analyses of a malate dehydrogenase with a variable active site. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31156–31162. doi:10.1074/jbc.M100902200
- Birrien, J.-L., Zeng, X., Jebbar, M., Cambon-Bonavita, M.-A., Querellou, J., Oger, P., et al. (2011). *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 12), 2827–2831. doi:10.1099/ijs.0.024653-0
- Booth, M. P. S., Connors, R., Rumsby, G., & Brady, R. L. (2006). Structural Basis of Substrate Specificity in Human Glyoxylate Reductase/Hydroxypyruvate Reductase. *Journal of Molecular Biology*, 360(1), 178–189. doi:10.1016/j.jmb.2006.05.018
- Boussau, B., Blanquart, S., Necsulea, A., Lartillot, N., & Gouy, M. (2008). Parallel adaptations to high temperatures in the Archaeal eon. *Nature*, 456(7224), 942–945. doi:10.1038/nature07393
- Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 19, 511–512.
- Briggs, G. E., & Haldane, J. B. (1925). A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *The Biochemical Journal*, 19(2), 338–339.
- Brindley, A. A., Pickersgill, R. W., Partridge, J. C., Dunstan, D. J., Hunt, D. M., & Warren, M. J. (2008). Enzyme Sequence and Its Relationship to Hyperbaric Stability of Artificial and Natural Fish Lactate Dehydrogenases. *PLoS ONE*, 3(4), 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0002042
- Cario, A. (2013, November 25). *Adaptation à la vie sous haute pression hydrostatique chez les micro-organismes piézophiles, l'exemple de Thermococcus barophilus*. Ecole Normale Supérieure de Lyon.
- Chalikian, T. V., & Bresiauer, K. J. (2002). On volume changes accompanying conformational transitions of biopolymers. *Biopolymers*, 39(5), 619–626. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199611)39:5<AID-BIP1>>3.0.CO;2-Z
- Chalikian, T. V., & Filfil, R. (2003). How large are the volume changes accompanying protein transitions and binding? *Biophysical Chemistry*, 104(2), 489–499.
- Chapman, A. D., Cortés, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R., & Brady, R. L. (1999). Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonnate and tetrahydroNAD. *Journal of Molecular Biology*, 285(2), 703–712. doi:10.1006/jmbi.1998.2357
- Clarke, A. R., Atkinson, T., & Holbrook, J. J. (1989). From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(3), 101–105.
- Colletier, J. P., Aleksandrov, A., Coquelle, N., Mraihi, S., Mendoza-Barberá, E., Field, M., & Madern, D. (2012). Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1683–1694. doi:10.1093/molbev/mss015
- Collins, M. D., Hummer, G., Quillin, M. L., Matthews, B. W., & Gruner, S. M. (2005). Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16668–16671.

- doi:10.1073/pnas.0508224102
- Colloc'h, N., Girard, E., Dhaussy, A.-C., Kahn, R., Ascone, I., Mezouar, M., & Fourme, R. (2006). High pressure macromolecular crystallography: the 140-MPa crystal structure at 2.3 Å resolution of urate oxidase, a 135-kDa tetrameric assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(3), 391–397. doi:10.1016/j.bbapap.2006.01.006
- Coquelle, N., Fioravanti, E., Weik, M., Vellieux, F., & Madern, D. (2007). Activity, Stability and Structural Studies of Lactate Dehydrogenases Adapted to Extreme Thermal Environments. *Journal of Molecular Biology*, 374(2), 547–562. doi:10.1016/j.jmb.2007.09.049
- Coquelle, N., Talon, R., Juers, D. H., Girard, E., Kahn, R., & Madern, D. (2010). Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations. *Journal of Molecular Biology*, 404(3), 493–505. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.055
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., Herzen, von, R. P., Ballard, R. D., et al. (1979). Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science (New York, N.Y.)*, 203(4385), 1073–1083. doi:10.1126/science.203.4385.1073
- Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 62(Pt 9), 1002–1011. doi:10.1107/S0907444906022116
- Cowtan, K. D., & Zhang, K. Y. (1999). Density modification for macromolecular phase improvement. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(3), 245–270.
- Cregeen, D. P., Williams, E. L., Hulton, S., & Rumsby, G. (2003). Molecular analysis of the glyoxylate reductase (GRHPR) gene and description of mutations underlying primary hyperoxaluria type 2. *Human Mutation*, 22(6), 497. doi:10.1002/humu.9200
- Dalhus, B., Saarinen, M., Sauer, U. H., Eklund, P., Johansson, K., Karlsson, A., et al. (2002). Structural Basis for Thermophilic Protein Stability: Structures of Thermophilic and Mesophilic Malate Dehydrogenases. *Journal of Molecular Biology*, 318(3), 707–721. doi:10.1016/S0022-2836(02)00050-5
- Diederichs, K., & Karplus, P. A. (2013). Better models by discarding data? *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 7), 1215–1222. doi:10.1107/S0907444913001121
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., & Liang, J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue), W116–8. doi:10.1093/nar/gkl282
- El-Hajj, Z. W., Allcock, D., Tryfona, T., Lauro, F. M., Sawyer, L., Bartlett, D. H., & Ferguson, G. P. (2010). Insights into piezophily from genetic studies on the deep-sea bacterium, *Photobacterium profundum* SS9. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1189, 143–148. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05178.x
- Elias, M., Wiczorek, G., Rosenne, S., & Tawfik, D. S. (2014). The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(1), 1–7. doi:10.1016/j.tibs.2013.11.001
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 4), 486–501. doi:10.1107/S0907444910007493
- Eszes, C. M., Sessions, R. B., Clarke, A. R., Moreton, K. M., & Holbrook, J. J. (1996). Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change. *FEBS Letters*, 399(3), 193–197.
- Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews. Microbiology*, 1(3), 200–208. doi:10.1038/nrmicro773
- Fiala, G., & Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* ssp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*, 145(1), 1–6.
- Forman, R. A. (1972). Pressure Measurement Made by the Utilization of Ruby Sharp-Line Luminescence, 1–2.
- Fraser, J. S., van den Bedem, H., Samelson, A. J., Lang, P. T., Holton, J. M., Echols, N., & Alber, T. (2011). Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16247–16252. doi:10.1073/pnas.1111325108
- Frauenfelder, H. (2005). Energy landscape and dynamics of biomolecules extended abstract. *Journal of Biological Physics*, 31(3-4), 413–416. doi:10.1007/s10867-005-0696-4
- Frauenfelder, H., Fenimore, P. W., & Young, R. D. (2007). Protein dynamics and function: insights from the energy landscape and solvent slaving. *IUBMB Life*, 59(8-9), 506–512. doi:10.1080/15216540701194113
- Girard, E., Kahn, R., Mezouar, M., Dhaussy, A.-C., Lin, T., Johnson, J. E., & Fourme, R. (2005). The first crystal structure of a macromolecular assembly under high pressure: CpMV at 330 MPa. *Biophysj*, 88(5), 3562–3571. doi:10.1529/biophysj.104.058636
- Girard, E., Marchal, S., Perez, J., Finet, S., Kahn, R., Fourme, R., et al. (2010). Structure-function perturbation and dissociation of tetrameric urate oxidase by high hydrostatic pressure. *Biophysical Journal*, 98(10), 2365–2373. doi:10.1016/j.bpj.2010.01.058
- Girard, E., Prange, T., Dhaussy, A.-C., Migianu-Griffoni, E., Lecouvey, M., Chervin, J. C., et al. (2007).

