



# Etude de mécanismes moléculaires de l'évolution

Dominique Madern

► **To cite this version:**

Dominique Madern. Etude de mécanismes moléculaires de l'évolution. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier, 2008. <tel-01314230>

**HAL Id: tel-01314230**

**<http://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01314230>**

Submitted on 11 May 2016

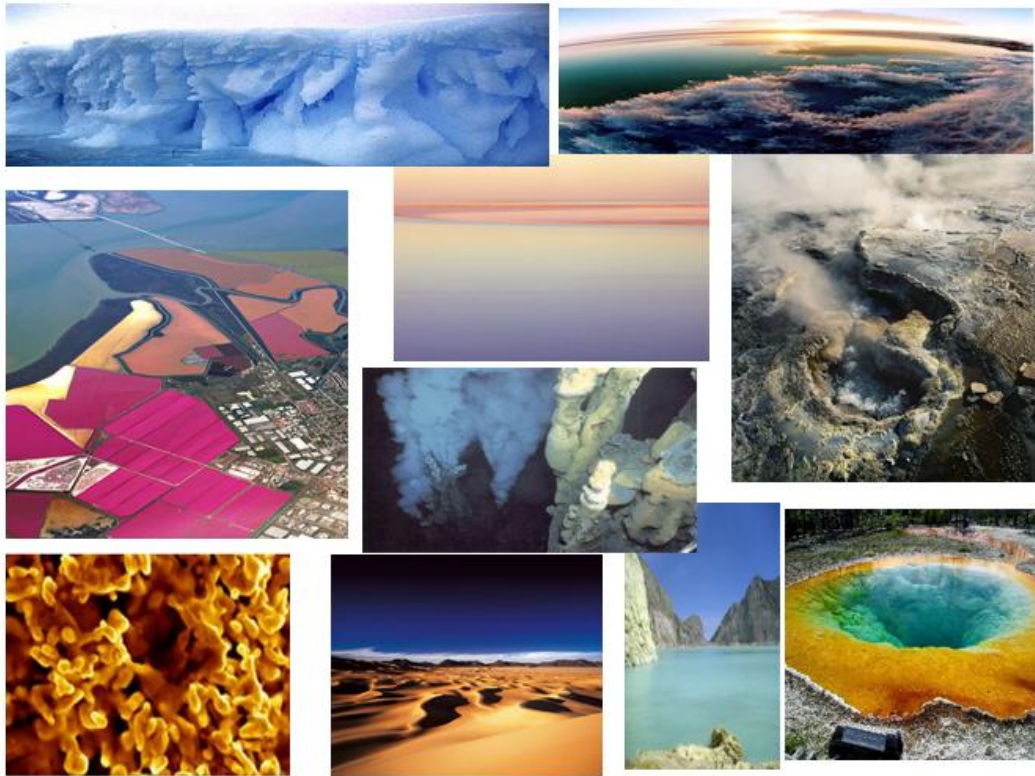
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

# Habilitation à diriger des recherches

Année 2007-2008

## Etude de mécanismes moléculaires de l'évolution



### **Dr Dominique MADERN**

Institut de Biologie Structurale CEA CNRS UJF, UMR 5075, 41 Rue Jules Horowitz,  
38027 Grenoble

### **Membres du Jury :**

Pr. Chantal Houée-Levin (Rapporteur), Dr Philippe Normand (Rapporteur), Pr Patrick Masson (Rapporteur), Dr Giuseppe Zaccai (Examineur), Pr Eva Pebay-Peyroula (Examineur)

Date de soutenance : 07 Juillet 2008

## Sommaire

- Curriculum vitae
  
- La famille des malates et lactates déshydrogénases comme modèle d'étude pour caractériser les mécanismes moléculaires de l'évolution :
  - Adaptation biochimique, structurale et dynamique des protéines halophiles
  - Stratégie d'étude prenant en compte la dimension évolutive
  - Base dynamique de l'adaptation
  - Adaptation thermique
  - Divergence et convergence adaptative
  - Adaptation au pH
  
- Projets de recherche ANR
  - Etudes des dommages induits par le rayonnement ionisant
  - Effet de la pression
  - Elaboration de Nano matériaux composites
  
- Caractérisation d'une nouvelle famille de déshydrogénase à large spectre de reconnaissance de substrats
  
- Caractérisation d'une protéine incorrectement repliée : un défi structural
  
- Conclusion
  
- Bibliographie

**Dominique MADERN**

4 Allée du roussillon

38130 Echirrolles

0476227160

0616128534

Institut de Biologie Structurale

41 Rue Jules Horowitz

38027 Grenoble

0438789571

Ingénieur de recherche 1<sup>ère</sup> classe CNRS

**Etat civil :**

Né le 28 Décembre 1960

Marié, 1 enfant

**Formation :**

1980. DUT de Chimie

1998. Au cours de ma carrière j'ai suivi un cheminement qui ne relève pas exactement du parcours académique traditionnel. Ceci m'a permis, d'obtenir la dispense de DEA au titre de la validation des acquis professionnels en vue de l'inscription pour un Doctorat. Premier exemple en France dans une université scientifique.

2000. Doctorat en Biologie à l'Université Joseph Fourier de Grenoble

« *Etudes des relations structure fonction, du repliement et de l'évolution au sein de la super famille des malates et lactates déshydrogénases* »

**Parcours scientifique :**

25 années d'expérience professionnelle dans l'univers des Sciences de la Vie au sein de trois laboratoires différents situés à Grenoble. Au Laboratoire de Biochimie et de Bioénergétique du CEA. Au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (EMBL). A l'Institut de Biologie Structurale (CNRS statutaire depuis 1991)

32 Publications scientifiques (liste jointe) dans des revues internationales de haut niveau (EMBO, PNAS) ainsi que dans des revues de références en biologie moléculaire (J. Mol. Biol., Biochemistry, Mol. Microbiol, JBC) et dans le domaine de l'évolution (J. Mol. Evol, Mol. Biol. Evol.)

Rédacteur, pour l'UNESCO, d'un chapitre de l'Encyclopedia of Life Support Systems sur l'adaptation moléculaire. Plusieurs présentations dans divers congrès internationaux

Membre de la SFBBM

### Publications internationales :

1. Coquelle N, Fioravanti E, Weil M, Vellieux FMD, **Madern D**. (2007) Activity, Stability and Structural Studies of Lactate Dehydrogenases Adapted to Extreme Thermal Environments. *J Mol Biol. J Mol Biol.* 374, 547-562
2. **Madern D**, Ebel C. (2007) Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochimie* 89, 981-987.
3. Grzela R, Szolajska E, Ebel C, **Madern D**, Favier A, Wojtal I, Zagorski W, Chroboczek J. (2007) Virulence factor of potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein. *J. Biol. Chem.* (sous presse)
4. Fioravanti E, Vellieux FMD, Amara P, **Madern D**, Weik M (2006) Specific radiation damage to acidic residues and its relation to their chemical and structural environment. *J. Synchrotron Radiat.* 14, 84-91.
5. Karlström M, Steen IH, **Madern D**, Fedöy A, Birkeland NK, Ladenstein R (2006) The crystal structure of a hyperthermostable subfamily II isocitrate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. *FEBS J.* 273, 2851-2868.
6. Gabel F, Wang D, **Madern D**, Sadler A, Dayie K, Daryoush MZ, Schwahn D, Zaccai G, Lee X, Williams BR. (2006) Dynamic flexibility of double-stranded RNA activated PKR in solution. *J Mol Biol.* 359, 610-623.
7. Fioravanti E, Vellieux FMD, **Madern D**, Weik M (2005) Lactate dehydrogenases from extremophile organisms: clues for radio-resistance? *Acta Cryst A* 61, C627
8. **Madern D**, Zaccai G (2004) Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie* 86, 295-303
9. **Madern D**, Irimia A, Zaccai G, Vellieux FMD (2004) Methanoarchaeal sulfolactate dehydrogenase: prototype of a new family of NADH-dependent enzymes. *EMBO J.* 23, 1234-1244.
10. **Madern D**, Camacho M, Rodríguez-Arnedo A, Bonete M.J, Zaccai G (2004) Salt dependent studies of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 8, 377-384

11. Tehei M, Franzetti B, **Madern D**, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Giudici-Ortoni MT, Bruschi M, Zaccai G (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Rep.* 5, 66-70.
12. **Madern D**, Cai X, Abrahamsen MS, Zhu G (2004) Evolution of *Cryptosporidium parvum* Lactate dehydrogenase from Malate dehydrogenase by a very recent event of gene duplication. *Mol. Biol. Evol.* 21, 489-497
13. Irimia A, Vellieux FMD, **Madern D**, Zaccai G, Tibbelin G, Ladenstein R, Lien T, Birkeland, NK (2004) The 2.9 Å resolution crystal structure of malate dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*: mechanisms of thermal stabilization and oligomerisation. *J. Mol. Biol.* 335, 343-356.
14. Irimia A, Ebel C, **Madern D**, Richard SB, Cosenza LW, Zaccai G, Vellieux FMD (2003) The oligomeric state of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies. *J. Mol. Biol.* 326, 859-873.
15. **Madern D** (2002) Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *J. Mol. Evol.* 54, 825-840.
16. Tehei M, **Madern D**, Pfister C, Zaccai G (2001) Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14356-14361.
17. **Madern D**, Ebel C, Dale HA, Lien T, Steen IH, Birkeland NK, Zaccai G (2001) Differences in the oligomeric states of the LDH-like L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry* 40, 10310-10306.
18. Steen IH, **Madern D**, Karlstrom M., Lien T, Ladenstein R, Birkeland NK (2001) Comparison of isocitrate dehydrogenase from three hyperthermophiles reveals differences in thermostability, cofactor specificity, oligomeric state, and phylogenetic affiliation. *J. Biol. Chem.* 276, 43924-43931.
19. Bernichtein S, Kinet S, Lovera M., **Madern D**, Kelly PA, Goffin V (2001) S179D-human PRL, a pseudophosphorylated human PRL analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology.* 142, 3950-3963.

20. **Madern D** (2000). The putative L-lactate dehydrogenase from *Methanococcus jannaschii* is a NADPH-dependent L-malate dehydrogenase. *Mol Microbiol.* 37, 1515-1520.
21. **Madern D**, Ebel C, Mevarech M., Richard S, Pfister C, Zaccai 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, 1001-1010.
22. Richard S, **Madern D**, Garcin E, Zaccai G. (2000) Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 Å and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 39, 992-1000.
23. **Madern D**, Ebel C, Zaccai G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-98.
24. **Madern D**, Zaccai G (1997) Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations. Effects of temperature, water isotope, co-factor and pH. *Eur. J. Biochem.* 249, 607-611.
25. Vuillard L, **Madern, D**, Franzetti B, Rabilloud T (1995) Halophilic protein stabilization by the mild-solubilizing agent nondetergent sulfobetaine. *Anal. Biochem.* 230, 290-294.
26. **Madern D**, Pfister C, Zaccai G (1995) Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur. J. Biochem.* 230, 1088-1095.
27. Bonneté F, **Madern D**, Zaccai G (1994) Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J. Mol. Biol.* 244, 436-447.
28. **Madern D**, Anselme J, Härtle M (1992) Asparaginyl tRNA synthetase from *E. Coli* temperature sensitive strain HO 202. A proline replacement in motif II is responsible for a large increase in  $K_M$  for Asparagine and ATP. *FEBS Lett.* 299, 85-89.
29. Härtle M, Frank R, **Madern D** (1987) Nucleotide sequence of *E.Coli* Valyl tRNA synthetase gene ValS. *Nucleic Acids Res.* 21, 9081-9082.

30. Härtle M, **Madern D** (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for *E.Coli* Leucyl tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.*15, 10199-10210.
31. Härtle M, **Madern D**, Leberman R (1987) Cloning and characterisation of the gene for *E.Coli* Seryl tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* 15, 1005-1017.
32. Willison JC, **Madern D**, Vignais P (1984) Increased hydrogen photoproduction, by non autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochem. J.* 219, 593-600.



## Collaborations

Institut Biologie Structurale :

Dr Frédéric Vellieux, Dr Martin Weik, Dr Guiseppe Zaccai, Dr Christine Ebel, Dr Richard Kahn, Dr Eric Girard, Pr Judith Peters, Pr Franck Fieschi.

Externe:

Dr Guan Zhu, College of Veterinary Medicine, USA

Pr Moshe Mevarech, Univesité Tel Aviv, Israël

Pr Nils-Kare Birkeland, Université de Bergen, Norvège

Dr Richard H. White, Virginia Polytechnic Institute, USA

Pr Chantal Houée Levin, Université Paris XI

Pr Claude Forano, Université de Clermont Ferrand

## Activité d'encadrement

J'ai encadré, avec des degrés d'implication divers, de nombreux étudiants de différents niveaux universitaires (BTS, Licence, Masters, Doctorats) et de différentes formations (biologiste et physicien). Dans le cadre des thèses d'étudiants provenant de la physique, mon activité d'encadrement est axée sur tout ce qui concerne les aspects thématiques et la formation des étudiants à l'univers de la biologie. Les aspects propres de la physique étant pris en charge par le deuxième responsable de la co-tutelle.

1993 :

- Mathias Faure, *Licence de Biochimie*. Grenoble

- Pierre Yon, *Ecole polytechnique*. Palaiseau

1994 :

-Sandrine Thiffine, *BTS biochimie*, Lycée Louise michèle, Grenoble

-Stéphane Richard, *DEA RMN et cristallographie biologique*, Grenoble

1996 :

- Christophe Vilain, DUT de chimie de Grenoble

- Virginie Deleplace, INPG de Grenoble

1997 :

-Géraldine Serre, *BTS anabiotech.* Moirans

1998 :

-Damien Navizet, *Ecole polytechnique*, Palaiseau

-Nathalie Fatigua, *BTS anabiotech.* Moirans

-Stéphane Richard, *Thèse UJF*, Grenoble (2 publications communes)

1999 :

-Adriana Irimia, *DEA RMN et cristallographie biologique*, Grenoble

2002 :

-Moeava Tehei, *thèse UJF*, Grenoble. (3 publications communes)

2003 :

-Adriana Irimia, *thèse UJF*, Grenoble. (3 publications communes)

2004 :

-Pascal Stuelsatz, *Master 1, Biologie cellulaire et intégrative*, Grenoble.

2005 :

-Said Hasnaoui, *Master 1 Physique*, Grenoble

-Nicolas Coquelle, *Master 2, physique*, Grenoble.

-Emanuela Fioravanti, *Post doctorante* (2 publications commune)

2006-2008

-Nicolas Coquelle, *Thèse UJF en cours*, Grenoble. (1 publication commune, + 2 en cours de rédaction)

-Sylvia Rohr, *Master 1 Physique*, Grenoble

## Activités scientifiques

Au cours de ma carrière j'ai travaillé sur différents projets au sein de divers établissements. Seule mon activité à l'Institut de Biologie Structurale est résumée.

La principale part de mon activité consiste à étudier les mécanismes fondamentaux de l'adaptation moléculaire des protéines aux conditions physico-chimiques dites extrêmes.

Ce dossier montre comment j'ai impulsé une nouvelle stratégie de recherche à partir de la thématique initiale du Laboratoire de Biophysique Moléculaire, en prenant en compte la dimension évolutive.

Les travaux initiaux du laboratoire étaient orientés vers la description des mécanismes de l'adaptation de protéines isolées des Archaea halophiles. En analysant un grand nombre de données biochimiques, structurales au regard du concept de l'évolution, j'ai pu établir l'existence d'une nouvelle famille enzymatique : les LDH-like Malate Déshydrogénase dont je suis devenu un référent :

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=cd01339>).