- Adaptation of the base-paired double-helix molecular architecture to extreme pressure. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4800–4808. doi:10.1093/nar/gkm511
- Girard, E., Stelter, M., Vicat, J., & Kahn, R. (2003). A new class of lanthanide complexes to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for macromolecular crystallography. *Acta Cryst (2003)*. D59, 1914–1922 [Doi:10.1107/S0907444903020511], 1–9. doi:10.1107/S0907444903020511
- Givan, C. V., & Kleczkowski, L. A. (1992). The enzymic reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate in leaves of higher plants. *Plant Physiology*, 100(2), 552–556.
- Goldberg, J. D., Yoshida, T., & Brick, P. (1994). Crystal structure of a NAD-dependent D-glycerate dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 236(4), 1123–1140.
- González, J. M., Masuchi, Y., Robb, F. T., Ammerman, J. W., Maeder, D. L., Yanagibayashi, M., et al. (1998). *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 2(2), 123–130.
- Gorovits, B., Raman, C. S., & Horowitz, P. M. (1995). High hydrostatic pressure induces the dissociation of cpn60 tetradecamers and reveals a plasticity of the monomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2061–2066.
- Gottschal, J. C., & Prins, R. A. (1991). Thermophiles: A life at elevated temperatures. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(5), 157–162. doi:10.1016/0169-5347(91)90057-5
- Govers, S. K., Dutré, P., & Aertsen, A. (2014). In Vivo Disassembly and Reassembly of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 196(13), 2325–2332. doi:10.1128/JB.01549-14
- Goward, C. R., & Nicholls, D. J. (1994). Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 3(10), 1883–1888. doi:10.1002/pro.5560031027
- Gross, M., Lehle, K., Jaenicke, R., & Nierhaus, K. H. (1993). Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 218(2), 463–468.
- Groussin, M., & Gouy, M. (2011). Adaptation to environmental temperature is a major determinant of molecular evolutionary rates in archaea. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2661–2674. doi:10.1093/molbev/msr098
- Hay, S., Evans, R. M., Levy, C., Loveridge, E. J., Wang, X., Leys, D., et al. (2009). Are the catalytic properties of enzymes from piezophilic organisms pressure adapted? *ChemBiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 10(14), 2348–2353. doi:10.1002/cbic.200900367
- Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172), 964–972. doi:10.1038/nature06522
- Hewitt, C. O., Eszes, C. M., Sessions, R. B., Moreton, K. M., Dafforn, T. R., Takei, J., et al. (1999). A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein Engineering*, 12(6), 491–496.
- Ho, B. K., & Gruswitz, F. (2008). HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. *BMC Structural Biology*, 8, 49. doi:10.1186/1472-6807-8-49
- Hummer, G., Garde, S., García, A. E., Paulaitis, M. E., & Pratt, L. R. (1998). The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1552–1555.
- Ikeuchi, H., Kunugi, S., & Oda, K. (2000). Activity and stability of a neutral protease from *Vibrio* sp. (vimelysin) in a pressure-temperature gradient. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(4), 979–983.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., & Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 5), 1729–1735.
- Imanaka, T. (2011). Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 87(9), 587–602.
- Irimia, A., Vellieux, F. M. D., Madern, D., Zaccai, G., Karshikoff, A., Tibbelin, G., et al. (2004). The 2.9 Å Resolution Crystal Structure of Malate Dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*: Mechanisms of Oligomerisation and Thermal Stabilisation. *Journal of Molecular Biology*, 335(1), 343–356. doi:10.1016/j.jmb.2003.10.054
- Izumi, Y., Yoshida, T., Kanzaki, H., Toki, S., Miyazaki, S. S., & Yamada, H. (1990). Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from a serine-producing methylotroph, *Hyphomicrobium methylavorum* GM2. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 190(2), 279–284.
- Jaenicke, R. (1981). Enzymes under extremes of physical conditions. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 10, 1–67. doi:10.1146/annurev.bb.10.060181.000245
- Jamieson, A. J., Fujii, T., Mayor, D. J., Solan, M., & Priede, I. G. (2010). Hadal trenches: the ecology of the deepest places on Earth. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 190–197. doi:10.1016/j.tree.2009.09.009
- Jannasch, H. W., & Taylor, C. D. (1984). Deep-sea microbiology. *Annual Review of Microbiology*, 38, 487–514. doi:10.1146/annurev.mi.38.100184.002415
- Johns, G. C., & Somero, G. N. (2004). Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A4-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular Biology and Evolution*,

- 21(2), 314–320. doi:10.1093/molbev/msh021
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), 125–132. doi:10.1107/S0907444909047337
- Kamatari, Y. O., Kitahara, R., Yamada, H., Yokoyama, S., & Akasaka, K. (2004). High-pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(1), 133–143. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.010
- Kantardjieff, K. A., & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 12(9), 1865–1871. doi:10.1110/ps.0350503
- Karplus, P. A., & Diederichs, K. (2012). Linking crystallographic model and data quality. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6084), 1030–1033. doi:10.1126/science.1218231
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1510–1513.
- Kauzmann, W. (1959). Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 14, pp. 1–63). Elsevier. doi:10.1016/S0065-3233(08)60608-7
- Kauzmann, W. (1987). Thermodynamics of unfolding. *Nature*, 325, 763–764.
- Kawano, H., Nakasone, K., Matsumoto, M., Yoshida, Y., Usami, R., Kato, C., & Abe, F. (2004). Differential pressure resistance in the activity of RNA polymerase isolated from *Shewanella violacea* and *Escherichia coli*. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 8(5), 367–375. doi:10.1007/s00792-004-0397-0
- Kleywegt, G. J., & Jones, T. A. (1994). Detection, Delineation, Measurement and Display of Cavities in Macromolecular Structures. *Acta Cryst (1994)*, D50, 178–185 [Doi:10.1107/S0907444993011333], 1–8. doi:10.1107/S0907444993011333
- Knorr, D., Heinz, V., & Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(3), 619–631. doi:10.1016/j.bbapap.2006.01.017
- Kumar, V., Carlson, J. E., Ohgi, K. A., Edwards, T. A., Rose, D. W., Escalante, C. R., et al. (2002). Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Molecular Cell*, 10(4), 857–869.
- Lamzin, V. S., Dauter, Z., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H., & Wilson, K. S. (1994). High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, 236(3), 759–785. doi:10.1006/jmbi.1994.1188
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Le Chatelier, H. L. (1884). Sur un énoncé général des lois d'équilibres chimiques. *Comptes-Rendus De l'Académie Des Sciences*, 99, 786–789.
- Levin, E. J., Kondrashov, D. A., Wesenberg, G. E., & Phillips, G. N., Jr. (2007). Ensemble Refinement of Protein Crystal Structures: Validation and Application. *Structure*, 15(9), 1040–1052. doi:10.1016/j.str.2007.06.019
- Long, F., Vagin, A. A., Young, P., & Murshudov, G. N. (2008). BALBES: a molecular-replacement pipeline. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 64(Pt 1), 125–132. doi:10.1107/S0907444907050172
- Macgregor, R. B. (1998). Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. *Biopolymers*, 48(4), 253–263. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)48:4<253::AID-BIP5>3.0.CO;2-F
- Macgregor, R. B. (2002). The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1595(1-2), 266–276.
- Madern, D. (2002). Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *Journal of Molecular Evolution*, 54(6), 825–840. doi:10.1007/s00239-001-0088-8
- Madern, D., & Zaccari, G. (1997). Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations -- effects of temperature, water isotope, cofactor and pH. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 249(2), 607–611.
- Madern, D., Ebel, C., Mevarech, M., Richard, S. B., Pfister, C., & Zaccari, G. (2000). Insights into the molecular relationships between malate and lactate dehydrogenases: structural and biochemical properties of monomeric and dimeric intermediates of a mutant of tetrameric L-[LDH-like] malate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, 39(5), 1001–1010.
- Marteinson, V. T., Reysenbach, A. L., Birrien, J. L., & Prieur, D. (1999). A stress protein is induced in the deep-sea barophilic hyperthermophile *Thermococcus barophilus* when grown under atmospheric pressure. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 3(4), 277–282.
- Masson, P., & Balny, C. (2005). Linear and non-linear pressure dependence of enzyme catalytic parameters. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1724(3), 440–450. doi:10.1016/j.bbagen.2005.05.003
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4), 658–674. doi:10.1107/S0021889807021206
- Meersman, F., Daniel, I., Bartlett, D. H., Winter, R., Hazael, R., & McMillan, P. F. (2013). High-Pressure

- Biochemistry and Biophysics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 75(1), 607–648.
doi:10.2138/rmg.2013.75.19
- Meersman, F., Smeller, L., & Heremans, K. (2006). Protein stability and dynamics in the pressure-temperature plane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(3), 346–354.
doi:10.1016/j.bbapap.2005.11.019
- Morild, E. (1981). The Theory of Pressure Effects on Enzymes. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 34, pp. 93–166). Elsevier. doi:10.1016/S0065-3233(08)60519-7
- Morita, T. (2003). Structure-based analysis of high pressure adaptation of alpha-actin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28060–28066. doi:10.1074/jbc.M302328200
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24(1), 81–91.
doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<81::AID-PROT6>3.0.CO;2-R
- Murakami, C., Ohmae, E., Tate, S.-I., Gekko, K., Nakasone, K., & Kato, C. (2010). Cloning and characterization of dihydrofolate reductases from deep-sea bacteria. *Journal of Biochemistry*, 147(4), 591–599.
doi:10.1093/jb/mvp206
- Murakami, C., Ohmae, E., Tate, S.-I., Gekko, K., Nakasone, K., & Kato, C. (2011). Comparative study on dihydrofolate reductases from *Shewanella* species living in deep-sea and ambient atmospheric-pressure environments. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 15(2), 165–175.
doi:10.1007/s00792-010-0345-0
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). li0235. *Acta Cryst (1997). D53*, 240-255
[Doi:10.1107/S0907444996012255], 1–16. doi:10.1107/S0907444996012255
- Müller, K., Lüdemann, H. D., & Jaenicke, R. (1981). Pressure-induced structural changes of pig heart lactic dehydrogenase. *Biophysical Chemistry*, 14(2), 101–110.
- Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L. M. G., Niwa, K., Hasegawa, M., Kato, C., & Watanabe, N. (2012). High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase. *Acta Cryst (2012). D68*, 300-309 [Doi:10.1107/S0907444912001862], 1–10. doi:10.1107/S0907444912001862
- Nazina, T. N., Ivanova, A. E., Kanchaveli, L. P., & Rozanova, E. P. (1988). A new sporeforming thermophilic methylotrophic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. *Mikrobiologiya*.
- Nishiguchi, Y., Abe, F., & Okada, M. (2011). Different pressure resistance of lactate dehydrogenases from hagfish is dependent on habitat depth and caused by tetrameric structure dissociation. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 13(2), 137–141. doi:10.1007/s10126-010-9299-6
- Nishiguchi, Y., Miwa, T., & Abe, F. (2008). Pressure-adaptive differences in lactate dehydrogenases of three hagfishes: *Eptatretus burgeri*, *Paramyxine atami* and *Eptatretus okinoseanus*. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 12(3), 477–480. doi:10.1007/s00792-008-0140-3
- Nishiyama, M., & Sowa, Y. (2012). Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. *Biophysical Journal*, 102(8), 1872–1880. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.033
- Nishiyama, M., Sowa, Y., Kimura, Y., Homma, M., Ishijima, A., & Terazima, M. (2013). High hydrostatic pressure induces counterclockwise to clockwise reversals of the *Escherichia coli* flagellar motor. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1809–1814. doi:10.1128/JB.02139-12
- Nogi, Y., Hosoya, S., Kato, C., & Horikoshi, K. (2007). *Psychromonas hadalis* sp. nov., a novel piezophilic bacterium isolated from the bottom of the Japan Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 6), 1360–1364. doi:10.1099/ijs.0.64933-0
- Northrop, D. B. (2002). Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1595(1-2), 71–79.
- Nucci, N. V., Fuglestad, B., Athanasoula, E. A., & Wand, A. J. (2014). Role of cavities and hydration in the pressure unfolding of T4 lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), 13846–13851. doi:10.1073/pnas.1410655111
- Nunoura, T., Akihara, S., Takai, K., & Sako, Y. (2002). *Thermaerobacter nagasakiensis* sp. nov., a novel aerobic and extremely thermophilic marine bacterium. *Archives of Microbiology*, 177(4), 339–344.
doi:10.1007/s00203-002-0398-2
- Occhipinti, E., Bec, N., Gambirasio, B., Baietta, G., Martelli, P. L., Casadio, R., et al. (2006). Pressure and temperature as tools for investigating the role of individual non-covalent interactions in enzymatic reactions *Sulfolobus solfataricus* carboxypeptidase as a model enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(3), 563–572. doi:10.1016/j.bbapap.2005.12.007
- Oger, P. M., & Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Research in Microbiology*, 161(10), 799–809. doi:10.1016/j.resmic.2010.09.017
- Ohshima, T., Nunoura-Kominato, N., Kudome, T., & Sakuraba, H. (2001). A novel hyperthermophilic archaeal glyoxylate reductase from *Thermococcus litoralis*. Characterization, gene cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(17), 4740–4747.
- Painter, J., & Merritt, E. A. (2006). Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 62(4), 439–450.
doi:10.1107/S0907444906005270/sx5049sup1.pdf
- Palumbo, S. L., Ebbinghaus, S. W., & Hurley, L. H. (2009). Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-

- quadruplex-interactive ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 131(31), 10878–10891. doi:10.1021/ja902281d
- Park, E., Ménétret, J.-F., Gumbart, J. C., Ludtke, S. J., Li, W., Whynot, A., et al. (2014). Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature*, 506(7486), 102–106. doi:10.1038/nature12720
- Pierson, B. K., & Castenholz, R. W. (1974). A Phototrophic Gliding Filamentous Bacterium of Hot Springs, *Chloroflexusaurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology*, 100, 1–20.
- Pressure inactivation of tetrameric lactate dehydrogenase homologues of confamilial deep-living fishes. (2014). Pressure inactivation of tetrameric lactate dehydrogenase homologues of confamilial deep-living fishes. *J Comp Physiol B*, 1–6.
- Prigozhin, M. B., Liu, Y., Wirth, A. J., Kapoor, S., Winter, R., Schulten, K., & Gruebele, M. (2013). Misplaced helix slows down ultrafast pressure-jump protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8087–8092. doi:10.1073/pnas.1219163110
- Quinlan, R. J., & Reinhart, G. D. (2005). Baroresistant buffer mixtures for biochemical analyses. *Analytical Biochemistry*, 341(1), 69–76. doi:10.1016/j.ab.2005.03.002
- Rivalain, N., Roquain, J., & Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28(6), 659–672. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.001
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. doi:10.1093/nar/gku316
- Roche, J., Caro, J. A., Norberto, D. R., Barthe, P., Roumestand, C., Schlessman, J. L., et al. (2012). Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(18), 6945–6950. doi:10.1073/pnas.1200915109
- Roche, J., Dellarole, M., Caro, J. A., Norberto, D. R., Garcia, A. E., Garcia-Moreno, B., et al. (2013). Effect of internal cavities on folding rates and routes revealed by real-time pressure-jump NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 135(39), 14610–14618. doi:10.1021/ja406682e
- Rosenbaum, E., Gabel, F., Durá, M. A., Finet, S., Clery-Barraud, C., Masson, P., & Franzetti, B. (2012). Effects of hydrostatic pressure on the quaternary structure and enzymatic activity of a large peptidase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 517(2), 104–110. doi:10.1016/j.abb.2011.07.017
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. doi:10.1038/35059215
- Rouget, J.-B., Aksel, T., Roche, J., Saldana, J.-L., Garcia, A. E., Barrick, D., & Royer, C. A. (2011). Size and sequence and the volume change of protein folding. *Journal of the American Chemical Society*, 133(15), 6020–6027. doi:10.1021/ja200228w
- Royer, C. A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1595(1-2), 201–209.
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., et al. (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1464. doi:10.1126/science.1153600
- Sheldrick, G. M. (2010). Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 4), 479–485. doi:10.1107/S0907444909038360
- Skouri-Panet, F., Quevillon-Cheruel, S., Michiel, M., Tardieu, A., & Finet, S. (2006). sHSPs under temperature and pressure: the opposite behaviour of lens alpha-crystallins and yeast HSP26. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1764(3), 372–383. doi:10.1016/j.bbapap.2005.12.011
- Snell, K., Natsumeda, Y., & Weber, G. (1987). The modulation of serine metabolism in epatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture. *The Biochemical Journal*, 1–4.
- Somero, G. N. (1992). Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annual Review of Physiology*, 54, 557–577. doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.003013
- Struvay, C., Negro, S., Matagne, A., & Feller, G. (2013). Energetics of protein stability at extreme environmental temperatures in bacterial trigger factors. *Biochemistry*, 52(17), 2982–2990. doi:10.1021/bi4002387
- Takahashi, S., & Sugimoto, N. (2013). Effect of pressure on thermal stability of g-quadruplex DNA and double-stranded DNA structures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(11), 13297–13319. doi:10.3390/molecules181113297
- Takai, K., Inoue, A., & Horikoshi, K. (1999). *Thermaerobacter marianensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic extremely thermophilic marine bacterium from the 11,000 m deep Mariana Trench. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 2, 619–628.
- Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shimamura, S., & Takaki, Y. (2004). Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, 8(5), 351–356. doi:10.1007/s00792-004-0394-3
- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D., & Girard, E. (2014). An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Frontiers in Microbiology*, 5, 66. doi:10.3389/fmicb.2014.00066

- Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B. Z., Giudici-Orticoni, M.-T., et al. (2004). Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Reports*, 5(1), 66–70. doi:10.1038/sj.embor.7400049
- Theobald, D. L., & Steindel, P. A. (2012). Optimal simultaneous superpositioning of multiple structures with missing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(15), 1972–1979. doi:10.1093/bioinformatics/bts243
- Togashi, F., Yamaguchi, S., Kihara, M., Aizawa, S. I., & Macnab, R. M. (1997). An extreme clockwise switch bias mutation in fliG of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in motA and motB. *Journal of Bacteriology*, 179(9), 2994–3003.
- Unsworth, L. D., Van Der Oost, J., & Koutsopoulos, S. (2007). Hyperthermophilic enzymes--stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *Febs Journal*, 274(16), 4044–4056. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05954.x
- Vagin, A., & Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1), 22–25. doi:10.1107/S0907444909042589
- Van Acker, K. J. (2007). Hyperoxaluria with hyperglycoluria not due to alanine:glyoxylate aminotransferase defect: A novel type of primary hyperoxaluria , 1–6.
- van den Bedem, H., Bhabha, G., Yang, K., Wright, P. E., & Fraser, J. S. (2013). Automated identification of functional dynamic contact networks from X-ray crystallography. *Nature Methods*, 10(9), 896–902. doi:10.1038/nmeth.2592
- van den Bedem, H., Dhanik, A., Latombe, J. C., & Deacon, A. M. (2009). Modeling discrete heterogeneity in X-ray diffraction data by fitting multi-conformers. *Acta Cryst (2009)*. D65, 1107–1117 [Doi:10.1107/S0907444909030613], 1–11. doi:10.1107/S0907444909030613
- Vannier, P. (2012, December 6). *Bases génomiques, protéomiques et transcriptomiques de l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques de l'archée hyperthermophile: Thermococcus barophilus*. Université de Bretagne Occidentale.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 65(1), 1–43. doi:10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001
- Visser, M., Worm, P., Muyzer, G., Pereira, I. A. C., Schaap, P. J., Plugge, C. M., et al. (2013). Genome analysis of *Desulfotomaculum kuznetsovii* strain 17(T) reveals a physiological similarity with *Pelotomaculum thermopropionicum* strain SI(T). *Standards in Genomic Sciences*, 8(1), 69–87. doi:10.4056/signs.3627141
- Wakai, N., Takemura, K., Morita, T., & Kitao, A. (2014). Mechanism of deep-sea fish α -actin pressure tolerance investigated by molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*, 9(1), e85852. doi:10.1371/journal.pone.0085852
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*, 8(2), 127–134.
- Welch, T. J., Farewell, A., Neidhardt, F. C., & Bartlett, D. H. (1993). Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *Journal of Bacteriology*, 175(22), 7170–7177.
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 112, 531–552.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4), 235–242. doi:10.1107/S0907444910045749
- Winter, R., & Jeworrek, C. (2009). Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*, 5(17), 3157. doi:10.1039/b901690b
- Yayanos, A. A. (1986). Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9542–9546.
- Yoshikawa, S., Arai, R., Kinoshita, Y., Uchikubo-Kamo, T., Wakamatsu, T., Akasaka, R., et al. (2007). Structure of archaeal glyoxylate reductase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 complexed with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Acta Cryst (2007)*. D63, 357–365 [Doi:10.1107/S0907444906055442], 1–9. doi:10.1107/S0907444906055442
- Zeng, X., Birrien, J.-L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J., et al. (2009). *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME Journal*, 3(7), 873–876. doi:10.1038/ismej.2009.21
- Zwart, P. H. (2005). Anomalous signal indicators in protein crystallography. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 61(11), 1437–1448. doi:10.1107/S0907444905023589