Toutes ces données ont été croisées à une étude phylogénétique qui m'a permis de décrire l'histoire évolutive de la super famille des malates (MalDH) et des lactates déshydrogénases (LDH). Cette famille est désormais considérée comme un vivier extrêmement riche pour trouver de nombreuses enzymes présentant des caractéristiques spécifiques d'adaptation à diverses contraintes physico-chimiques. Le dossier permet de voir que la combinaison de diverses méthodologies appliquées à l'étude de différentes enzymes (MalDH et LDH) permet de décortiquer en grands détails les mécanismes de l'adaptation. Les résultats obtenus font que cette famille enzymatique est une de celles qui est actuellement la mieux comprise en terme de relation repliement-structure-fonction-dynamique et évolution.

Dans une deuxième partie, j'exposerai brièvement, comment ma réflexion a permis d'aller vers la caractérisation d'une nouvelle famille de déshydrogénase qui présente un nouveau motif de repliement, différent des déshydrogénases connues jusqu'à présent. Je montrerai aussi qu'il est vraisemblablement possible d'aller sonder les propriétés structurales d'une protéine ayant échappé au contrôle du repliement.

## **A) La famille des malates et lactates déshydrogénases comme modèle d'étude pour caractériser les mécanismes moléculaires de l'évolution**

La vie sur la Terre présente une énorme capacité d'adaptation. Il a été possible d'isoler des microorganismes parfaitement adaptés, dans toutes les niches écologiques où règnent des conditions physico-chimiques qui ont été longtemps considérées comme défavorables au maintien de la vie en général (Jaenicke and Böhm, 1998). Certains représentants de cette biomasse aiment des températures de +4°C (les psychrophiles) et d'autres plus "frileux" (les hyperthermophiles) croissent à +113°C! D'autres apprécient des pressions jusqu'à 1000 bars (les barophiles), alors que certains se délectent dans des biotopes acides ou basiques dont le pH varie entre ~ 1 et 11 (les acidophiles et les natrophiles). Les derniers représentants sont soumis à un régime salé (les halophiles) et se complaisent dans de nombreux lacs salés (activité de l'eau ( $a_w$ ) fortement diminuée). De nombreuses recherches se sont donc attachées à décrire les mécanismes d'adaptation de protéines isolées de ces différents hôtes (D'Amico *et al.*, 2003)

### **1) L'adaptation biochimique, structurale et dynamique des protéines d'archaea halophiles**

A la formation du Laboratoire de Biophysique Moléculaire (LBM), nous nous sommes intéressés aux protéines isolées de microorganismes halophiles extrêmes du domaine Archaea. En particulier nous étudions l'Archaeon *Haloarcula marismortui* (*Hm*) qui provient de la Mer Morte en Israël. Tous les halophiles extrêmes accumulent une forte concentration en KCl (4M) dans leur cytoplasme de manière à équilibrer la différence de pression osmotique avec l'extérieur, concentré en NaCl. On peut donc en conclure, que tous les constituants de la machinerie cellulaire sont adaptés pour être solubles et fonctionnels dans de telles conditions.

L'enzyme modèle que nous avons étudiée était la malate déshydrogénase de *Haloarcula marismortui* (*HmMalDH*) car les premières mesures biophysique faites sur celle-ci, indiquaient que la *HmMalDH* était associée à de nombreux ions et molécules d'eau en solution (Mevarech *et al.*, 1977, Zaccai *et al.*, 1989). Cette observation fondamentale était contraire à ce qui avait été mesuré jusqu'alors avec les protéines qui

n'associent que de l'eau à leur structure native. Certaines variations des paramètres en fonction de la nature des sels ont été enregistrées et la mesure sur la forme dénaturée de la *Hm* MalDH indique l'absence d'interactions avec le sel alors que l'interaction avec l'eau est maintenue.

Ces observations ont permis de jeter les bases d'un modèle de stabilisation dans lequel ce sont les interactions protéine-solvant qui dominent la stabilisation de l'enzyme. La conjugaison de résultats provenant de diverses méthodologies a ensuite permis de mieux définir les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de cette adaptation.

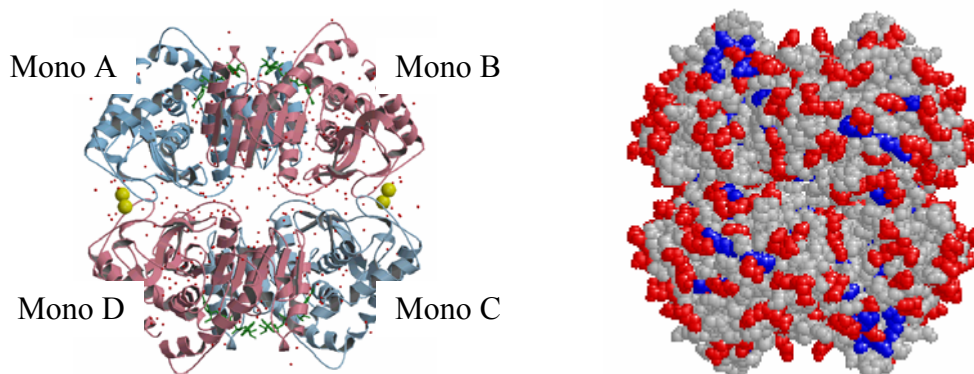
Les travaux théoriques de Dill (1990) suggèrent que les forces (dues aux interactions Coulombiques, de Van der Waals, liaisons hydrogènes et à l'effet hydrophobe) mises en jeu dans la stabilisation des protéines extrêmophiles doivent être de même nature que celles impliquées dans la stabilisation des protéines en général. La stabilité d'une protéine se définit par la différence d'énergie libre ( $\Delta G$ ) entre la forme native et la forme dépliée. Les valeurs de  $\Delta G$  sont faibles, de l'ordre de quelques dizaines de kilojoules par mole, ce qui correspond en fait à un petit nombre d'interactions faibles.

Nous avons choisit d'étudier la stabilité cinétique de la *Hm*MalDH, qui dépend de l'énergie d'activation de dépliement de la forme native. Nous avons montré que la nature thermodynamique de l'énergie d'activation peut être dominée par le terme soit enthalpique soit entropique. En particulier, dans des sels comme le KCl, NaCl, et à faible concentration de MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub>, ce sera la liaison avec une enveloppe de solvation composée de sel et d'eau qui imposeront une composante enthalpique à la stabilité cinétique de la *Hm* MalDH. Dans des sels comme le sulfate d'ammonium ou en présence de D<sub>2</sub>O, qui de manière générale favorisent l'agrégation protéique par des effets sur la structure et l'organisation de l'eau, on observe avec la *Hm*MalDH un comportement qui indique, que l'énergie d'activation est principalement liée à sa composante entropique. L'équilibre entre ces deux grands types de comportement pouvant être déplacé quand un paramètre (pH, NADH) qui joue sur les liaisons moléculaires de l'enzyme est modifié (Bonneté *et al.*, 1994, Madern et Zaccai, 1997). En complément de ce travail, nous avons étudié la dénaturation cinétique de la *Hm* MalDH avec l'objectif de distinguer les effets des anions et des cations. Les résultats

suggèrent la présence de sites d'ions répartis à la surface de la protéine (Ebel *et al.*, 1999).

Nous en avons conclu que des interactions de même nature que celles existant dans les protéines en général étaient mises en jeu, mais avec une répartition adaptée aux conditions du milieu.

Notre modèle suggère, que les interactions protéine-solvant jouent un grand rôle dans le mécanisme de stabilisation d'une protéine halophile. Ceci serait la conséquence d'une enveloppe de solvation composée d'ions et de molécules d'eau organisées en réseau autour des résidus acides de surface. Nous nous sommes fixés l'objectif d'étudier et de décrire les interactions protéine-solvant de la *HmMalDH* en utilisant la cristallographie des rayons-X. La structure que nous avons obtenue à 2,6 Å de résolution a permis de décrire pour la première fois les interactions avec le solvant d'une protéine halophile (Richard *et al.*, 2000). L'organisation spatiale de la *HmMalDH* peut être décrite comme étant un tétramère résultant de la dimérisation d'un dimère (AB-CD).



**Figure 1.** Représentation en ruban du squelette carboné de la *HmMalDH* (gauche). Représentation de la surface en billes (droite). Les acides aminés acides sont colorés en rouge, les basiques en bleus.

Sa surface est couverte de résidus acides (Figure 1). Il existe une grande cavité interfaciale entre les deux dimères. On constate une augmentation très sensible du nombre de ponts-ioniques multiples par rapport aux homologues structuraux non-halophiles de la *HmMalDH*. Nous avons pu observer de nombreuses molécules d'eau organisées autour de la protéine. Sur la base de différents critères, certaines molécules ont été attribuées comme des ions. Nous avons identifiés deux ions sodium aux interfaces entre monomères qui forment un dimère, et quatre ions chlore qui sont localisés aux extrémités de l'interface dimère dimère formant le tétramère. Tous ces

sites d'ions semblent faire partie de grands réseaux d'interactions électrostatiques entre interfaces. Nous avons observé que les molécules d'eau dans la cavité s'assemblent en un vaste réseau de 88 molécules interagissant avec les sous unités protéiques. Ces molécules d'eau contribuent donc aussi à l'assemblage des sous unités entre elles. Dans une seconde étude structurale, un gain en résolution a permis une meilleure description des interactions avec le solvant et de nouveaux sites de fixation d'ions chlore ont été identifiés (Irimia *et al.*, 2003).

Depuis nos premiers travaux structuraux sur la MalDH halophile, quelques rares structures d'autres protéines halophiles ont été publiées et ont confirmé qu'il existait, dans tous les cas, un enrichissement en résidus acides au niveau des surfaces exposées au solvant et qu'une majorité des protéines d'archaea halophiles fixaient des anions (Zeth *et al.*, 2004, Bezir *et al.*, 2005)

Par des études de diffusion aux petits angles de rayons X et de neutrons, il a été démontré que le nombre de molécules de solvant composant l'enveloppe de solvation d'une protéine est plus important que celui observable par cristallographie (Svergun *et al.*, 1998). Notre étude structurale et nos résultats provenant de diverses analyses thermodynamiques nous suggèrent qu'il existe en fait deux types de couches de solvation: une dans la cavité centrale exclusivement composée d'eau et une autre désordonnée composée d'eau et d'ions en interaction à la surface de la protéine. Nous avons aussi caractérisé la dynamique de la *HmMalDH* par diffusion de neutrons dans différents solvants en mesurant le déplacement carré moyen des atomes de l'enzyme à l'échelle de la picoseconde. Les données montrent une dynamique rapide, fortement influencée par les propriétés du solvant (Tehei *et al.*, 2001).

Dans le cadre de notre modèle, nous nous attendons à ce que la perturbation des interactions protéine solvant engendre de fortes modifications sur la stabilité de la *HmMalDH*. Avant que la structure de l'enzyme ne soit déterminée, nous prédisions que plusieurs acides aminés étaient en contact avec l'enveloppe de solvation. L'un d'entre-eux, le résidu Glu 267 a été muté en Arg et caractérisé biochimiquement (Madern *et al.*, 1995). Le mutant nécessite des concentrations en NaCl plus fortes ou une température plus basse pour avoir une stabilité équivalente à celle de la protéine sauvage. Nous avons déterminé que les paramètres enzymatiques et spectroscopiques du mutant ne sont pas modifiés par rapport à la protéine sauvage, ce qui indique qu'il n'y a pas eu de perturbation structurale intrinsèque qui expliquerait l'effet sur la

stabilité. Nous avons donc conclu que c'était la seule perturbation de l'enveloppe de solvation localisée dans la large cavité interne qui nous expliquait le comportement observé.

L'utilisation de l'information structurale a guidé la poursuite de notre investigation. Les arginines impliquées dans les réseaux de ponts ioniques complexes situés à l'interface dimère dimère ont été mutées en sérine avec l'objectif de comprendre les propriétés de ces réseaux dans l'assemblage tétramérique. En combinant diffraction de neutrons et centrifugation analytique, nous avons établi que le double [R207S, R292S] *HmMalDH* se comportait toujours comme un tétramère à forte concentration de NaCl. Quand la concentration en sels s'abaisse en deçà d'un certain seuil, il a été possible de caractériser un dimère actif, par exemple dans du 2 M NaCl (Madern *et al.*, 2000). Cela signifie qu'en dépit de la destruction des ponts ioniques il existe des interactions susceptibles d'assurer la cohésion de l'assemblage tétramérique. Les structures de la *HmMalDH* et de ses mutants donnent une explication rationnelle: les interactions protéine-solvant (les molécules d'eau dans la cavité interfaciale et les sites de fixation d'anions et des molécules d'eau en lieu et place des chaînes latérales mutées), sont suffisantes, dans certaines conditions, pour favoriser la dimérisation des deux dimères de manière à former un tétramère (Richard *et al.*, 2000, Irimia *et al.*, 2003). Nous avons aussi étudié l'effet de la mutation ([K205A] *HmMalDH*) d'un site chlore inter sous-unités et montré que suivant la nature du solvant (Table 1) on peut compenser la rupture de liaison entre sous unités et conserver le tétramère (Madern et Ebel, 2007).

<i>HmMalDH</i>	Sels	< 1 M	1 - 2 M	2 - 4 M
Wt	KCl	Instable	1,8 M: 7,2 S	3,4 M: 7,1 S
	KF	0,8 M: 4,6 S	1,3 M: 7,2 S	3,8 M: 7,2 S
R207S, R292S	KCl	Instable	1,8 M: 4,7 S	3,4 M: 7,2 S
	KF	ND	1,3 M: 4,8 S	3,8 M: 7,1 S
K205A	KCl	Instable	1,8 M: 4,5 S	3,4 M: 4,6 S
	KF	ND	1,3 M: 5,8 S	3,8 M: 7,1 S

**Tableau 1.** Coefficient de sédimentation de la *HmMalDH* et de mutants en fonction de la nature et de la concentration de différents sels. 7,2 S correspond à la valeur d'un tétramère. Un dimère à une valeur théorique de 4,1 S. Des valeurs intermédiaires indiquent l'existence d'un équilibre d'association.



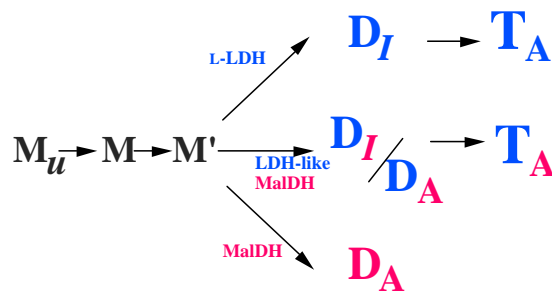
## 2) Mise en place d'une stratégie d'étude prenant en compte la dimension évolutive

Les malates déshydrogénases sont présentées dans tout les manuels de biochimie comme des enzymes dont on pourrait croire que le rôle, la catalyse, la structure sont bien connus, ce qui en ferait des enzymes canoniques ! En particulier, elles seraient toutes dimériques or, nos données expérimentales sur la *HmMalDH* démontrent que ce n'est pas le cas. De plus, la similarité de séquence de la *HmMalDH* était plus forte avec toutes les séquences de lactate déshydrogénases (LDH) qu'avec les malates déshydrogénases (dimériques) connues avant 1996 ! Cette observation suggérait qu'il pouvait exister un troisième groupe non reconnu jusqu'alors.