ANNEXE

9.1. Annexe chapitre 4 : Alignement des séquences de glyoxylate-hydroxypyruvate réductases

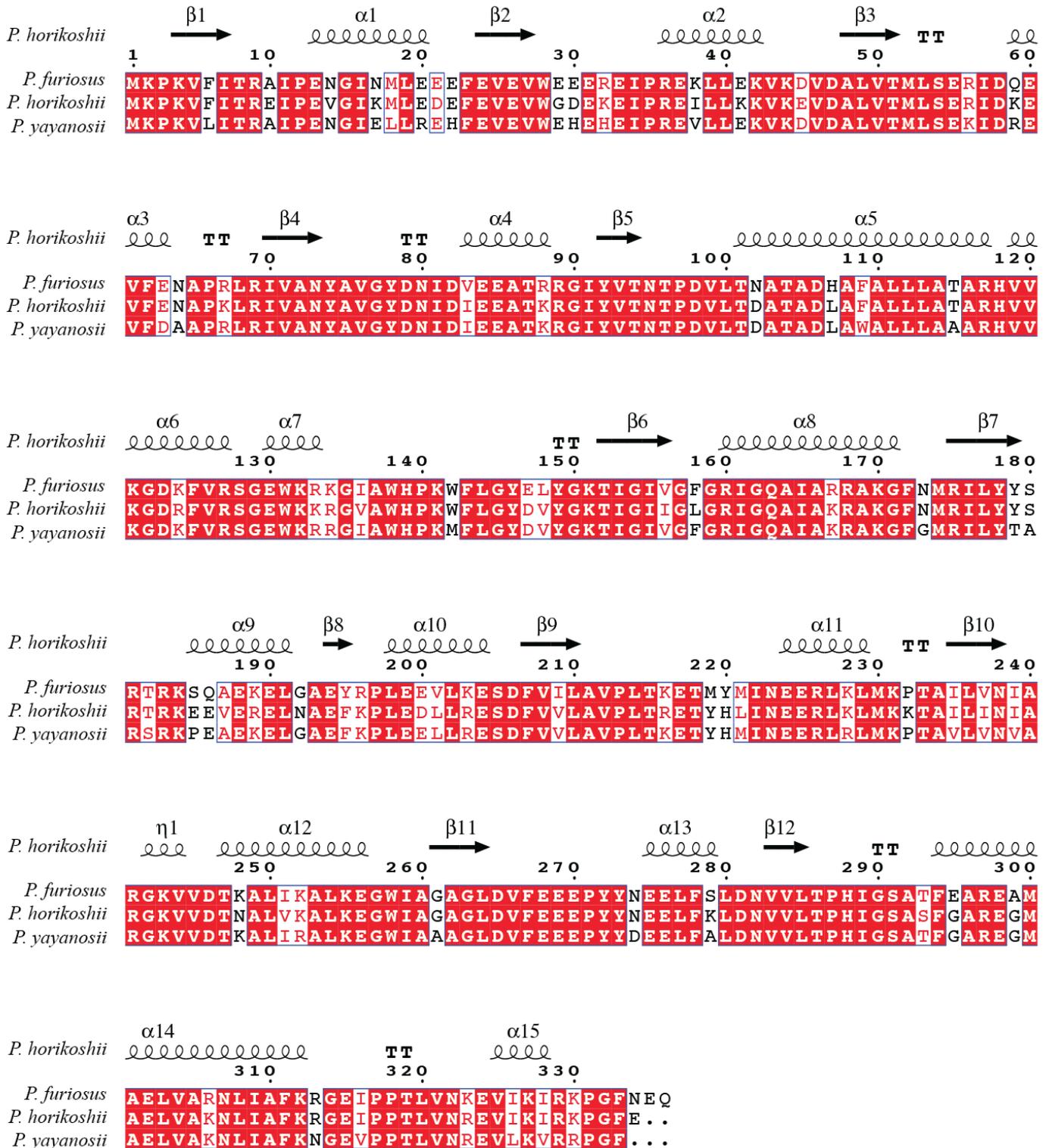
Les alignements de séquences ont été réalisés avec le programme CLUSTALW2 (Larkin et al., 2007). La présentation de l'alignement a été améliorée avec EXPASY (Robert & Gouet, 2014) et nous a permis d'ajouter les indications de structures secondaires à partir de la structure de PhoGRHPR (CODE PDB : 2DBQ) (Yoshikawa et al., 2007). Pour plus de lisibilité, un alignement de séquence a été fait pour chaque problématique.

Annexe 4.1 : Alignement des séquences des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii*.

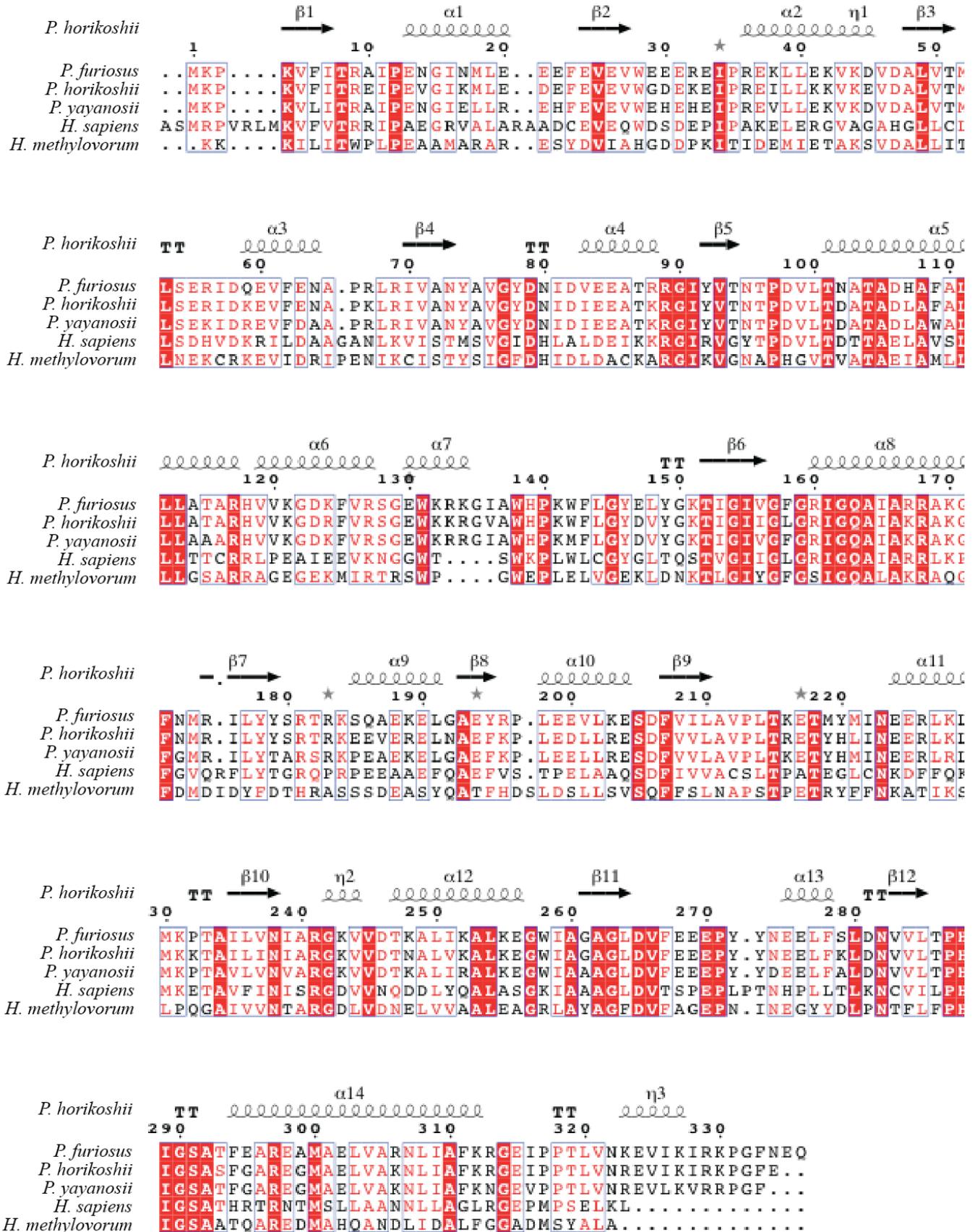
Annexe 4.2 : Alignement des séquences des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *P. yayanosii*, *H. methylovorum*, et *H. sapiens*.