J'ai donc décidé d'explorer au niveau biochimique, structural et phylogénétique, les diverses relations qui pouvaient nous éclairer sur les LDHs et sur les MalDHs dans leur ensemble.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les différents états de repliement et les propriétés enzymatiques d'intermédiaires de repliement de la MalDH tétramérique (Madern *et al.*, 2000, Madern *et al.*, 2001). Certaines annotations fonctionnelles ne me semblaient pas correctement faites dans les banques de séquences et pouvaient donc induire des erreurs dans la future analyse des données que j'envisageais. J'ai donc entrepris un travail de caractérisation afin de clarifier la situation sur une enzyme clé. J'ai cloné l'ORF0490 de l'Archaea hyperthermophile *Methanocaldococcus jannaschii*, puis la caractérisation biochimique et structurale de la protéine recombinante a été entreprise. J'ai démontré qu'elle utilise préférentiellement le NADPH, qu'elle est active à 90°C, et que son état d'association est tétramérique. C'est la première MalDH NADPH-dépendante à forte similarité de séquence avec des LDH a avoir été caractérisée (Madern, 2000). Nous avons obtenu des cristaux de cette enzyme puis enregistré les premiers clichés de diffraction. Malheureusement, un groupe concurrent a déposé les coordonnées structurales de l'enzyme avant nous (Lee *et al.*, 2001)

Toutes les informations accumulées (caractérisation d'intermédiaires du dépliement, activité des dimères, reconnaissance du coenzyme, etc.) ont permis de définir pour la première fois, le chemin de repliement et d'association de la super famille des LDHs et MalDHs en prenant en compte les MalDH tétramériques (figure 2).



**Figure 2.** Chemin de repliement au sein de la famille MalDH- LDH. M : Monomère, D : Dimère, A : Actif, I : Inactif, T : Tétramère. Les LDHS sont en bleues, les MalDHs en roses.

De manière à affiner la perception des relations au sein de la famille LDH-MalDH nous avons entrepris une nouvelle caractérisation structurale en utilisant la malate hyperthermophile de *Archaeoglobus fulgidus* (Irimia *et al.*, 2003). Nous avons comparé plusieurs structures, ce qui nous a permis de mettre en évidence la présence de boucles surnuméraires localisées, chez les MalDH dimériques (*classiques*), à la pseudo interface dimère-dimère d'un assemblage tétramérique hypothétique. Ces boucles sont donc des éléments structuraux qui génèrent des contraintes stériques qui empêchent la tétramérisation.

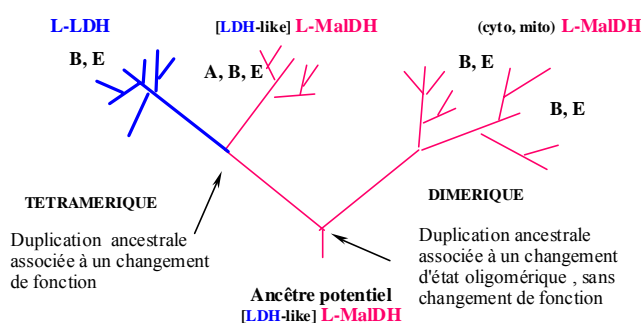
Pour élucider les relations qu'entretiennent toutes ces enzymes j'ai entrepris une analyse phylogénétique entre plus d'une centaine de séquences codantes pour des LDH ou des MalDH correctement identifiées. Il m'a été possible d'identifier un grand nombre de séquences de type MalDH ressemblant au LDH par analyse de similarité dans les séquences génomiques publiées. Les relations phylogénétiques ont été établies en analysant : la distance évolutive en élaborant des matrices de distance, le plus petit nombre de mutations entre séquences (parcimonie) ou les similarités dans le cadre d'un modèle probabiliste (maximum de vraisemblance).

J'ai ensuite corrélé les résultats à de l'information structurale et biochimique clairement établie. Ceci a permis d'établir :

- 1) Qu'il existait au sein de la super famille, un nouveau groupe d'enzymes : les LDH-like MalDH.
- 2) Décrire pour la première fois le scénario évolutif de cette super famille enzymatique dans son ensemble (Madern, 2002).

Jusqu'à ce que mon travail soit publié, il était admis que les LDH et les MalDH étaient le fruit de la simple duplication d'un gène ancestral. Mes travaux ont permis de

montrer qu'en réalité, la répartition fonctionnelle et structurale ne pouvait s'expliquer que par deux duplications consécutives ayant eut des conséquences différentes (Fig 3).

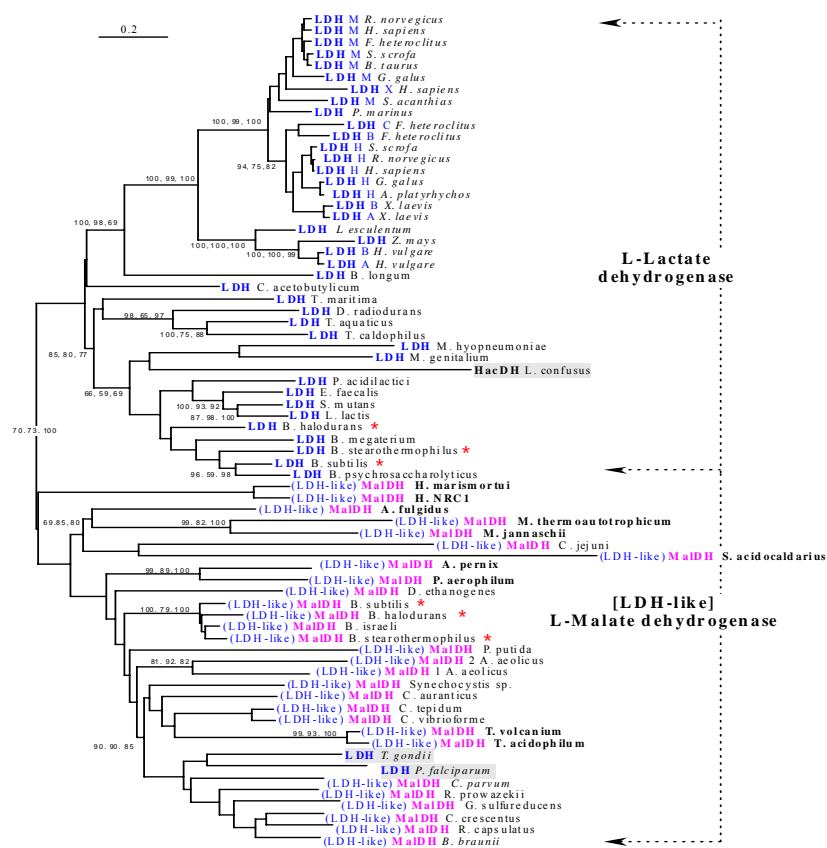


**Figure 3** : Les malates déshydrogénases sont en roses et les lactates déshydrogénases sont en bleues.

A : archaea, B, bacteria, E, eukarya

Le clade des enzymes tétramériques est présenté sur la figure 4, met en évidence pour la première fois la famille des [LDH-like] MalDHs colorée en rose par rapport à la famille des LDHs qui est en bleu. Si l'on regarde la répartition phylétique dans toute la super famille, on constate que les trois domaines du vivant sont présents seulement dans le clade [LDH-like] MalDH. Les séquences d'archaea sont exclues à la fois du clade des MalDH de type dimérique, et de celui des LDHs. On retrouve la trace de la duplication ancestrale (LDH-Like MalDH / LDH) dans certains organismes qui ont conservé les deux gènes (Fig 4, étoiles rouges). Suite à ce travail, une équipe américaine travaillant dans le domaine de la lutte contre les maladies parasitaires m'a contacté afin d'entamer une collaboration. Notre travail a porté sur des conversions de fonction entre MalDH et LDH au sein des apicomplexes. Le mécanisme de discrimination du substrat entre LDH et MalDH est bien connu. La nature de l'acide aminé (position universelle 102) conditionne la reconnaissance. Dans le cas des MalDH, la charge positive du résidu Arg102 favorise la liaison d'une des extrémités carboxylate (négative) de l'oxaloacétate ( $\text{HOCCOCH}_2\text{COOH}$ ). Dans le cas des LDHs on trouve un résidu non chargé (Gln102) qui autorise la reconnaissance du pyruvate ( $\text{HOCCOCH}_3$ ). De manière curieuse, les LDHs des apicomplexes ont une Lysine (chargé positivement) en position 102. L'analyse phylogénétique montre que les LDHs d'apicomplexe ne sont pas issues de la première duplication de gène ancestrale, car elles sont enracinées dans le clade des LDH-like MalDH (Madern *et al.*, 2004). Ceci a permis d'affiner le scénario évolutif de la super famille en montrant que l'évolution de la fonction enzymatique était toujours orientée dans le sens MalDH (reconnaissance

stringente du substrat) vers LDH (reconnaissance relâchée). Le travail de compréhension du mécanisme de discrimination en utilisant les méthodes de cristallographie de l'IBS était bien évidemment la suite logique de ce travail. Au cours de la période de recherche des conditions de cristallisation, un consortium de génomique structurale américain a déposé à la PDB les données cristallographiques de la LDH de *Cryptosporidium parvum*, ce qui a stoppé notre projet. La structure de cette enzyme montre qu'une insertion de 5 acides aminés dans la boucle mobile qui porte le résidu K102 perturbe sa localisation spatiale dans le site catalytique. Le résidu 102, se trouve repositionné (par rapport aux LDHs classiques) d'une manière qui ne lui permet pas d'interagir spécifiquement avec le substrat. C'est un autre résidu (neutre) de l'insertion qui se positionne à sa place et autorise la fixation du pyruvate. Ces observations servent de bases à des travaux de *drug design* utilisés dans la lutte contre les maladies parasitaires (Wiwanitkit, 2007)



**Figure 4.** Le clade des enzymes tétramériques. Les malates déshydrogénases sont en rose et les lactates déshydrogénases sont en bleu.

L'existence des divers groupes d'enzymes se comprend mieux si on analyse en détails l (Figure 5) les données relatives aux effets de la mutation du résidu en position 102 (Madern, 2002).

			$k_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})$	
			Tétra	Dim
MalDH	Native (R102)	OAA	$2.0 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^7$
MalDH	Native (R102)	Pyruvate	-	-
MalDH	Mutant (R102Q)	OAA	68	257
MalDH	Mutant (R102Q)	Pyruvate	5600	132
LDH	Native (Q102)	OAA	4000	
LDH	Native (Q102)	Pyruvate	$4.2 \cdot 10^6$	
LDH	Mutant (Q102R)	OAA	$4.2 \cdot 10^6$	
LDH	Mutant (Q102R)	Pyruvate	500	

**Squelette tétramérique :**  
 favorise l'émergence d'une  
 nouvelle fonction enzymatique  
 par une mutation unique

**Squelette dimérique donne**  
 naissance à une MalDH  
 plus efficace et gène la  
 conversion de fonction

**Figure 5.** Valeurs d'efficacité catalytique pour le pyruvate ou l'oxaloacétate en fonction de la nature des enzymes et du résidu en position 102. MalDH en rose, LDH en bleu.

Dans le groupe des enzymes tétramériques (LDH + LDH-like MalDH) on voit clairement que l'on peut échanger le résidu en position 102 et changer favorablement la spécificité de reconnaissance. Une LDH mutante qui porte en position 102 une arginine à la place d'une glutamine, devient une véritable MalDH (ratio OAA/Pyr = 800). Il en est de même avec une LDH-like MalDH (ratio Pyr/OAA = 82). Dans le cas d'une MalDH dimérique, la mutation du résidu 102 ne modifie pas la spécificité de reconnaissance (ratio Pyr/OAA <1). J'en ai conclu que la sélection des MalDH dimériques se justifiait par le fait qu'elles étaient des enzymes plus efficaces (et stringentes) en terme de reconnaissance et de catalyse. Cette analyse a servi de support à un travail expérimental récent (Yin et Kirsch, 2007). Ces auteurs ont identifiés les substitutions additionnelles anti-déterminantes pour l'activité LDH dans une MalDH dimérique. Ils ont ainsi pu construire une MalDH dimérique mutante présentant une véritable activité LDH avec un ratio Pyr/OAA égal à 28.

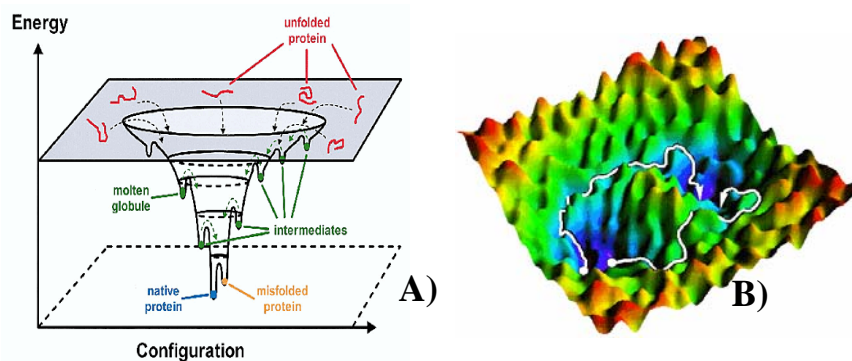
Le travail d'analyse des données dans un large cadre était à mes yeux un préalable nécessaire permettant de discriminer au plus juste l'effet des substitutions impliquées dans les diverses adaptations que nous étudions.

### 3) Base dynamique de l'adaptation

Les magnifiques modèles structuraux des protéines obtenus par les méthodes de cristallographie aux rayons X, pourraient laisser croire que les protéines sont des structures statiques. Ce qui n'est bien évidemment, pas le cas.

La notion de flexibilité / rigidité structurale est souvent utilisée de manière à définir les propriétés dynamique des protéines. Le développement suivant montrera que l'emploi de ces termes doit être clairement discuté afin de passer d'une description qualitative à une détermination quantitative de paramètres liés à la dynamique des protéines. En particulier, il est essentiel de comprendre que différents mouvements se superposent dans une structure et sur des échelles de temps qui vont de la pico à la milli seconde.

La meilleure représentation d'une enzyme en solution est décrite par une distribution statistique de micro états (Figure 6) ayant des conformations différenciées présentant plusieurs niveaux de structuration local (Frauenfelder *et al.*, 1991 ; Bai *et al.*, 1995 ; Wooll *et al.*, 2000, Vendruscolo et Dobson, 2005 ; Oliveira *et al.*, 2008).



**Figure 6.** Représentation schématique du paysage conformationnel en entonnoir d'une protéine (A) et d'un ensemble (B) de sous états conformationnel (CS) ayant des niveaux d'énergies différents.

Le modèle des sous états conformationnels (CS, *conformationnal subset*) décrit par Frauenfelder est le plus populaire. Il dépeint chaque macro état conformationnel comme étant composé par un ensemble de sous états conformationnels de faible différence en énergie. Les barrières énergétiques qui séparent les CS sont basses et peuvent être franchies par une partie ou toutes les molécules de la solution en fonction des paramètres du milieu. Ce modèle descriptif a été validé par de récentes évidences expérimentales. La cristallographie a permis de piéger des CS au sein d'un même cristal

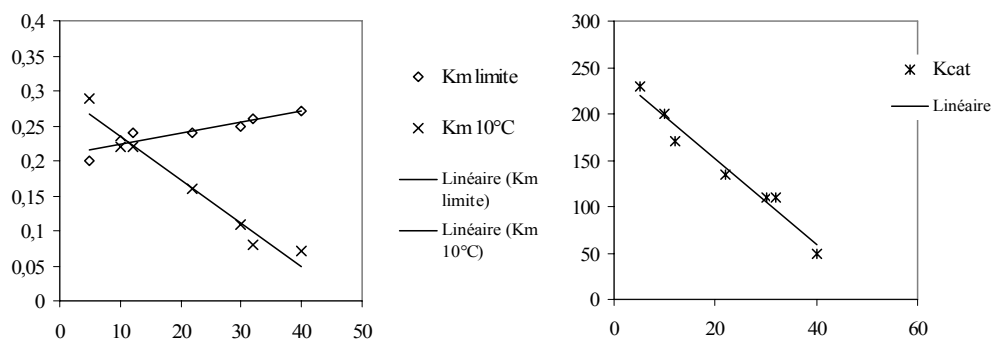
(Henzler-Wildman *et al.*, 2007) et la RMN a permis de décrire le paysage conformationnel catalytique de la Dehydrofolate reductase (Boehr *et al.*, 2006). Les molécules d'enzyme peuplant ces différents sous états conformationnels, présenteront des différences d'affinités pour le substrat (Pineda *et al.*, 2007, Qiu *et al.*, 2007). Dans une condition physico chimique donnée, la population de molécules qui occuperont une distribution de conformations peut être considéré comme l'état natif. La capacité à passer facilement entre sous états conformationnels proches est la base de la fonctionnalité enzymatique (Creighton, 1994). Les réorganisations structurales qui en découlent engendrent un grand nombre de conséquences comme la stabilisation de la géométrie correcte de liaison d'un ligand ou d'un co-facteur, l'éjection du produit d'une réaction de catalyse etc.

Au cours de la catalyse, la flexibilité moléculaire qui affecte la mobilité des différents éléments de structures secondaires, opère dans des échelles de temps de l'ordre de la micro à la milli seconde.

Comme les mouvements conformationnels associés à la catalyse nécessitent de l'énergie thermique du milieu environnant, la flexibilité de n'importe quelle molécule d'enzyme est un processus thermo dépendant. Si l'environnement est trop froid, les mouvements seront ralentis ne permettant pas une catalyse efficace et si la température est trop chaude, la structure peut être altérée jusqu'à la dénaturation complète.

La comparaison entre protéines homologues ayant évoluées face à une contrainte adaptative de nature physico-chimique est donc un bon moyen de décrire les mutations adaptatives qui vont permettre de garder l'équilibre fonctionnel entre stabilité et flexibilité. Dans le cas de la famille LDH-MalDH, différentes études biochimiques ont été faites et ont principalement porté sur l'adaptation thermique. Il est difficile de mesurer directement par des moyens physiques les variations de flexibilité enzymatique. C'est donc en déterminant de manière indirecte, mais néanmoins très pertinente, que le groupe du Pr G. Somero a mesuré les variations thermiques de la flexibilité en déterminant les paramètres catalytiques  $k_{cat}$  et  $K_m$  du substrat de plus d'une dizaine de LDHs eucaryotes (Fields et Somero, 1999). Il a été montré que quelque soit la LDH testée, le  $K_m$  augmente toujours (affinité diminue) quand la température de la mesure augmente.

En revanche si on compare (Figure 7) la valeur du  $K_m$  pour le substrat à la température correspondant à la limite maximale de l'habitat, les valeurs sont quasi constantes.



**Figure 7.** Valeur du  $K_m$  en mM (en ordonnée) du pyruvate de LDHs adaptées à la température (panel gauche, mesuré à la température de l'hôte : carré ; mesuré à 10°C : croix).  $K_{cat}$  du pyruvate ( $s^{-1}$ ).

Il devient frappant de constater que les valeurs du  $K_m$  pour le substrat, mesurées à 10°C, pour les mêmes espèces augmentent quand la température de l'habitat diminue. A la température physiologique, la conservation des valeurs de  $K_m$  entre les LDH adaptées à la température ne peut donc pas être attribuée à des substitutions dans le site catalytique, puisque les acides aminés impliqués dans la catalyse sont strictement conservés dans toutes les LDHs. Les changements adaptatifs des LDHs (les substitutions) sont donc situés dans des régions autres que le site catalytique et qui néanmoins agissent sur celui-ci. Les valeurs de  $k_{cat}$  expriment le nombre de molécules de substrat transformé par unité de temps. Il est donc très utile de comparer cette valeur, car elle renseigne sur les capacités métaboliques d'une enzyme et donc sur les contraintes adaptatives qui se sont exercées. Comme cela est observé dans la grande majorité des autres enzymes qui ont été étudiées (Siddiqui et Cavichioli, 2006), les valeurs du  $k_{cat}$  des LDHs varient avec la température de l'habitat de l'organisme. Les LDHs capable de fonctionner à des températures élevées ont des  $k_{cat}$  plus faibles que les LDHs psychrophiles. Cette relation est encore plus accentuée si on regarde les valeurs mesurées dans la gamme de température 0-5°C. Les LDHs psychrophiles ont des valeurs proches de 250  $sec^{-1}$ , alors que les LDHs provenant d'organismes thermophiles ont des valeurs très faibles. Les enzymes les plus résistantes à la dénaturation thermique sont donc les moins flexibles.



La conclusion de ces études faites sur une échelle de temps « lente », est que la flexibilité enzymatique varie de manière inverse avec la température de l'habitat de l'hôte.

On peut se poser la question de savoir si une telle conclusion est valide, en particulier si on regarde les mouvements des atomes sur une échelle de temps plus rapide. La réponse est développée dans la deuxième partie du chapitre.

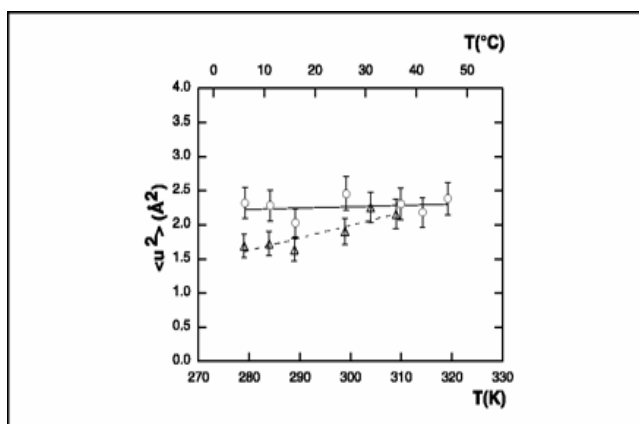
Les forces de liaisons qui maintiennent l'architecture tridimensionnelle d'une protéine sont des forces de faibles énergies qui lient les atomes de la structure avec ses voisins. En 2000, G. Zaccai a proposé une méthode de spectroscopie neutronique qui permet de mesurer indépendamment la flexibilité et la rigidité (résilience) des atomes sur des échelles de temps très courtes (pico-nano secondes). La flexibilité globale  $\langle u^2 \rangle$  et la constante de force  $\langle k' \rangle$  expriment respectivement les mouvements moyens des atomes au sein d'une structure et la résilience (rigidité).

De manière intuitive et en se référant au concept indirect de flexibilité ( $k_{cat}$ , Km) sur des échelles de temps associées à la catalyse on pourrait prédire que les propriétés dynamique d'une LDH thermorésistante seraient différentes de celles de ses homologues mésophiles ou psychrophiles. La LDH thermophile devant être moins flexible et donc plus rigide que les autres.

Nous avons donc étudié les propriétés dynamiques de malate/lactate déshydrogénases extrémophiles en utilisant la rétrodiffusion neutronique sur le spectrophotomètre IN13 de l'ILL. Nos résultats ont démontré que les paramètres exprimant les propriétés dynamiques d'une protéine étaient découplées à l'échelle atomique et ne pouvaient donc pas être prédit (Tehei *et al.*, 2005). En particulier, d'une manière surprenante, nous avons montré que l'amplitude des mouvements (la flexibilité) des atomes de l'enzyme hyperthermophile était plus importante que les valeurs de son homologue mésophile à température ambiante (Figure 8). Les variations  $\langle u^2 \rangle$  de la LDH mésophile sont plus fortement dépendantes de la température que son homologue hyperthermophile. Il est remarquable de noter qu'à des températures proches de l'activité catalytique optimale, les valeurs de  $\langle u^2 \rangle$  sont sensiblement équivalentes ( $2,3 \text{ \AA}^2$ ) pour chaque enzyme.

Puisque le calcul de la résilience est corrélé à l'inverse de la pente, on peut calculer que la LDH hyperthermophile présente une constante de force bien supérieure (1,5 N/m) à celle de l'enzyme mésophile (0,15 N/m). La LDH hyperthermophile est donc

plus résiliente que la mésophile, il faudra donc un plus grand apport d'énergie thermique pour briser les forces de cohésion qui maintiennent son architecture.



**Figure 8.** Variation d'amplitude de déplacement carré moyen des atomes d'une LDH-like MalDH hyperthermophile et de son homologue mésophile en fonction de la température.

Nous faisons donc l'hypothèse que, pour faire face à la contrainte thermique les mutations, qui se sont accumulées entre les différentes enzymes de la famille MalDH-LDH au cours de la divergence évolutive, ont principalement modifiées la résilience intramoléculaire de manière à assurer la stabilité conformation elle adéquate dans des conditions physico-chimiques données (Tehei *et al.*, 2005). De manière concomitante, ces mutations permettent aussi d'avoir une flexibilité (atomique) équivalente à la température optimale de catalyse. Les mouvements rapides des atomes peuvent être donc considérés comme les « lubrifiants » nécessaires (qui précèdent) aux réorganisations structurales de l'édifice macromoléculaire.

Puisque la meilleure représentation d'une protéine correspond à un ensemble de sous-conformation (CS) en équilibre, on peut facilement admettre que les propriétés adaptatives sont la conséquence d'un changement d'équilibre entre ces CS.

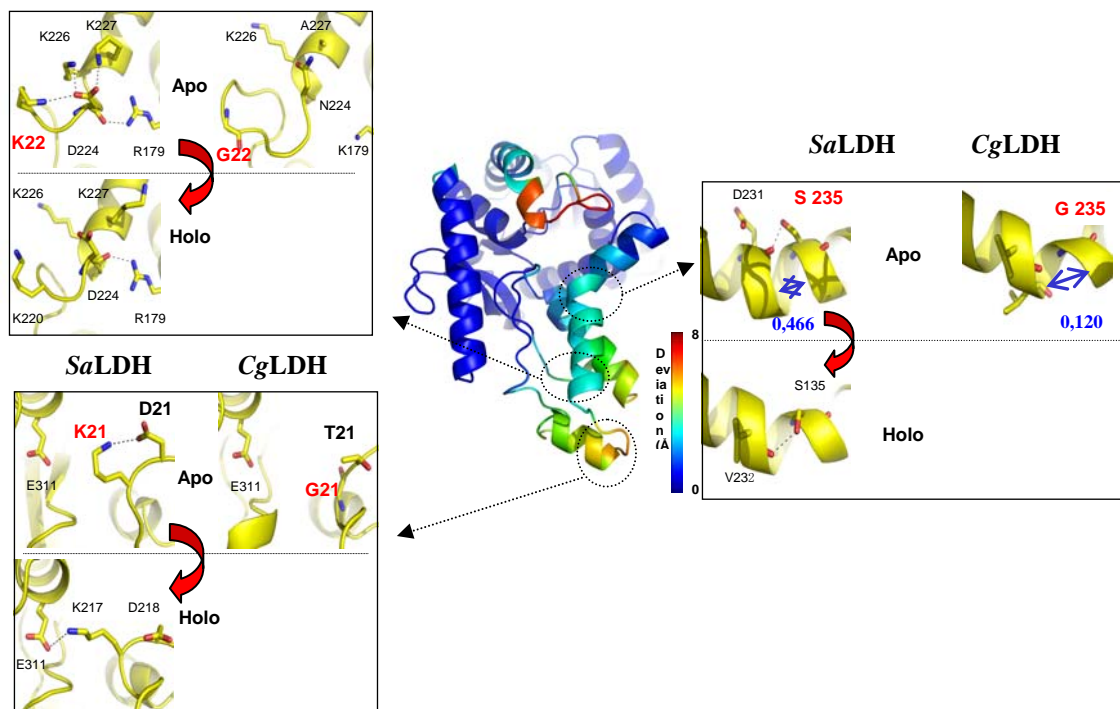
#### 4) Adaptation thermique

De manière à approfondir les mécanismes de l'adaptation moléculaire en utilisant la super famille LDH/ MalDH, je conduis depuis plusieurs années, une étude visant à élucider l'adaptation thermique sur une large gamme de température. L'objectif de cette étude, étant de contribuer à la cartographie à l'échelle moléculaire des déterminants de cette adaptation et non d'en tirer des conclusions sur l'hypothèse (séduisante) d'une

évolution des protéines à partir d'un ancêtre thermophile (Shimizu et al., 2007 ; Di Giulio, 2003).

Les enzymes présentant la plus forte ressemblance phylogénétique et ayant la plus forte divergence au niveau des propriétés biochimiques ont été sélectionnées comme cibles à étudier. Cette stratégie permet de mieux distinguer les effets des mutations induisant des changements de propriétés de celles accumulées au cours de la dérive génétique. Etablir la parenté phylogénétique est désormais considérée comme une étape cruciale dans les études comparatives portant sur l'adaptation (Papaleo *et al.*, 2008). Une partie de cette étude a été réalisée par Nicolas Coquelle doctorant au LBM. Les LDHs de *Thermus thermophilus* (*Tt*) et de *Deinococcus radiodurans* (*Dr*) ont été comparées afin de caractériser la transition thermique hyperthermophile/mésophile. La transition mésophile / psychrophile a été étudiée en comparant les LDHs de *Squalus acanthias* (*Sa*LSH) et de *Champsoccephalus gunnari* (*Cg*LDH).

Comme cela avait été observé pour d'autres LDHs (discuté dans le chapitre précédent), la caractérisation des paramètres de la catalyse des enzymes utilisées dans notre étude, montre que le  $k_{cat}$  est plus fort (flexibilité) pour une LDH psychrophile que pour son homologue hyperthermophile.



**Figure 9.** Comparaison des effets structuraux induits par des substitutions non conservatives. La partie centrale en ruban est colorée en fonction du déplacement carré moyen entre les formes apo et le complexe ternaire de *Sa*LDH. On peut comparer directement l'effet, à position équivalente, d'une substitution chez *Cg*LDH comparé à *Sa*LDH. On voit par exemple, (panel droit) que la substitution de la sérine 235 par une glycine chez *Cg*LDH induit un désordre conformationnel local dans la forme apo.

Bien qu'il existe un grand nombre de substitutions entre chaque paire de séquences étudiées, il est remarquable de noter que l'analyse structurale suggère que peu de mutations (des substitutions non-conservatives) sont vraisemblablement responsables des changements de propriétés thermophiles (Coquelle *et al.*, 2007).

Les substitutions importantes ne sont pas réparties au hasard dans la structure, mais sont en fait localisées dans des régions mobiles qui subissent des réorganisations conformationnelles au cours de la catalyse.

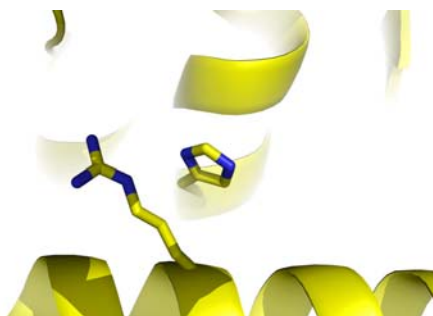
Ces mutations ont à chaque fois des effets multiples qui agissent à la fois sur l'enthalpie d'activation de la catalyse et qui induisent du désordre conformationnel local. La figure 9 illustre l'effet de substitutions qui ont été sélectionnées dans la LDH psychrophile de *C. gunnari*. La comparaison des valeurs du paramètre d'organisation des liaisons hydrogènes au sein d'une hélice permet de comparer le désordre structural. Dans le cas d'une liaison parfaite la valeur est de 1 alors que dans le cas d'une liaison inexistante la valeur est de zéro. On voit clairement que le remplacement d'une sérine par une glycine en position 235 dans la structure, a induit une diminution importante de la valeur de liaison qui passe de 0,46 à 0,12.