Annexe 4.3 : Alignement des séquences des GRHPR de *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *P. yayanosii*, *M. hydrothermalis*, *T. thermophilus*, *T. litoralis*, *H. methylovorum*, *S. acidophilus* et *H. sapiens*.

Annexe 4.1



Annexe 4.2



Annexe 4.3

	1	10	20	30	40	50
<i>H. methylovorum</i>KKKI	LITWPLPEEAMAR.	AR.ESYDVI	AHGDDPKITIDE	MIETAKSV	DALLIT
<i>H. sapiens</i>	ASMRPVR	LKVFVTRR	IPAEGRVAL	ARAADCE	VEQWDSDE	PIPAKE
<i>S. acidophilus</i>MAD	IVVTRK	IAPVALKE.	LE.SVGT	VKLWEE	DRSISPAV
<i>T. litoralis</i>MKP	KVFITRQ	IPENGIKM.	IE.KFYE	IELWKDP	KAPPRGV
<i>P. yayanosii</i>MKP	KVLI	TRAI	PENGIEL.	LR.EHFE	VEVWEHEHEI
<i>P. furiosus</i>MKP	KVFITRA	IPENGINM.	LE.EEFE	VEVVEEERE	IPREK
<i>P. horikoshii</i>MKP	KVFITRE	IPVGIKM.	LE.DEFE	VEVWGDEKE	IPREI
<i>M. hydrothermalis</i>MK	RVFVTRN	LPGNALER.	LRAAGYA	VEVWPEFL	PPPREV
<i>T. thermophilus</i>M	RVFVTR	LP	GKALDR.	LRRERGLQ	VEVHRGLFLP

	60	70	80	90	100	110
<i>H. methylovorum</i>	LNEKCRK	EVIDRIPEN	IKCISTYS	IGFDHIDL	DACKARGIK	VGNAPHG
<i>H. sapiens</i>	LSDHVDK	RILDAAGAN	LKVISTYS	VGIDHLAL	DEIKKRGIR	VGYTPD
<i>S. acidophilus</i>	LTDPIDD	TLASAPR	LRIVANMA	VGYDNIDV	KAAATRRKI	AVTNTPD
<i>T. litoralis</i>	VTDKVDK	ELLENA.	PKLKI	IAQYAVGY	DNIDIEE	ATKRGIV
<i>P. yayanosii</i>	LSEKIDR	EVFDAA.	PRLRIVANY	AVGYDNID	IEEATKRGIV	VTNTPD
<i>P. furiosus</i>	LSERIDQ	EVFENA.	PRLRIVANY	AVGYDNID	VEEATRRGI	YVTNTPD
<i>P. horikoshii</i>	LSERIDK	EVFENA.	PKLRIVANY	AVGYDNID	IEEATKRGIV	VTNTPD
<i>M. hydrothermalis</i>	VEDQVD	ADLEAAG	PD	LK	VIAQYAVGY	DNIDLEA
<i>T. thermophilus</i>	VEDRID	A	EVMDRA.	KG	LK	VIACYS

	120	130	140	150	160
<i>H. methylovorum</i>	LLGSARR	AGEGK	IRTRS	WP...G	WEPLEIV
<i>H. sapiens</i>	LLTTCRR	LP	EAI	EEV	KNGGWT...
<i>S. acidophilus</i>	LLALLRG	VLS	SSHQAL	RQGA	MD...G
<i>T. litoralis</i>	LLAVARR	IV	EADAF	VRSGE	WKKSEV
<i>P. yayanosii</i>	LLAARHV	V	KGDKF	VRSGE	WKKRGIA
<i>P. furiosus</i>	LLATARH	V	KGDKF	VRSGE	WKKRGIA
<i>P. horikoshii</i>	LLATARH	V	KGDKF	VRSGE	WKKRGIA
<i>M. hydrothermalis</i>	LAAVARR	V	EGAA	YVREGK	WR...T
<i>T. thermophilus</i>	LLAVARR	V	EGAA	YVREGK	WR...T

	170	180	190	200	210	220
<i>H. methylovorum</i>	FDM.D	IDYFD	THRASS	SDEASYQ	ATFH	DSL
<i>H. sapiens</i>	FGVQR	FLY	TGR	QPRPE.	EAAEFQ	AEF.V
<i>S. acidophilus</i>	FHM.P	VIALA	SDR.	AR.P	DDGIG	IKR.
<i>T. litoralis</i>	FGM.K	I	IY	SRT	KPE.	A
<i>P. yayanosii</i>	FGM.R	I	L	Y	S	R
<i>P. furiosus</i>	FNM.R	I	L	Y	S	R
<i>P. horikoshii</i>	FNM.R	I	L	Y	S	R
<i>M. hydrothermalis</i>	FGM.R	I	L	Y	S	R
<i>T. thermophilus</i>	FGM.R	I	L	Y	S	R

	230	240	250	260	270	280
<i>H. methylovorum</i>	S	LP	Q	GA	I	V
<i>H. sapiens</i>	K	M	K	E	T	A
<i>S. acidophilus</i>	D	M	K	P	G	A
<i>T. litoralis</i>	L	M	K	P	N	A
<i>P. yayanosii</i>	L	M	K	P	T	A
<i>P. furiosus</i>	L	M	K	P	T	A
<i>P. horikoshii</i>	L	M	K	P	T	A
<i>M. hydrothermalis</i>	L	M	K	P	T	A
<i>T. thermophilus</i>	L	M	K	P	T	A

	290	300	310	320
<i>H. methylovorum</i>	HIGSA	A	T	Q
<i>H. sapiens</i>	HIGSA	T	H	R
<i>S. acidophilus</i>	HIGSA	T	R	E
<i>T. litoralis</i>	HIGSA	T	R	E
<i>P. yayanosii</i>	HIGSA	T	R	E
<i>P. furiosus</i>	HIGSA	T	R	E
<i>P. horikoshii</i>	HIGSA	T	R	E

9.2. Annexe chapitre 5 : Courbes d'activités spécifiques des glyoxylate-hydroxypyruvate réductases en fonction de la pression

Les courbes correspondant à l'enzyme PfuGRHPR sont en vert, celles de PhoGRHPR en rouge et celle de PyaGRHPR en bleu.

Annexe 5.1: Courbes d'activités en fonction de la pression pour les 3 GRHPR. Les courbes sont représentées en fonction de la température puis des regroupées pour chaque substrat à 25 et 50 °C.

Annexe 5.2 : Courbes d'activités en fonction de la pression pour les 3 GRHPR. Les courbes sont regroupées pour chaque cofacteur à 25 et 50 °C.

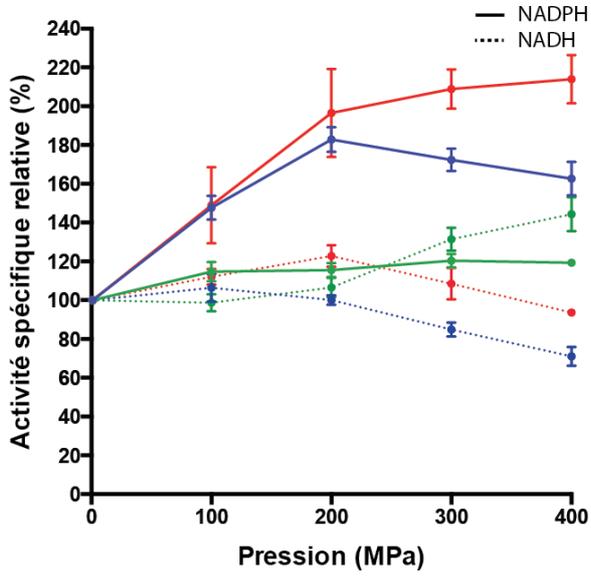
Annexe 5.3: Courbes d'activités en fonction de la pression. Les courbes sont regroupées pour chaque enzyme et chaque substrat.

Annexe 5.4: Courbes d'activités en fonction de la pression. Les courbes sont regroupées pour chaque enzyme et chaque substrat.