Nos analyses ont aussi permis de montrer pour la première fois que des substitutions conservatives induisent aussi des effets structuraux notables qui ont un rôle dans l'adaptation fonctionnelle des LDHs vers les basses températures (Coquelle *et al.*, 2007). Une telle conclusion ne pouvait pas être déduite hors d'un contexte structural.

Nos données biochimiques montrent que les substitutions qui se sont accumulées au cours de la période adaptative des LDHs pour faire face à la contrainte thermique ont agit préférentiellement sur les paramètres d'activation thermodynamique (diminution d'enthalpie et augmentation d'entropie) de la catalyse (Coquelle *et al.*, 2007). Dans le cadre du modèle CS protéique, on peut dire que les mutations ont vraisemblablement redessiné le paysage conformationnel des LDHs en modifiant les barrières énergétiques entre les différents CS. Dans le cas de l'adaptation psychrophile les mutations ont abaissé le coût énergétique du passage d'un CS à un autre, ce qui conduit à une distribution des CS plus vaste à une température donnée. Ceci se reflète évidemment dans la valeur du  $K_m$  pour le pyruvate de la LDH psychrophile qui est plus élevée que pour sont homologue hyperthermophile.

Nos conclusions sont, pour la plupart, en accord avec celles déduites de diverses études sur l'adaptation thermique des protéines du très chaud au froid (Siddiqui et Cavichioli 2006). Il convient de noter qu'une étude récente portant sur l'adaptation thermique des isocitrates déshydrogénases a montré que l'on peut avoir une enzyme avec une catalyse efficace à basse température avec la stabilité conformationnelle d'une protéine hyperthermophile (Fedoy *et al.*, 2007). Cet effet est possible dans le cas où il existe un découplage prononcé entre le site catalytique et le reste de l'enzyme.

A la lumière du modèle CS, nous reprenons actuellement l'analyse de toutes les structures de LDHs et de MalDHs qui sont disponibles afin d'y découvrir des informations qui n'auraient pas encore été dévoilées. Nos premières analyses montrent que nous avons capturé, dans la structure de la *Tt* LDH, un sous état conformationnel du site catalytique jamais décrit jusqu'alors. Jusqu'à présent dans toutes les structures publiées (forme apo et complexe ternaire), le résidu Arg 171 du site catalytique établissait une interaction avec le substrat et l'histidine réactive (H195), ce qui laissait croire que la position de ce résidu était immuable (Goward et Nicholls, 1994). Dans le cas de la forme Apo de la *Tt* LDH, le résidu R171 occupe une position spatiale très différente (basculement à 180°), ne permettant pas d'établir les interactions requises pour la liaison du substrat (Figure 10).



**Figure 10:** Nouvelle position (non compétente) de R171 dans la forme Apo d'une LDH. La position compétente correspond à un basculement vers la droite.

Dans le complexe ternaire, R171 est à la position (catalytiquement favorable) qui a toujours été observée. La fixation du substrat et du NADH induisent donc le glissement entre deux CS du résidu R171. De plus, il semble qu'une Histidine en position 68 soit aussi soumise à une réorganisation structurale locale qui lui donnerait un rôle de barrière autorisant ou non le basculement de l'Arg 171. Ces deux réorganisations structurales locales nécessitent un apport énergétique car il faut rompre plusieurs liaisons ioniques très stabilisantes de l'hélice qui porte les résidus. Je pense qu'au cours de l'adaptation thermique (du chaud vers le froid) certaines mutations ont été

sélectionnées afin de favoriser le déplacement d'équilibre du CS non compétent vers le CS compétent de R171 même en l'absence de liaison du NADH et du substrat. Ces mutations ont eu pour effet de minimiser le coût énergétique requis pour le basculement. Cette hypothèse est actuellement testée par des calculs de dynamique moléculaire qui dicteront la construction de mutants. L'objectif est de piéger dans la forme apo de *Tt* LDH (hyperthermophile), le résidu Arg 171 dans un CS compétent comme cela été observé jusqu'alors avec les LDHs (mésophile et psychrophile). Ce serait un moyen original de démontrer l'action de l'évolution sur l'équilibre du paysage conformationnel.

### 5) Divergence et convergence adaptative

De manière à affiner notre perception des mécanismes de l'adaptation halophile, j'ai démarré l'étude de la Malate déshydrogénase de la bactérie *Salinibacter Ruber*. Au contraire des autres bactéries qui synthétisent des osmoprotectants, cette bactérie est la seule à accumuler du KCl dans son cytoplasme, comme le font les archaea halophiles (Anton *et al.*, 2002). A partir de notre connaissance des propriétés des protéines halophiles provenant des données sur la *HmMalDH*, nous prédisions que la malate déshydrogénase provenant de *S. ruber* aurait vraisemblablement des propriétés similaires à celle de *H. marismortui*. J'ai donc purifié et caractérisé la MalDH à partir de *S. ruber*. Les cultures de cette espèce sont longues car le taux de croissance est faible et le rendement en quantité de pâte bactérienne est de moins de 1g/L. Il m'a fallu plusieurs mois de cultures pour obtenir une quantité satisfaisante de cellules équivalent à plus de 60 L. Mais le résultat en valait la peine.

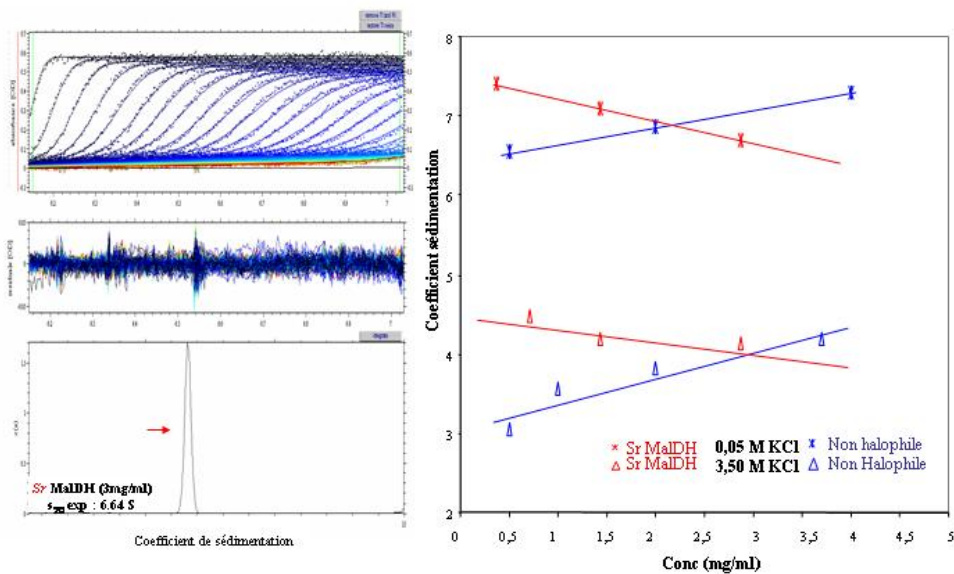
En effet, la *SrMalDH* a un comportement tout à fait atypique puisqu'elle peut être considérée (en l'absence d'information structurale) comme ayant le comportement d'une protéine non halophile (Madern et Zaccai, 2004). L'enzyme est bien une LDH-like MalDH tétramérique qui est stable même en l'absence de sel, et son activité enzymatique est partiellement inhibée à fortes concentrations de KCl. Ces caractéristiques contrastent donc fortement avec celles de l'enzyme de *H. marismortui*.

La poursuite de l'étude sur la *SrMalDH*, implique que soit résolue sa structure cristallographique. Cette caractérisation fait partie du travail de thèse de Nicolas Coquelle. Des conditions de croissance cristalline ont été facilement échantillonnées de

manière robotisée. Les cristaux de bonne qualité, ont permis d'obtenir des données de diffraction à 1,5 Å. Une telle résolution permettant de décrire l'organisation précise du solvant autour de la protéine. Cette analyse est en cours. La structure cristallographique de la *SrMalDH*, est particulièrement intéressante car elle montre que sa surface est recouverte de résidus acides, comme c'est le cas avec l'enzyme de *H. marismortui*. Mais la *SrMalDH*, Il n'y a pas de sites de fixation d'anions comme dans la *HmMalDH*. Une telle observation explique donc la stabilité de la *SrMalDH* en absence de sels.

Afin de comprendre le rôle des résidus acides de surface, une stratégie de caractérisation a été mise en place. Au laboratoire, il a été démontré que les variations du coefficient de sédimentation d'une protéine, en fonction de sa concentration, reflètent les effets d'attraction ou de répulsion qui s'exercent entre protéines (Solovyova *et al.*, 2001). Quand le coefficient de sédimentation augmente, les effets inter particulières sont dominés par un effet attractif. Quand le coefficient diminue, c'est qu'il existe un effet répulsif entre les protéines de la solution. Cette étude a aussi montré que les variations de solubilité d'une protéine sont en relation directe avec la nature des régimes répulsifs (forte solubilité) ou attractifs (faible solubilité) qui domine en solution. Nos analyses phylogénétique et structurale de la *SrMalDH*, montrent qu'elle est fortement apparentée à l'enzyme de *Chloroflexus aurantiacus* (*CaMalDH*) dont la structure cristallographique est publiée (Dalhus *et al.*, 2002). J'ai obtenu le clone qui surexprime la *CaMalDH*. Nous allons donc pouvoir comparer les évolutions respectives des coefficients de sédimentation des *Ca* et *Sr* MalDHs à différentes concentrations en KCl et à différents pHs.

Dans un cas idéal, le comportement de la *SrMalDH* devrait être dominée par un régime répulsif bien plus marqué que dans le cas de l'enzyme de *C. aurantiacus*, ceci même à forte concentration en KCl.



**Figure 11.** Variation du coefficient de sédimentation de la malade déshydrogénase halophile de *S. ruber* et de son homologue non halophile en fonction de la concentration en protéine dans du KCl (panel droit). Le panel gauche montre une mesure brute d'analyse de données sur Sr MalDH.

Les résultats correspondent exactement à ma prédiction. Ils montrent que la variation du coefficient de sédimentation de la protéine halophile et de son homologue non halophile sont inversés (Figure 11, panel droit). Ceci démontre que l'accumulation de substitutions à la surface de la Sr MalDH a totalement modifiée ses propriétés d'interactions en favorisant un régime interparticulaire répulsif, ce qui est un avantage par rapport à la contrainte de solubilité en présence de forte concentration en sels. Cette expérience établie donc enfin clairement le rôle des résidus acides à la surface des enzymes halophiles.

## 6) Adaptation au pH

Depuis quelques années, on assiste à une augmentation importante du nombre de génomes séquencés. Dans un avenir proche plus de 1000 séquences génomiques seront déposées dans les banques d'information biologiques. Une telle abondance d'information est une véritable aubaine pour aller vers des caractérisations évolutives puisqu'il est facile de voir s'il existe un gène codant LDH-MalDH dans un organisme sur lequel a du s'exercer une contrainte physico-chimique forte. D'autre part, comme



les coûts de synthèse chimique d'ADN se sont considérablement amoindris, il devient possible de construire des gènes synthétiques (optimisé pour l'expression dans *E. coli*) à des tarifs très compétitifs. J'ai choisi de mettre en pratique ce type de stratégie, car elle permet de s'affranchir de diverses étapes de clonage et de séquençage qu'il faut mettre en œuvre aux phases de démarrage des projets.

Une des contraintes adaptatives qui s'exerce fréquemment sur les espèces dans l'environnement est la contrainte du pH. Pour la plupart, les cellules acidophiles ou natrophiles luttent contre les effets délétères des pHs extrêmes sur leurs protéines cytoplasmiques en mettant en jeu des mécanismes d'importation exportation des ions de manière à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité.

Toutes les études menées jusqu'alors sur des LDH-like MalDH ont montré que l'optimum de pH était assez étroit et centré sur pH 7. J'ai identifié la présence de gène du groupe LDH-like MalDH dans les génomes respectifs des archaea *Picrophilus torridus* (thermo-acidophile) et *Natronomonas pharaonis* (halo-natrophile) qui ont comme particularité d'avoir des pHs cytoplasmiques qui ne sont pas neutres. Le pH interne de *P. torridus* est proche de pH 5 et celui de *N. pharaonis* avoisine pH 9 (Futterer *et al.*, 2004; Falb *et al.*, 2005). Une publication très récente a montré que le site réactionnel d'un cytochrome de *P. torridus* est stable à pH 4,5 (Ho *et al.*, 2008). Cette observation me laisse penser qu'il sera donc possible de caractériser dans un délai raisonnable des MalDHs ayant vraisemblablement subi une contrainte évolutive dictée par les effets de pH (clonage réalisé). Si tel est le cas on doit s'attendre à un déplacement de l'optimum d'activité des enzymes et pouvoir l'expliquer au regard de la nature des interactions structurales qui auront été modifiées par l'accumulation de substitutions sur la séquence codante.

## **7) Les malate–lactate déshydrogénases extrêmophiles en tant que support de projets de recherche ANR.**

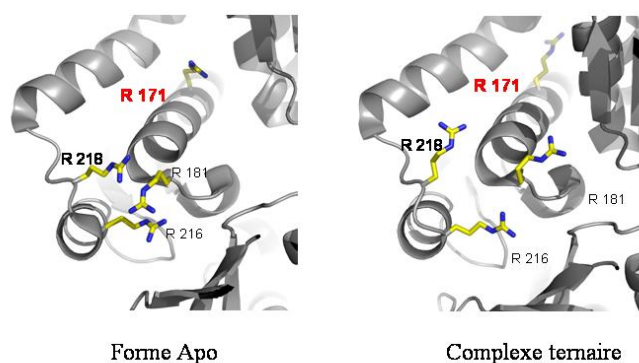
### **a) Etude des dommages induits par les rayonnements ionisants**

Au laboratoire, un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) a été obtenu par le Dr M. Weik afin de soutenir un projet d'étude des dommages induits par les rayonnements ionisants. J'ai en charge la partie du projet sur une thématique qui essaye de démontrer l'existence d'un lien (au niveau protéique) entre adaptation thermique et résistance au stress radiatif. J'ai émis l'hypothèse qu'une protéine hyperthermophile devrait être plus résistante au stress radiatif que ces homologues

mésophile ou psychrophile. En effet, la grande stabilité thermique et chimique d'une protéine hyperthermophile pourrait lui conférer une plus grande résistance vis-à-vis de la dénaturation induite par les espèces réactives de l'oxygène, qui sont produites au cours de la radiolyse de l'eau.

Ce travail se fait à la fois en étudiant les dommages induits sur des MalDHs /LDHs adaptées aux conditions extrêmes en solution et dans des cristaux (collaboration avec le Pr Houée-Levin de l'Université Paris XIII). La partie cristallographique est effectuée par Nicolas Coquelle doctorant du LBM. Dans le cas des LDHs adaptées à la température, les mesures (non publiées) montrent que la protéine hyperthermophile de *T. thermophilus* est beaucoup plus sensible à la désactivation sous irradiation que ses homologues mésophile et psychrophile. Cette observation qui ne correspond pas à mes prédictions peut en fait s'expliquer par le fait que la méthode de mesure employée (activité résiduelle) après irradiation n'est pas une méthode directe de mesure de la stabilité conformationnelle. Des mesures de dichroïsme circulaire après irradiation à 250 Gy montre que la *Tt*LDH est toujours bien repliée. On est donc en présence d'un mécanisme d'inhibition plutôt que face à une dénaturation de l'enzyme. L'utilisation en solution, de filtres chimiques qui piègent certaines espèces réactives de l'oxygène a permis de montrer que c'est le radical hydroxyle OH $\cdot$ , qui est responsable de la perte d'activité. J'ai ensuite fait de la protéolyse dirigée sur la protéine irradiée couplée à de la spectrométrie de masse (Maldi-TOF) ce qui permet de montrer que la modification chimique liée à l'irradiation ne porte que sur un seul résidu arginine en position 218. Cette arginine, n'est pas un résidu directement impliqué dans la catalyse, mais au regard des changements structuraux qu'elle implique la catalyse, il est possible de comprendre l'effet inhibiteur à longue distance qu'elle implique une modification de ses propriétés (Figure 12).