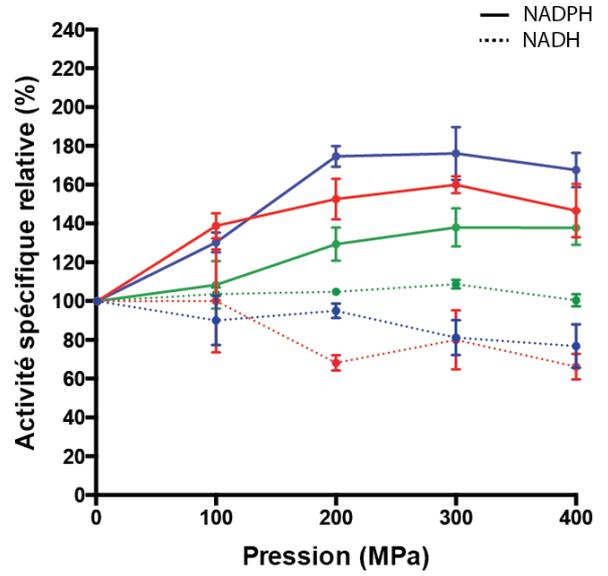
Annexe 5.1

A 25 °C

(A) En présence d'hydroxypyruvate

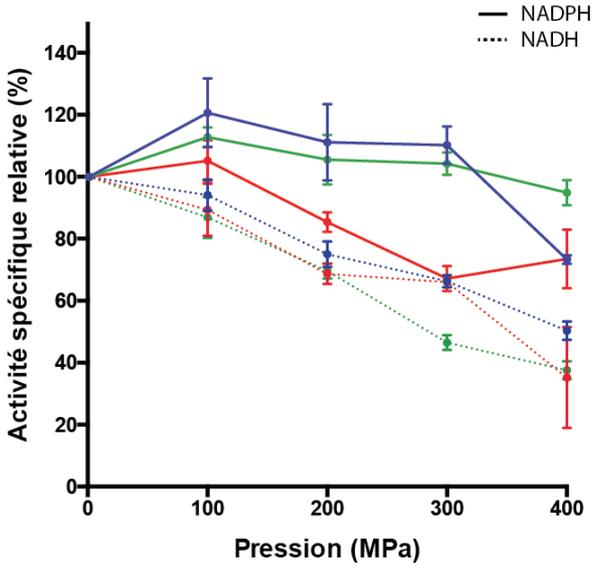


(B) En présence de glyoxylate

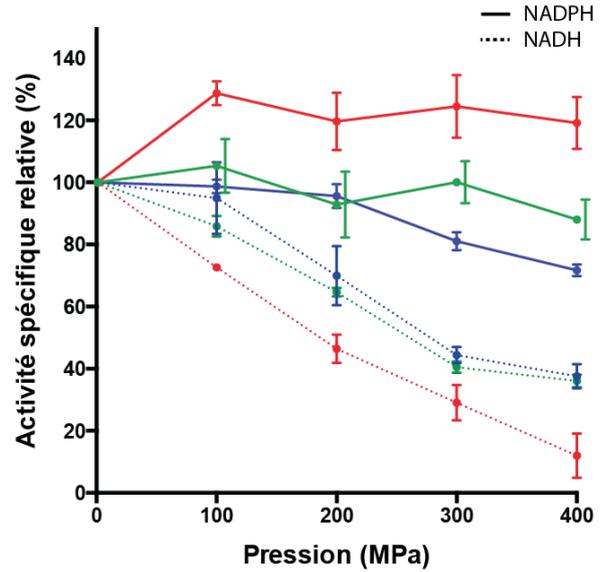


A 50 °C

(A) En présence d'hydroxypyruvate



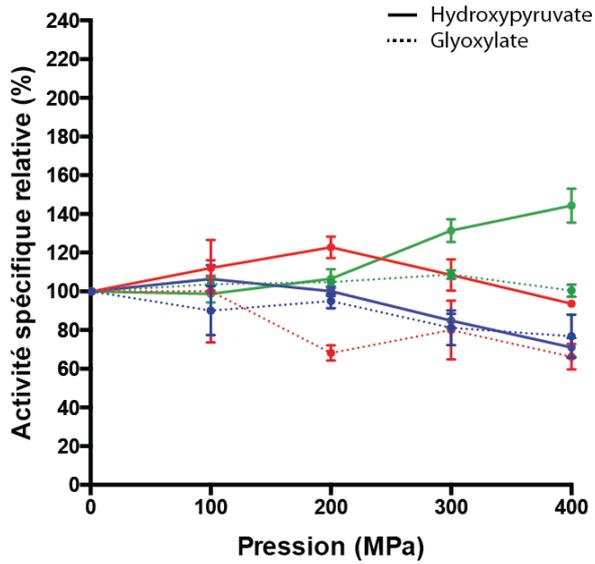
(B) En présence de glyoxylate



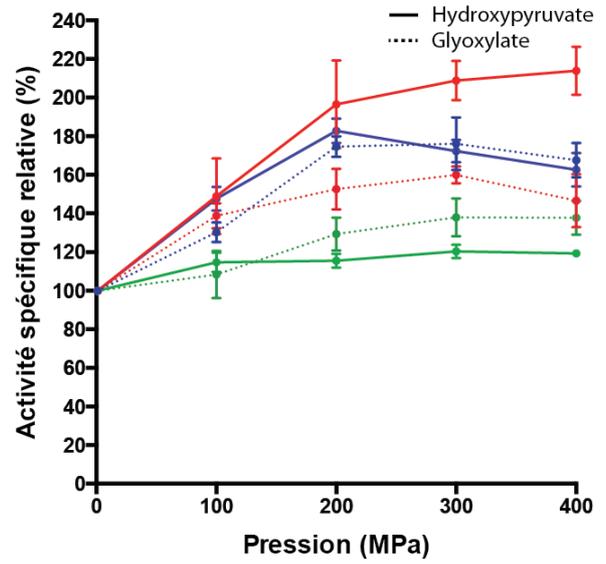
Annexe 5.2

A 25 °C

(A) En présence de NADH

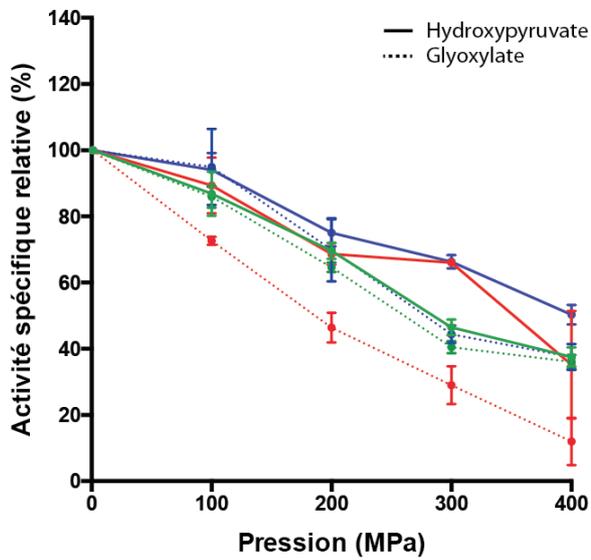


(B) En présence de NADPH

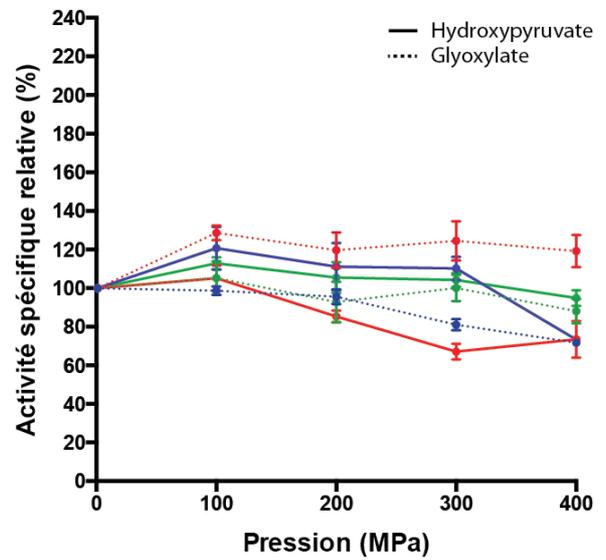


A 50 °C

(A) En présence de NADH



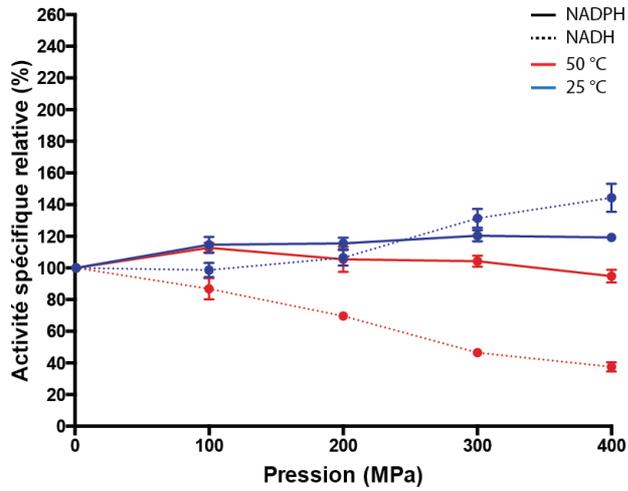
(B) En présence de NADPH



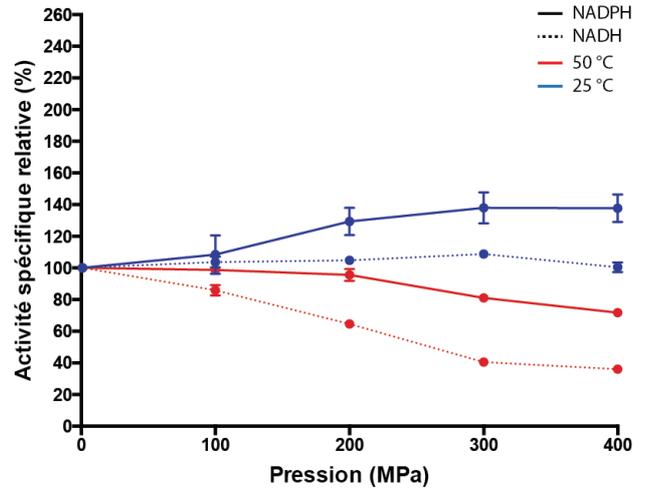
Annexe 5.3

PfuGRHPR

(A) En présence d'hydroxypyruvate

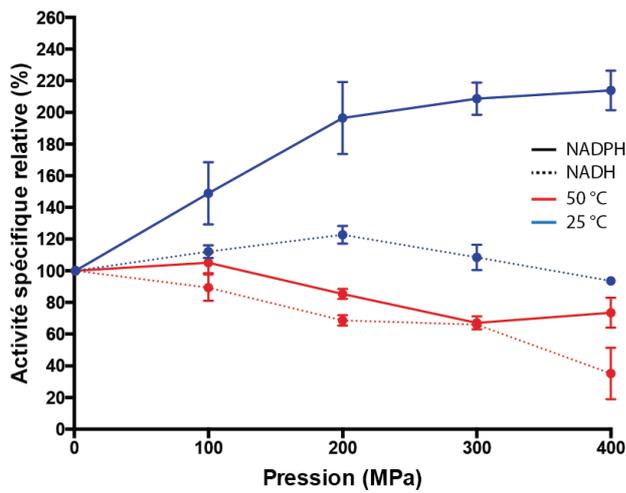


(B) En présence de glyoxylate

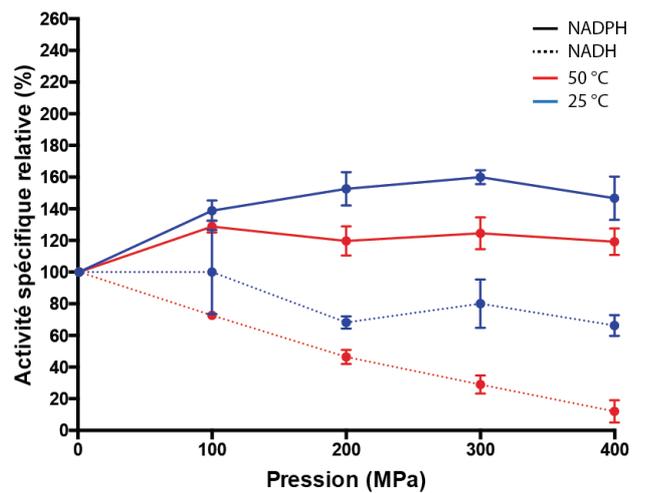


PhoGRHPR

(A) En présence d'hydroxypyruvate

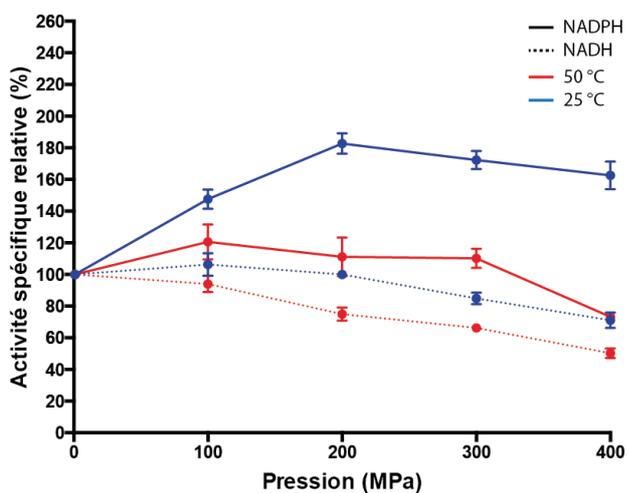