Pour que la catalyse se produise, R171 doit être situé dans la pochette catalytique afin de stabiliser l'histidine réactive H195. Ce changement de position est conditionné par la modification structurale du réseau complexe d'interaction électrostatique dans lequel participent les acides aminés R218, R216 et R131. La modification du réseau provoque le basculement d'une extrémité de l'hélice ( $\alpha$ 2H) qui induit la rotation de R171. La modification chimique de R218, après irradiation, doit vraisemblablement contraindre l'enzyme dans un état conformationnel non compétent. On a donc une inhibition à longue distance sans dommage direct dans le site catalytique.



**Figure 12.** Dans la forme apo, l'arginine 171 (rouge) du site catalytique est orientée en position non compétente. Dans le complexe ternaire, R171 est projetée dans la pochette catalytique dans une position favorable.

Si on change de méthode pour sonder la stabilité conformationnelle en fonction de la dose en solution, en utilisant par exemple le dichroïsme circulaire, la prédiction concernant la stabilité accrue de la protéine hyperthermophile s'avère juste. La LDH de *T. thermophilus* résiste à des doses élevées (plus de 2500 Gy) alors que celles de *D. radiodurans* et de *C. gunnari* se sont dépliées. Des mutants de la LDH de *T. thermophilus* dont les propriétés de stabilité thermiques ont été altérées vont être testés vis-à-vis de leur résistance à la dénaturation après irradiation (en cours).

Pour ce qui est de l'étude cristallographique, les résultats sont différents. Pour l'instant, il n'est pas possible de comparer les dommages sur les cristaux des trois protéines à des doses équivalentes à causes de difficultés liées à la reproductibilité des conditions de cristallogénèse de *D. radiodurans*. En ce qui concerne les dommages induits par des doses croissantes, les mesures effectuées sur les cristaux de *Tt* LDH montrent une grande sensibilité de résidus impliqués dans la catalyse.

Des résultats sur les dommages induits sur la *HmMalDH* halophile étudiée par cristallographie ont été publiés (Fioravanti *et al.*, 2006). Nous avons montré la très grande susceptibilité de résidus du site catalytique. Après irradiation, l'histidine réactive (H195) se trouve dans une position spatiale très différente de celle qui permet la catalyse. Ce changement de position s'explique par la perte de l'interaction favorable avec le résidu Asp168, qui subit une décarboxylation suite à l'irradiation. Nous avons aussi montré que certains acides aminés sont protégés des dommages quand ils sont impliqués dans des interactions électrostatiques.

Des études équivalentes sont en cours sur une autre famille enzymatique.

## b) Effet de la pression

Comme tous les autres paramètres physiques, la pression a une influence sur le comportement des protéines. Les effets portent sur la stabilité conformationnelle, l'activité enzymatique ainsi que sur les interactions protéine protéine et protéine solvant.

L'équation de van't Hoff relative aux équilibres chimiques montre la dépendance entre l'énergie libre, l'enthalpie, l'entropie et le volume du système.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \cdot \ln K = \Delta E - P\Delta V - T\Delta S$$

On peut voir que les paramètres température et pression sont donc liés. Température et pression n'ont pas les mêmes effets sur la vitesse de réaction. Dans le cas d'une augmentation de température, la vitesse augmente toujours, alors qu'une augmentation de pression peut accélérer ou ralentir la réaction en fonction du signe de la variation du volume d'activation  $\Delta V^\ddagger$  (Balny and Masson 2003).

Comme c'est le cas avec la température, les interactions faibles qui participent à la cohésion de l'architecture protéique sont influencées par la pression. D'une manière très générale, les effets peuvent être de nature équivalente ou opposée :

Quand P augmente « l'interaction hydrophobe » est défavorisée alors que si T augmente l'interaction se renforce. Quand P augmente les interactions électrostatiques s'affaiblissent, alors qu'elles sont renforcées avec T. Dans le cas de la liaison hydrogène, la liaison se renforce avec l'augmentation de P et s'affaiblit si T augmente.

Il existe quelques rares études portant sur la relation entre température et pression en utilisant des protéines isolées d'organismes hyperthermophiles. En effet, malgré tout l'intérêt fondamental d'une telle description, la littérature n'est pas très abondante à cause des difficultés techniques à mettre en œuvre. Dans le cas de la rubrédoxine de *Pyrococcus furiosus* qui contient de multiples interactions électrostatiques, la protéine est déstabilisée à haute pression (Hei et Clark, 1994). Dans une autre étude portant sur la glutamate déshydrogénase de *Thermococcus litoralis*, il a été montré qu'une pression de 500 atm ralentie fortement la vitesse de désactivation à 90°C par rapport à la mesure faite à 5 atm (Sun *et al.*, 2001). Dans le cas de l'activité enzymatique, des mesures faites à haute pression ont montré une augmentation de l'activité d'une protéase

hyperthermophile (Dr Franzetti, communication personnelle). Ces exemples illustrent la nécessité de continuer à explorer les effets de la pression.

Une demande de financement ANR, qui porte en partie sur l'étude des effets de la pression sur les structures cristallographiques de lactates déshydrogénases adaptées à la température a été déposée (ANR HPRX). La faisabilité des études cristallographiques de sous hautes pressions a été démontré (Girard *et al.*, 2005). Avec les Drs Eric Girard et Richard Kahn de l'IBS, nous étudieront les probables changements conformationnels induits par de hautes pressions, sur une série de LDHs hyperthermophile, mésophile et psychrophile (Coquelle *et al.*, 2007). Nous caractériserons aussi des mutants de la LDH hyperthermophile dont les propriétés thermiques ont été fortement modifiées. Ces mesures devront être complétées par la caractérisation des effets de la pression en solution sur la stabilité conformationnelle, l'activité et sur la dynamique. Ces études additionnelles se feront avec les Drs Patrick Masson du CRSSA et Judith Peters de l'ILL.

Une autre partie du projet concerne une étude fine de la relation structure fonction sous pression de la malate déshydrogénase de l'Archaeon hyperthermophile méthanogène *Methanocaldococcus jannaschii* (Madern, 2000). La structure de l'enzyme a été déterminée (Lee *et al.*, 2001). *M. jannaschii* a été isolé au contact des cheminées hydrothermales à des profondeurs avoisinant les 2500m. Depuis cette découverte, d'autres méthanogènes hyperthermophile et mésophile de surface (*M. vannielii* et *M. maripaludis*) ont été isolé et les séquences de leur MalDH sont accessibles. Nous étudierons les effets comparatifs de la pression sur ces enzymes. S'il existe des différences notables d'effets, nous devrions être capable d'identifier par comparaison de séquence les substitutions spécifiques qui confèrent des propriétés d'adaptation structurale à la pression, car ces enzymes présentes un fort taux de similarité (80%). Par la suite, une telle hypothèse pourra être validée par la construction de variants de plus en plus piezophile d'une MalDH initialement non-piezophile. Ceci serait la première démonstration expérimentale de l'existence d'une contrainte adaptative à la pression sur les protéines.

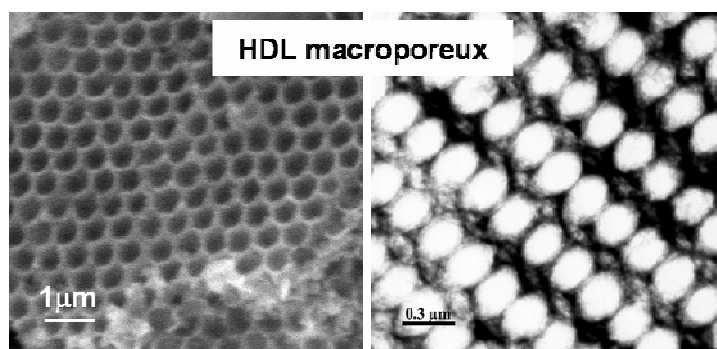
La dernière partie du projet concerne la caractérisation des effets de la pression sur l'organisation du solvant (réseau de 80 molécules) dans la large cavité située entre les sous unités de la malate déshydrogénase halophile de *H. marismortui* (Richard *et al.*, 2000, Irimia *et al.*, 2003).

### c) Nanomatériaux composites HDL-LDH.

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé bio récepteur et un transducteur représentant le mode de détection. Aujourd'hui, le challenge commun dans le développement de ces biocapteurs a pour but la miniaturisation, la diminution du coût et l'amélioration de l'efficacité et de la stabilité des bios systèmes. Le développement de biocapteurs à base de déshydrogénases présente un grand intérêt par exemple pour le dosage du lactate dans le sang (D'auria *et al.*, 2000). L'objectif du projet ANR (Matzymophile), vise à réussir le confinement de LDH dans des matrices mesostructurées électroactives de type Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL) fonctionnelles et d'étendre leur domaine d'activité en particulier aux conditions extrêmes de température. La mise en place de ce projet est le fruit d'un partenariat entre le Laboratoire des Matériaux Inorganique (UMR 6002) représenté par le Pr Claude Forano) et l'IBS. L'enjeu scientifique consiste donc à développer des nouveaux matériaux hôtes mésostructurés de grande surface spécifique permettant la co-immobilisation non dénaturante des LDH et de médiateurs redox. Afin de s'affranchir de la régénération enzymatique du  $\text{NAD}^+$ , l'utilisation d'un médiateur redox est nécessaire. Parmi les matrices de confinement, l'utilisation des polymères a largement été développée toutefois la fixation irréversible des enzymes dans ces matrices nécessite une réticulation chimique par le glutaraldéhyde, réticulation qui limite l'activité enzymatique du système. Par ailleurs en terme de coût et de stabilité dans le temps les polymères présentent des limitations importantes. Plus récemment, le choix de matrices de confinement s'est orienté vers des matériaux de basses dimensionnalités (réseaux 2-D) tels que les argiles, les zirconiums phosphates et les HDL. Parmi ces structures hôtes lamellaires, les HDL présentent des propriétés uniques d'intercalation et d'échange anionique ajustables. Le contrôle de la composition chimique des feuillets ( $[\text{M}^{\text{II}}_{1-x}\text{M}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]^{x+}$ ) (ou M est un métal) et des domaines anioniques inter lamellaires ( $[\text{X}^{\text{q-}}_{x/q} \cdot n\text{H}_2\text{O}]$ ) permet d'assurer une biocompatibilité élevée. Avec une charge positive des feuillets, les HDLs apparaissent comme des matériaux uniques pour l'immobilisation d'enzymes qui présentent, dans la majorité des cas, des charges de surfaces globalement négatives.

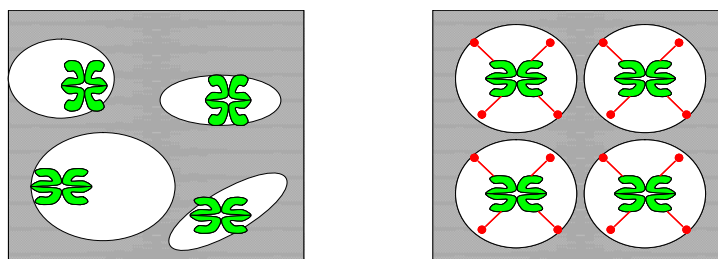
Bien souvent l'activité enzymatique des biomolécules confinées ne dépasse pas quelques % de l'activité obtenue avec une enzyme libre. Ceci est dû à une diminution de la diffusion du substrat ainsi qu'à une réduction de la flexibilité conformationnelle de l'enzyme immobilisé sur son support.

Nous souhaitons améliorer les performances d'un biocapteur en jouant sur des paramètres de nano structuration (taille des pores, etc. voir figure 13). Afin d'y parvenir, nous agirons tout à la fois sur la porosité des HDL, mais aussi sur l'orientation des LDH afin de favoriser l'accès du substrat au site catalytique.



**Figure 13.** Images obtenues en microscopie électronique d'un réseau de macropores ordonnés dans des phases HDL  $Mg_2Al$ .

Puisque les HDL sont des échangeurs anioniques, j'ai proposé une stratégie « d'halo-ingénierie » rationnelle des LDH basée sur la localisation contrôlée des charges de surface. En effet, puisque nous disposons de plusieurs structures de MalDH halophile dont les surfaces sont riches en acides aminés chargés négativement, il doit nous être possible de guider la relocalisation des charges négatives d'une LDH. Nous envisageons de localiser les charges négatives dans des régions non flexibles de l'enzyme. Dans le même temps nous échangerons les acides aminés négatifs par des résidus neutres. Cette stratégie devrait favoriser une fixation de LDH orientée au lieu d'une fixation aléatoire (Figure 14). Dans un deuxième temps, nous construirons des complexes protéiques chimériques de LDH de charge surfacique neutre ou peu chargée négativement et nous leurs grefferons (N-terminal ou C-terminal) des extensions fortement chargées négativement afin d'assurer une immobilisation sans contact direct avec le domaine catalytique. Cette approche sera effectuée sur des LDHs capable de fonctionner à hautes ou basses températures.



**Figure 14.** Schéma illustrant le passage d'un matériau composite (panel gauche) peu structuré et à fixation aléatoire de l'enzyme (vert) à un matériau structuré (panel droit) utilisant une enzyme chimérique à charges électrostatiques délocalisées favorisant une fixation ordonnée.

Différentes combinaisons [LDH mutées et chimériques] – [HDL nano structuré] seront testés. Le processus de développement du capteur (dépôt, conduction du signal ...) se continuera à partir des matériaux hybrides présentant les meilleures performances catalytiques.

Dans une première série de tests nous avons montré qu'il était possible de sonder par dichroïsme circulaire les changements structuraux d'une protéine fixée sur un HDL. Nous avons montré que la liaison de la BSA sur un Mg<sub>4</sub>Al-HDL induisait une modification conformationnelle de la protéine par rapport à la forme libre. Par contre, dans le cas de la liaison d'une LDH hyperthermophile avec le même HDL, les spectres de dichroïsme circulaire de la forme liée et de la forme libre sont équivalents, ce qui suggère qu'il n'y pas eu de modification conformationnelle majeure induite par l'interaction protéine-HDL. Dans une seconde série de mesure, nous avons montré que la capacité de fixation d'un matériau Mg<sub>4</sub>Al-HDL était proportionnelle à la charge négative nette de la protéine.

Nous avons observé qu'une enzyme halophile stable (SrMalDH) très chargée négativement avait une capacité de liaison très efficace (85%). Ceci permet de penser que l'on pourra utiliser ce type d'enzyme, non plus comme objet à immobiliser, mais comme module de fixation et d'orientation pour d'autres enzymes. La stratégie consistera à construire des protéines chimériques utilisant une *Sr* MalDH (avec des mutations spécifiques la rendant inactive) fusionnée avec des protéines d'intérêts.