(B) En présence de glyoxylate

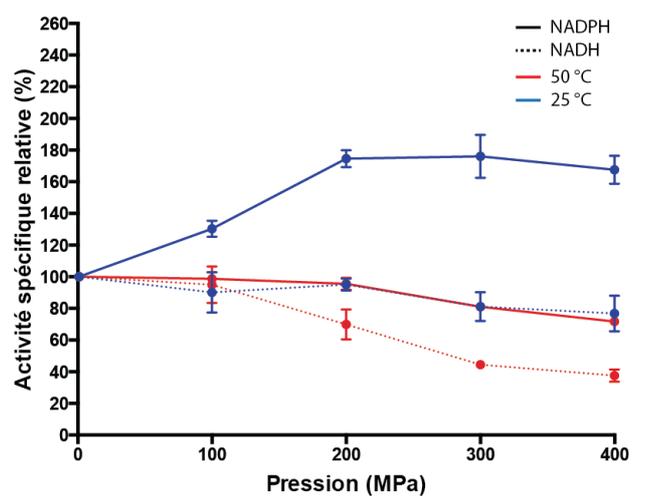


PyagrHPR

(A) En présence d'hydroxypyruvate

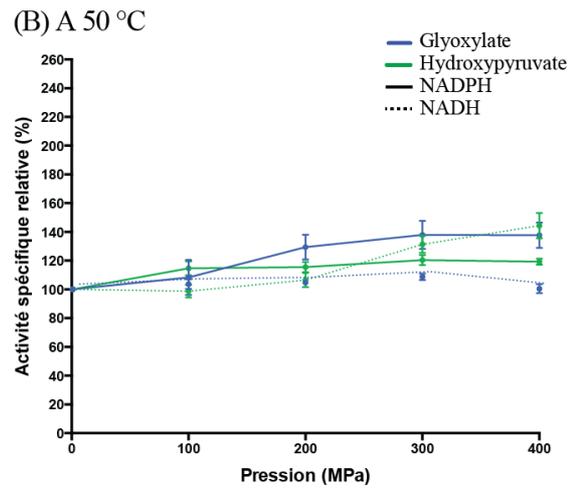
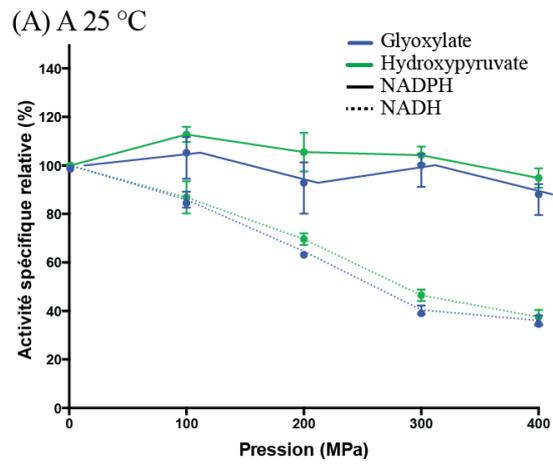


(B) En présence de glyoxylate

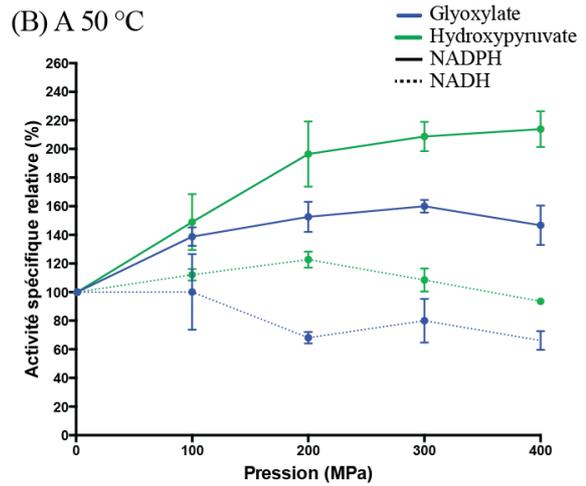
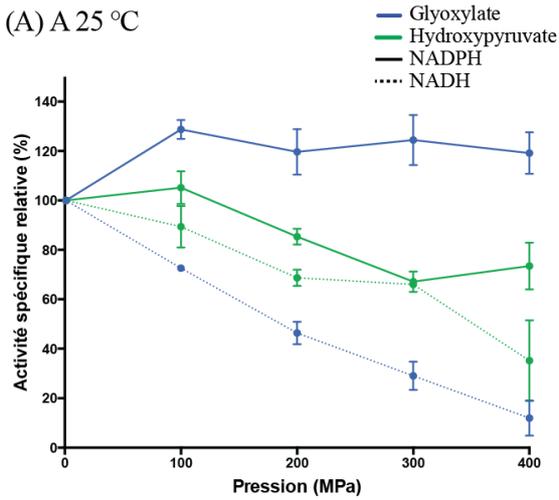


Annexe 5.4

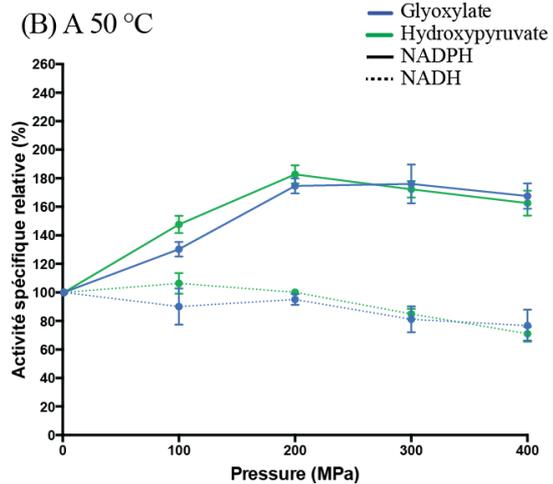
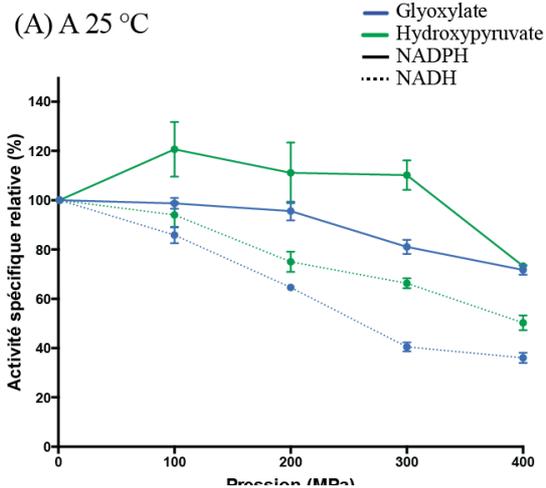
PfuGRHPR



PhoGRHPR



PyaGRHPR



9.3. Annexe chapitre 6 : Alignement des séquences des malate déshydrogénases

Les alignements de séquences ont été réalisés avec le programme CLUSTALW2 (Larkin et al., 2007). La présentation de l'alignement a été améliorée avec EXPASY (Robert & Gouet, 2014) et nous a permis d'ajouter les indications de structures secondaires à partir de la structure de CauMDH (CODE PDB : 4CL3) (Talon et al., 2014). Pour plus de lisibilité, un alignement de séquence a été fait pour chaque problématique.