## **B) Caractérisation d'une nouvelle famille de déshydrogénase à large spectre de reconnaissance de substrats**

Diverses publications relatant la caractérisation de malate déshydrogénases chez certains Archaea hyperthermophiles méthanogènes (Honka *et al.*, 1990, Thomston *et al.*, 1998) rapportent la présence de deux activités enzymatiques Malate déshydrogénase ! Au regard de ma connaissance de la famille LDH/MalDH, de telles observations me semblaient étranges. Dans ces deux publications, une des deux protéines portant l'activité MalDH était bien évidemment un orthologue des MalDHs classiques, alors que l'autre ne présentait aucune homologie de séquence, ce qui supposait l'existence d'une nouvelle famille d'enzymes. A la lecture de ces publications, je me suis rendu compte que des erreurs d'attribution et d'annotation de ces protéines non homologues « polluaient » les banques de données (ncbi) et induisaient donc des erreurs dans les discussions de plusieurs autres publications.

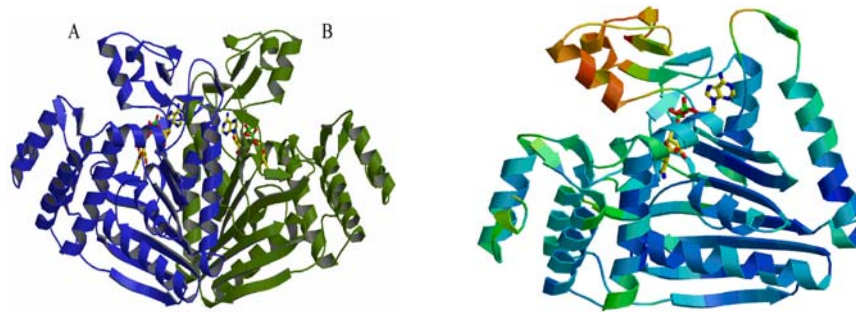
Il m'a semblé qu'une caractérisation plus approfondie était donc nécessaire afin de clarifier la distribution fonctionnelle de ces nouvelles enzymes et d'aller, si possible, vers leur caractérisation structurale.

Au même moment, le groupe de R. White du Virginia Polytechnic Institut qui travaillait sur la méthanogénèse a publié un nouveau cas portant sur la protéine (*ORF Mj0490*) de *Methanocaldococcus jannaschii* (Graupner *et al.*, 2000). Dans cette publication, il fût établi que l'activité principale de cette enzyme était la reconnaissance d'un substrat spécifique des archaea méthanogènes (le sulfolactate) et que l'activité malate déshydrogénase n'était qu'une activité secondaire. Le sulfolactate est un constituant primaire de l'assemblage d'un coenzyme de biosynthèse spécifique des méthanogènes (White, 2001)

J'ai obtenu le clone surexprimant la Sulfolactate déshydrogénase de *M. jannaschii*, afin d'aller vers une description biochimique et structurale plus approfondie. Une partie de ce travail de caractérisation a représenté un des thèmes de recherche de la thèse de Doctorat d'Adriana Irimia que j'ai supervisé conjointement avec le Dr Frédéric Vellieux.

La structure cristallographique de l'enzyme avec le NADH a été résolue à 2,5 Å de résolution. L'unité asymétrique contient un large assemblage octaédrique correspondant à un tétramère de dimères. Le dimère compacte de forme ovoïde à une longueur d'environ 90 Å. Les monomères sont formés de deux domaines principaux (Figure 15).

Le plus grand forme le domaine de liaison du NADH et porte la majorité des résidus du site actif. Le petit domaine, qui recouvre le site actif, a des facteurs d'agitation thermique plus élevés que le domaine de fixation du NADH, ce qui suggère une plus grande mobilité. Le domaine de liaison du NADH est constitué d'un feuillet  $\beta$  central mixte à 7 brins, pris en sandwich entre 3 hélices d'un côté et deux de l'autre.



**Figure 15.** Représentation en ruban du dimère (gauche) et du monomère (droite) de la MJ SLDH

Cette topologie  $\alpha\beta\alpha$ , est différente de celle dite du *Ross Mann Fould* que l'on retrouvait jusqu'alors dans tous les domaines de liaison de cofacteur di-nucléotidique. Un sous domaine en tonneau mixte à 4 hélices complète le domaine de fixation du NADH. Le petit domaine possède une topologie en sandwich à deux couches de type  $\alpha\beta$ . La résolution de la structure tridimensionnelle de la *Mj* SLDH a donc permis de décrire un nouveau type de repliement pour une déshydrogénase utilisant un cofacteur di-nucléotidique. Cette structure, permet la fixation du NADH dans une conformation étendue, très différente de celle observée avec le *Rossmann Fold 5* (Irimia, Madern *et al.*, 2004)

En testant la reconnaissance de toute une série de différents oxo acides par la *Mj* SLDH, et en comparant les résultats avec des données provenant d'une enzyme homologue de *Ralstonia eutropha* (Steinbüchel et Schlegel, 1983), il m'a été possible de démontrer qu'il existait une spécificité de reconnaissance liée à la présence d'une charge négative additionnelle portée à l'extrémité des substrats (Figure 16).

Name	Formula	$V_m/K_m$	<i>Mj</i> SLDH	<i>Re</i> LDH
1. Glyoxylic acid	$\text{H}-\text{C}-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$	0.3	+	
2. Oxo propanedioic acid	$\text{O}=\text{C}-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$	3.5	+	
3. Pyruvic acid	$\text{CH}_3-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	+
4. Sulfolactic acid	$\text{O}_2\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$	10000	+	
5. Oxaloacetic acid	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$	356	+	-
6. Tartaric acid	$\text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	
7. 2-oxo butyric acid	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	+
8. 2-oxo pentanedioic acid	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$	26	+	
9. 2 oxo valeric acid	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	+
10. Keto isoveric acid	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	
11. 2-oxo hexandioic acid	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	
12. 2-keto hexandioic acid	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	
13. 3-methyl oxo valeric acid	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	
14. 4-methyl 2 oxo valeric acid	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$		-	+

**Figure 16.** Reconnaissance de substrats par les enzymes de *M. jananschii* et *R. eutropha*.

Un alignement, de plus de 30 séquences homologues, contraint par de l'information structurale a suggéré qu'un résidu histidine en position 48 localisé dans le site actif devait être le discriminant de la réaction. Peu de temps après avoir publié la description des propriétés de la *Mj* SLDH, la caractérisation d'une enzyme homologue (YiaK) provenant de *E. coli* a démontré que le résidu H 48 était bien impliqué dans la fixation du substrat grâce à une liaison électrostatique (Forouhar *et al*, 2004). Par chance pour les auteurs de ce travail, un adjuvant de la liqueur mère de cristallisation (le tartrate qui présente deux extrémités carboxyliques) était piégé dans le site catalytique !

Une dernière série d'expériences a été entreprise de manière à savoir quel était l'état d'association oligomérique de la *Mj*SLDH en solution. A l'aide de la centrifugation analytique et de la diffusion de neutrons, nous avons testé de nombreuses conditions différentes : concentrations en sels et en protéines, pH, haute température ainsi que les conditions de la liqueur de cristallisation. Dans tous les cas testés, la *Mj* SLDH est un dimère. L'association octamérique correspond vraisemblablement à un état d'association induit (de manière non spécifique ?) par un effet de surconcentration locale dans les gouttes de cristallisation.

La caractérisation biochimique de la SLDH combinée à une analyse évolutive m'ont permis de mettre en lumière et d'expliquer un mécanisme de remplacement de gène non homologue dans certains organismes. Le remplacement de gène non homologue est l'existence d'une transformation chimique catalysée par une enzyme qui n'est pas celle que l'on aurait pu espérer trouver via la transmission de gène orthologues. Par exemple, chez les *pyrococcales*, bien que l'activité MalDH soit présente, il n'y a pas de gène codant pour une LDH-like MalDH. Ce qui est frappant, c'est que si on analyse le génome on peut déterminer l'existence d'un gène codant pour une enzyme ayant une forte similarité avec la *Mj*SLDH! Pourtant, dans un organisme non méthanogène, il n'y a normalement pas de sens (de pression de sélection) pour conserver une enzyme de la famille SLDH, puisque la voie de biosynthèse spécifique du coenzyme méthanogénique FM113, dans lequel la SLDH intervient normalement, n'existe pas. Néanmoins, la sélection d'un gène codant pour une SLDH peut s'expliquer dans un contexte particulier.

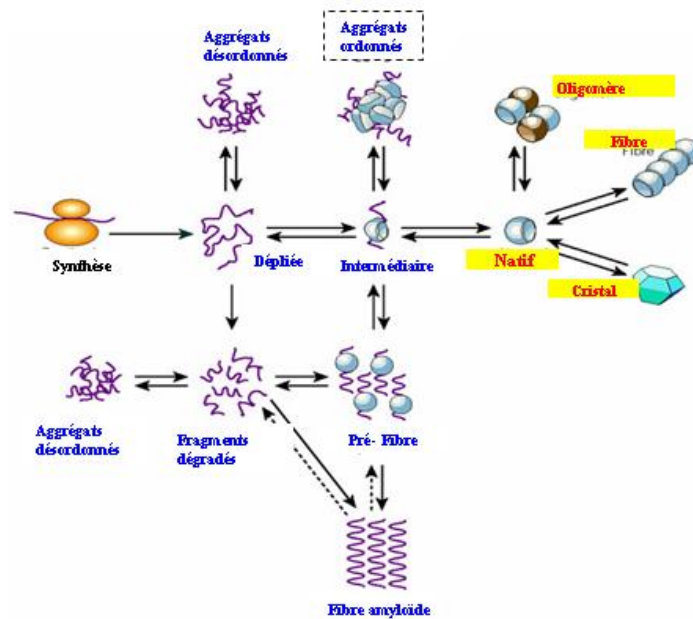
Cette sélection est liée 1) à la perte (ou non transmission) du gène codant pour une MalDH ou une LDH-like MalDH et 2) à la capacité d'une SLDH de reconnaître l'oxaloacétate (en l'absence de son substrat préférentiel le sulfopyruvate), ce qui de fait, la conduit à fonctionner de manière analogue à une MalDH.

Il serait intéressant, à mes yeux, de caractériser biochimiquement et structuralement la SLDH d'un *pyrococcales* afin de voir si sa capacité de reconnaissance a été modifiée ou pas, afin d'être plus spécifique de l'oxaloacétate. Si cela était le cas, la détermination de la structure serait alors une clé de discrimination fine des changements induits par les substitutions sur l'équilibre du paysage conformationnel de cette nouvelle famille enzymatique.

La caractérisation de la SLDH est un des rares cas documenté permettant une explication fine du remplacement de gène non homologue.

### C) La caractérisation d'une protéine incorrectement repliée : un défi structural

Le chemin de repliement et d'association des protéines est présenté dans la figure 17.



**Figure 17.** Chemin général de repliement et d'association d'une protéine. Ligne centrale : de la sortie du ribosome (noir) vers l'état natif et ses divers états d'organisation (rouge), correspond au chemin normal. Les états intermédiaires ou qui divergent du chemin normal sont en bleus.

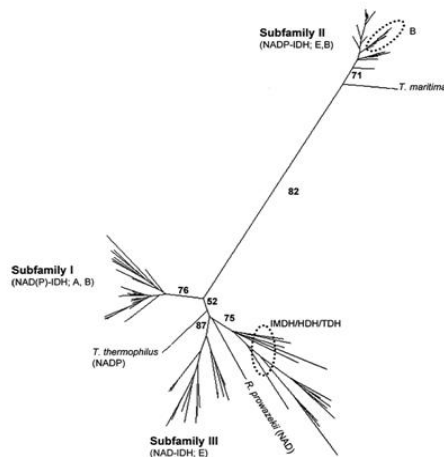
Au cours des dernières années, le nombre de structures de protéines dans l'état natif obtenu soit par cristallographie soit par RMN, n'a cessé de croître. Dans le cas des protéines solubles, on en compte au moins 45000 (Février 2008) dont les coordonnées sont déposées à la PDB. Dans le cas des protéines membranaires, le nombre de structures résolues diminue drastiquement car leur processus de purification et cristallisation sont difficiles à mettre en œuvre. De récents progrès méthodologiques ont permis de décrire quelques rares protéines de type intrinsèquement désordonnées (Bernadó et al., 2005, Bernadó et al., 2007, Houben *et al.*, 2007). Ce sont des protéines qui ne possèdent une structure tridimensionnelle qu'à la suite d'interactions transitoires

avec d'autres protéines (Sánchez-Puig et al., 2005). Il n'existe pas d'information structurale à haute résolution en ce qui concerne les états agrégés des protéines. Ceci est facilement concevable, car pour permettre des études structurales, il convient d'avoir des solutions homogènes ce qui n'est pas le cas des agrégats.

Cependant, des études en solution sur une protéine hyperthermophile me laisse à penser qu'il devrait être possible d'aller vers la première caractérisation structurale d'une protéine incorrectement repliée sous forme d'agrégats ordonnés (Figure 14, encadré en pointillé).

Utopie scientifique ou défi structural ? L'expérimentation tranchera.

Il y a quelques années, j'ai été contacté par le Pr N. K Birkeland de l'Université de Bergen afin d'établir une collaboration de manière à caractériser des isocitrates déshydrogénases provenant d'organismes hyperthermophiles. L'isocitrate déshydrogénase (ICDH) est une enzyme du cycle de Krebs qui avec l'isopropylmalate déshydrogénase (IPMDH), la tartrate déshydrogénase (THT) et l'homoisocitrate déshydrogénase (HDH) forment une famille unique de déshydrogénase  $\beta$ -décarboxylante (Chen et Jeong 2000). De manière spécifique les ICDHs catalysent la déshydrogénation de l'isocitrate pour former de l'oxalosuccinate dans une réaction dépendante de la présence de  $Mg^{2+}$  et de  $NAD(P)^+$ . Comme l'ICDH est une enzyme impliquée dans le métabolisme central, on la trouve dans la plupart des espèces des trois domaines du vivant et même dans les organismes qui ne possèdent pas un cycle complet des acides tricarboxyliques. J'ai contribué à l'analyse phylogénétique de différentes ICDHs et de leurs homologues et caractérisé leurs états oligomériques à l'aide de la centrifugation analytique, de manière à établir une éventuelle corrélation entre degré d'oligomérisation et appartenance à un sous groupe spécifique. La figure 18 montre la relation entre les différentes enzymes de la super famille des déshydrogénase  $\beta$ - decarboxylante (Steen *et al.*, 2001).



**Figure 18.** La sous famille I comprend toutes les ICDHs d'archaea et la plupart des homodimériques bactériennes. La sous famille II contient les ICDHs homodimériques eukaryotes et quelques bactériennes. La sous-famille III est formée par les seules ICDHs hétéro oligomériques eukaryotes.

Les ICDHs se regroupent en trois sous familles distinctes (I, II et III) alors que les IMDHs, HDHs et TDHs forment un clade unique. Toutes les ICDH des Archaea sont des homos dimères NADP<sup>+</sup>-dépendante. Les ICDHs bactériennes sont aussi des homos dimères NADP<sup>+</sup>-dépendante, bien que quelques bactéries contiennent des ICDH monomériques NADP<sup>+</sup>-dépendante. Chez les eucaryotes trois différentes ICDHS ont été identifiées : les homodimères cytosoliques NADP<sup>+</sup>-dépendante, les homodimères mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dépendante et des hétéro oligomériques NAD<sup>+</sup>-dépendante. J'ai participé étroitement, malgré la distance (merci Internet), à l'encadrement de Mikael Karlstöm (étudiant en thèse de cristallographie au Karolinska Institutet de Stockholm, Suède) sur la caractérisation de plusieurs ICDH hyperthermophiles. Les ICDHs de *Pyrococcus furiosus*, *Aeropyrum pernix* et *Thermotoga maritima* ont été étudiées. C'est au cours de la caractérisation de l'enzyme de *T. maritima* dont la structure de la forme dimérique a été résolue (Karlstöm *et al.*, 2006) que je me suis rendu compte que cette enzyme surexprimée dans *E. coli* présentait, des caractéristiques qui déviaient de celles attendues pour une protéine dans l'état natif.