Annexe 6.1 : Alignement des séquences des MDH de *Chloroflexus aurantiacus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Thermaerobacter nagasakiensis*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Thermaerobacter marianensis* et *Geobacillus kaustophilus*.

Annexe chapitre 6 : Arbre phylogénétique des MDH tétramériques présentes chez les *Firmicutes*

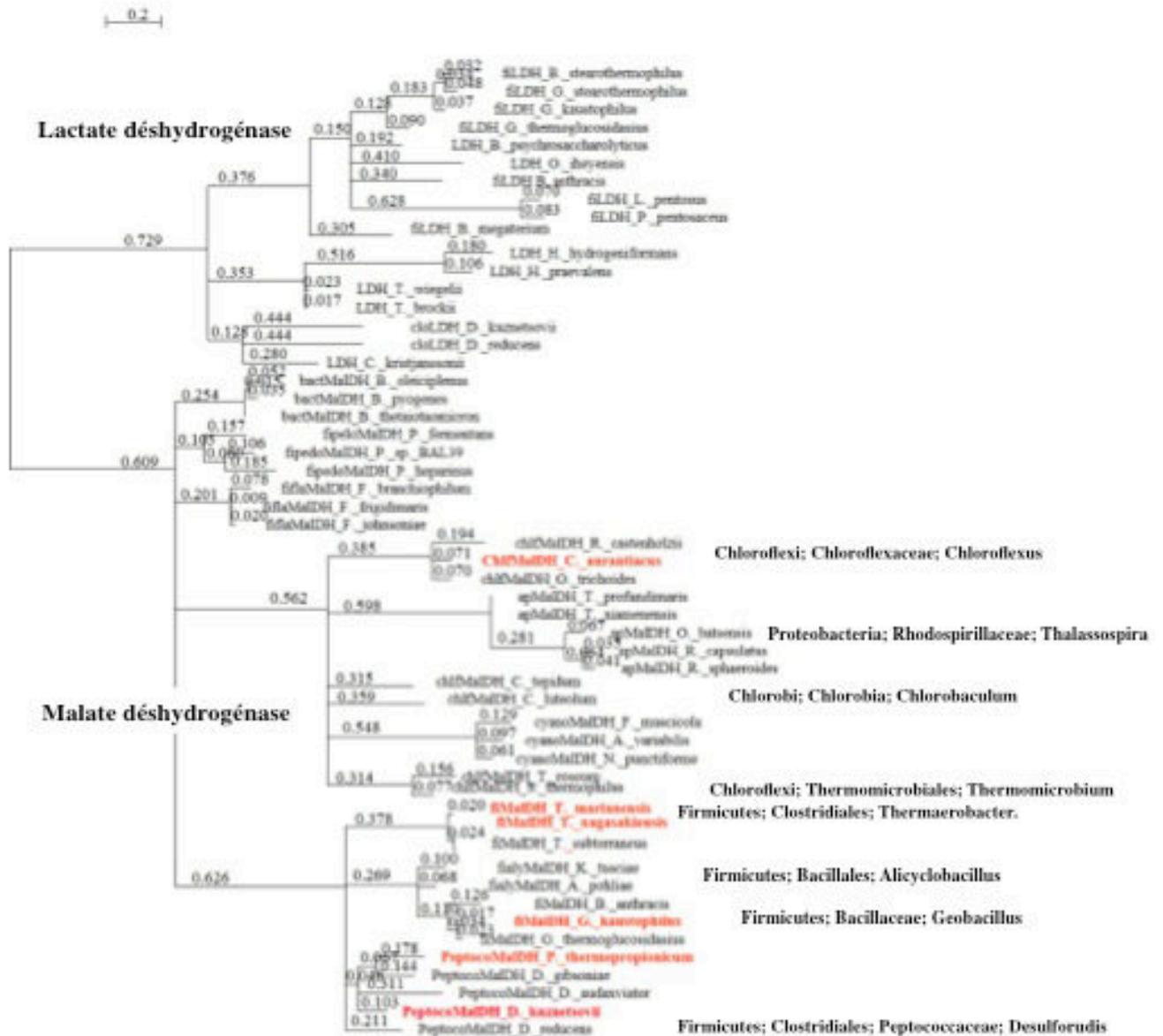
Méthodologie suivie pour obtenir l'arbre phylogénétique présenté ci-dessous.

36 séquences de malate déshydrogénases ont ainsi été sélectionnées ainsi que 17 lactate déshydrogénase afin d'agir comme groupe extérieur dans le but de produire un arbre de séquences enraciné.

Un alignement a été construit avec le logiciel MUSCLE, il correspond à 342 positions. Un tri des sites informatifs a été effectué avec le logiciel G-Block, ce qui a réduit le nombre de sites à 221 positions. La parenté a été analysée par Maximum de vraisemblance en utilisant PhyML et plusieurs matrices de substitutions. L'arbre de gènes ainsi obtenu est représenté sur la figure suivante. Les valeurs de confiance aux nœuds de divergence ne sont pas portées sur la figure. Les appariements sont condensés et en conséquence uniquement les branches qui ont des scores supérieurs à 0,8 sont visibles. Les séquences en rouge sont celles qui ont été choisies sur la base de leurs habitats pour les études expérimentales de la thèse. Les valeurs indiquent la distance aux branches.

Le tableau indique les valeurs de distance entre différents couples de séquences.

Annexe 6.2



<i>T. marianensis</i> / <i>C. aurantiacus</i>	: 2,04
<i>T. marianensis</i> / <i>G. kaustophilus</i>	: 0,811
<i>T. marianensis</i> / <i>P. thermopropionicum</i>	: 0,691
<i>T. marianensis</i> / <i>D. kuznetsovii</i>	: 0,549
<i>T. marianensis</i> / <i>T. nagasakiensis</i>	: 0,044
<i>G. kaustophilus</i> / <i>D. kuznetsovii</i>	: 0,581
<i>G. kaustophilus</i> / <i>P. thermopropionicum</i>	: 0,706
<i>P. thermopropionicum</i> / <i>D. kuznetsovii</i>	: 0,396

Abstract

The recent discovery of marine biodiversity shows that a large part of the biosphere is a high-pressure environment. The existence of a specific pressure adaptation is still an open question. Recently, the first obligate piezophilic hyperthermophilic microorganism was isolated from hydrothermal vent. This finding suggests the existence of a specific enzyme adaptation with respect to high pressure.

To deeper understanding protein adaptation with respect to high pressure, we examine the enzymatic properties of two family enzymes, malate dehydrogenases and glyoxylate hydroxypyruvate reductases arising from piezophilic and non-piezophilic organisms.

Using an integrated approach combining enzymology, biophysics and X-ray crystallography, we reveal significantly different behaviors with respect to high pressure. Our analysis shows that these differences involved the dynamic component of the enzyme. These results suggest that pressure could be a discriminating parameter susceptible to induce an adaptative response.

This thesis work allows setting the foundations of a protein-properties comparative method with respect to high pressure to reveal piezophilic adaptation in other protein systems.

Résumé

L'exploration récente des fonds marins a révélé l'existence d'une vie microbienne abyssale bien plus diverse et abondante que l'état de nos connaissances sur les limites du vivant ne le laissait penser. Ainsi on estime que plus de 60 % de la biosphère subit des conditions de pression jugées *a priori* défavorable au fonctionnement de la machinerie cellulaire. Ces pressions peuvent atteindre 1000 bars dans les fosses sous-marines les plus profondes. La découverte récente de *Pyrococcus yayanosii* CHI, premier organisme hyperthermophile et piézophile strict, a relancé la question de l'adaptation aux fortes pressions.

Au cours de cette thèse cette question de l'adaptation à la haute pression a été abordée à travers les protéines par l'étude de deux familles spécifiques, les malate déshydrogénases et les glyoxylate hydroxypyruvate réductases, provenant d'organismes piézophiles et non piézophiles.

Les études comparatives associant enzymologie, biophysique et cristallographie des protéines présentées dans cette thèse révèlent des différences de comportements significatives vis à vis de la pression, chez des protéines d'une même famille spécifique. Nos analyses montrent que ces différences portent sur différents aspects de la dynamique fonctionnelle des protéines. Nous montrons donc ainsi que la pression peut "potentiellement" représenter un paramètre discriminant susceptible de faire l'objet d'une adaptation.

Le travail réalisé a permis de poser les bases d'une méthode de comparaison exhaustive des propriétés des protéines vis à vis de la pression afin de détecter les traces d'une adaptation piézophile sur d'autres systèmes protéiques.