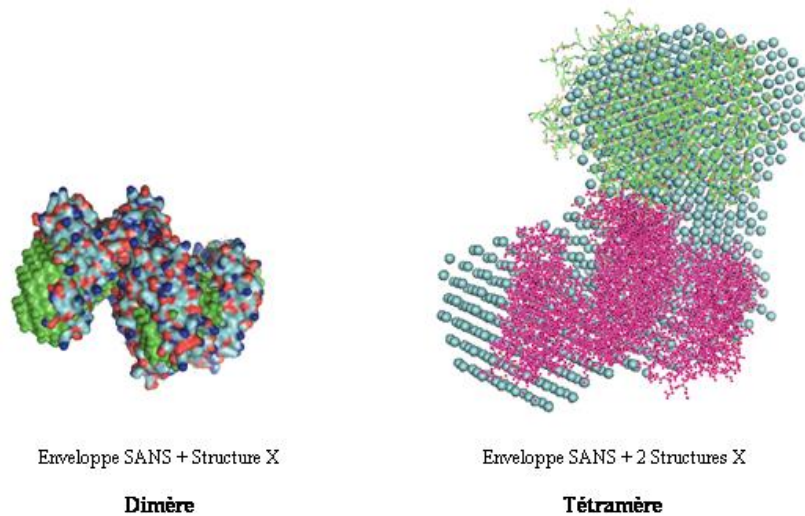
J'ai donc décidé d'entreprendre une caractérisation biophysique pour mettre en lumière les spécificités de l'ICDH de *T. maritima*. En combinant centrifugation analytique et diffraction de neutrons, il a été possible de montrer avec G. Zaccai, que l'ICDH de *T. maritima* existe sous deux formes repliées compactes qui ne sont pas en

équilibre d'association. Ces deux états, un dimère et un tétramère coexistent en solution et sont indépendants. Il est donc possible de les purifier et de montrer que l'espèce dimérique est active alors que l'espèce tétramérique est inactive. Cette étape de purification a permis d'aller vers la cristallisation de l'espèce dimérique et de résoudre sa structure (Karlstöm *et al.*, 2006).

J'ai demandé à Marion Jasnin (étudiante en thèse au LBM) d'entreprendre une caractérisation des deux formes oligomériques en solution. Le rayon de giration ( $R_g$ ) de la forme dimérique (29,2 Å) calculée à partir de la structure et celui mesuré par la diffusion neutronique en solution (30,1 Å) sont en parfait accord. En revanche, le  $R_g$  (44,4 Å) de la forme tétramérique est plus grand de 3 Å par rapport à un modèle que nous avons construit. Cette divergence entre les dimensions et la perte d'activité, nous laissent penser qu'il existe une déformation importante de la structure par rapport à celle observable par cristallographie dans le dimère. De manière à affiner notre représentation du tétramère, nous avons ensuite essayé d'aller vers la définition de l'enveloppe de diffusion afin d'y modéliser l'orientation de deux molécules de la forme dimérique en utilisant la structure cristallographique (Figure 19). Les données, obtenues en utilisant la source neutronique de Jülich au lieu de l'ILL, manquent un peu de résolution et plusieurs solutions de modélisations sont possibles. Néanmoins, nos différents modèles confirment qu'il existe une déformation structurale majeure.

A l'heure actuelle, il n'est donc pas possible de dire comment est exactement organisée la structure quaternaire du tétramère.





**Figure 19.** Partie gauche, comparaison entre l'enveloppe (vert) mesurée par Small Angle neutron scattering et la structure RX du dimère de *Tm* ICDH (bleu et rouge). Partie droite, ajustement entre l'enveloppe SANS du tétramère (billes bleues) et deux dimères RX de *Tm* ICDH (rouge, vert).

A la lumière de nos expériences, je pense qu'il est possible d'affirmer que nous avons réussi à purifier et à caractériser un état structural qui ne correspond pas à celui d'une protéine native repliée et active. Quelques expériences préliminaires suggèrent que le taux d'expression est un facteur essentiel dans la genèse de la forme tétramérique. On peut donc penser que le tétramère de l'ICDH de *T. maritima* correspond vraisemblablement à une protéine incorrectement repliée qui a du échapper au contrôle de repliement protéique effectué par la machinerie des chaperonnes de *E. coli*. Quelques essais de cristallisation ont été entrepris mais n'ont pas été fructueux. Les quantités de l'espèce tétramérique obtenues sont pour l'instant une étape limitante dans la recherche des meilleures conditions de cristallogénèse. De nouveaux efforts de caractérisation en solution combinant la diffusion aux rayons X (à l'ESRF) et aux neutrons (à l'ILL) couplée à de la modélisation seront entrepris afin d'aller vers une description de la structure quaternaire.

## Conclusion

Faire référence au célèbre aphorisme de Theodosius Dobzhansky « Rien en Biologie n'a de sens, sinon à la lumière de l'évolution » permet de comprendre le mécanisme général qui a dicté les processus de sélection décrits dans ce mémoire.

A la lumière des résultats présentés, je pense que la contrainte prioritaire qui s'est exercée, est celle qui consiste à assurer la continuité d'un processus métabolique dans les cellules. Les enzymes sont modifiées, remplacées afin de faire en sorte que rien ne s'interrompe dans une série de transformation chimique, ici le catabolisme du glucose.

- a) Dans le cas des MalDHs, les deux espèces tétramérique ou dimérique sont capables de catalyser la même réaction (avec des efficacités différentes). Face à des contraintes physico-chimiques diverses, les enzymes de chacun de ces groupes ont accumulé des mutations afin de satisfaire une activité catalytique suffisante pour assurer la continuité. Cette adaptation n'est pas forcément optimale (l'évolution n'est pas orientée dans un sens dicté par des considérations biotechnologiques !). On le voit bien avec, par exemple, l'enzyme de *Salinibacter ruber* qui est inhibée à des concentrations cytoplasmiques en KCl. Néanmoins l'enzyme est encore suffisamment active pour assurer une catalyse satisfaisante. Dans le cas précis de l'évolution des gènes orthologues, les mutations ont donc eut pour effet la modification du paysage conformationnel de la protéine. Les barrières énergétiques qui séparent les différents sous états conformationnels sont altérées afin de trouver un compromis entre la stabilité de l'architecture, la flexibilité du site catalytique et les contraintes physico-chimiques de l'environnement.
- b) L'interruption du catabolisme du glucose liée à l'inactivation de la NAD(P)-dépendante Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase quand la concentration en oxygène s'abaisse trop est un phénomène bien décrit. Cette perte d'activité est due à l'absence de régénération du  $\text{NAD}^+$ . La duplication de gène d'une LDH-like MalDH, dont l'une des copies conserve une mutation (Arg vers Gln en position 102) donne un avantage sélectif décisif à une cellule limitée en oxygène. Cette mutation donne « naissance » à une LDH, de ce fait, le pyruvate peut alors être transformé en lactate dans une réaction qui

consomme du NADH et régénère le stock de  $\text{NAD}^+$ . Le processus peut donc se poursuivre dans un environnement fluctuant. Cette sélection des LDHs à partir des MalDHs peut être donc pris comme exemple caractéristique de l'évolution de gènes paralogues. Dans ce cas, c'est le paysage conformationnel du site catalytique qui est modifié par les mutations.

- c) La continuité du processus métabolique impliquant une activité malate déshydrogénase peut même se faire sans les enzymes de type MalDH et LDH-like MalDH en les remplaçant par une enzyme (SLDH) assurant une fonction analogue. Cette observation est caractéristique du phénomène de remplacement de gène non homologue.

## Bibliographie

1. Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Mar;52(Pt 2):485-91.
2. Ausili A, Cobucci-Ponzano B, Di Lauro B, D'Avino R, Perugino G, Bertoli E, Scirè A, Rossi M, Tanfani F, Moracci M. A comparative infrared spectroscopic study of glycoside hydrolases from extremophilic archaea revealed different molecular mechanisms of adaptation to high temperatures. *Proteins*. 2007 Jun 1;67 (4):991-1001.
3. Bai Y, Sosnick TR, Mayne L, Englander SW. Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science*. 1995 Jul 14;269 (5221):192-7.
4. Balny C, Masson P. Structure, dynamique et solvation des systèmes biologiques sous pression. In : *La pression : un outil pour les sciences*. 2003, CNRS éditions.
5. Bernadó P, Blanchard L, Timmins P, Marion D, Ruigrok RW, Blackledge M. A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 22;102 (47):17002-7.
6. Bernadó P, Mylonas E, Petoukhov MV, Blackledge M, Svergun DI. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc*. 2007 May 2;129(17):5656-64.
7. Besir H, Zeth K, Bracher A, Heider U, Ishibashi M, Tokunaga M, Oesterhelt D. Structure of a halophilic nucleoside diphosphate kinase from *Halobacterium salinarum*. *FEBS Lett*. 2005 Dec 5;579(29):6595-600.
8. Boehr DD, McElheny D, Dyson HJ, Wright PE. The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis. *Science*. 2006 Sep 15;313 (5793):1638-42.
9. Bonneté F, Madern D, Zaccai G. Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J Mol Biol*. 1994 Dec 9;244 (4):436-47.
10. Chen R, Jeong SS. Functional prediction: identification of protein orthologs and paralogs. *Protein Sci*. 2000 Dec;9 (12):2344-53.
11. Coquelle N, Fioravanti E, Weik M, Vellieux F, Madern D. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. *J Mol Biol*. 2007 Nov 23;374 (2):547-62.
12. Creighton TE. The energetic ups and downs of protein folding. *Nat Struct Biol*. 1994 Mar;1 (3):135-8.
13. Dalhus B, Saarinen M, Sauer UH, Eklund P, Johansson K, Karlsson A, Ramaswamy S, Bjørk A, Synstad B, Naterstad K, Sirevåg R, Eklund H. Structural basis for thermophilic protein stability: structures of thermophilic and mesophilic malate dehydrogenases. *J Mol Biol*. 2002 May 3;318 (3):707-21.
14. D'Amico S, Marx JC, Gerday C, Feller G. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278 (10):7891-6.
15. D'Auria S, Gryczynski Z, Gryczynski I, Rossi M, Lakowicz JR. A protein biosensor for lactate. *Anal Biochem*. 2000 Jul 15;283 (1):83-8.
16. Di Giulio M. The universal ancestor and the ancestor of bacteria were hyperthermophiles. *J Mol Evol*. 2003 Dec;57 (6):721-30.
17. Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. 1990 Aug 7;29 (31):7133-55. Review.
18. Ebel C, Faou P, Kernel B, Zaccai G. Relative role of anions and cations in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1999 Jul 13;38 (28):9039-47.
19. Falb M, Pfeiffer F, Palm P, Rodewald K, Hickmann V, Tittor J, Oesterhelt D. Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Res*. 2005 Oct;15(10):1336-43.
20. Fedøy AE, Yang N, Martinez A, Leiros HK, Steen IH. Structural and functional properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability. *J Mol Biol*. 2007 Sep 7;372 (1):130-49.
21. Fields PA, Somero GN. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;95 (19):11476-81.

22. Fioravanti E, Vellieux FM, Amara P, Madern D, Weik M. Specific radiation damage to acidic residues and its relation to their chemical and structural environment. *J Synchrotron Radiat.* 2007 Jan;14 (1):84-91.
23. Forouhar F, Lee I, Benach J, Kulkarni K, Xiao R, Acton TB, Montelione GT, Tong L. A novel NAD-binding protein revealed by the crystal structure of 2,3-diketo-L-gulonate reductase (YiaK). *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279 (13):13148-55.
24. Frauenfelder H, Sligar SG, Wolynes PG. The energy landscapes and motions of proteins. *Science.* 1991 Dec 13;254 (5038):1598-603.
25. Fütterer O, Angelov A, Liesegang H, Gottschalk G, Schleper C, Schepers B, Dock C, Antranikian G, Liebl W. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 15;101 (24):9091-6.
26. Girard E, Kahn R, Mezouar M, Dhaussy AC, Lin T, Johnson JE, Fourme R. The first crystal structure of a macromolecular assembly under high pressure: CpMV at 330 MPa. *Biophys J.* 2005 May;88 (5):3562-71.
27. Goward CR, Nicholls DJ. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* 1994 Oct;3 (10):1883-8. Review.
28. Graupner M, Xu H, White RH. Identification of an archaeal 2-hydroxy acid dehydrogenase catalyzing reactions involved in coenzyme biosynthesis in methanoarchaea. *J Bacteriol.* 2000 Jul;182 (13):3688-92.
29. Hei DJ, Clark DS. Pressure Stabilization of Proteins from Extreme Thermophiles. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Mar;60 (3):932-939.
30. Henzler-Wildman KA, Lei M, Thai V, Kerns SJ, Karplus M, Kern D. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature.* 2007 Dec 6;450 (7171):913-6.
31. Honka E, Fabry S, Niermann T, Palm P, Hensel R. Properties and primary structure of the L-malate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. *Eur J Biochem.* 1990 Mar 30;188 (3):623-32.
32. Houben K, Blanchard L, Blackledge M, Marion D. Intrinsic dynamics of the partly unstructured PX domain from the Sendai virus RNA polymerase cofactor P. *Biophys J.* 2007 Oct 15;93(8):2830-44.
33. Irimia A, Ebel C, Madern D, Richard SB, Cosenza LW, Zaccai G, Vellieux FM. The Oligomeric states of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies. *J Mol Biol.* 2003 Feb 21;326 (3):859-73.
34. Irimia A, Madern D, Zaccai G, Vellieux FM. Methanoarchaeal sulfolactate dehydrogenase: prototype of a new family of NADH-dependent enzymes. *EMBO J.* 2004 Mar 24;23 (6):1234-44.
35. Jaenicke R, Böhm G. The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol.* 1998 Dec;8 (6):738-48. Review.
36. Karlström M, Steen IH, Madern D, Fedöy AE, Birkeland NK, Ladenstein R. The crystal structure of a hyperthermostable subfamily II isocitrate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. *FEBS J.* 2006 Jul;273 (13):2851-68.
37. Lee BI, Chang C, Cho SJ, Eom SH, Kim KK, Yu YG, Suh SW. Crystal structure of the MJ0490 gene product of the hyperthermophilic archaeobacterium *Methanococcus jannaschii*, a novel member of the lactate/malate family of dehydrogenases. *J Mol Biol.* 2001 Apr 13;307(5):1351-62.
38. Madern D, Cai X, Abrahamsen MS, Zhu G. Evolution of *Cryptosporidium parvum* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase by a very recent event of gene duplication. *Mol Biol Evol.* 2004 Mar;21 (3):489-97.
39. Madern D, Ebel C, Dale HA, Lien T, Steen IH, Birkeland NK, Zaccai G. Differences in the oligomeric states of the LDH-like L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry.* 2001 Aug 28;40(34):10310-6.
40. Madern D, Ebel C, Mevarech M, Richard SB, Pfister C, Zaccai G. 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.* 2000 Feb 8;39 (5):1001-10.
41. Madern D, Ebel C. Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochimie.* 2007 Aug;89 (8):981-7.

42. Madern D, Pfister C, Zaccai G. Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem.* 1995 Jun 15;230 (3):1088-95.
43. Madern D, Zaccai G. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie.* 2004 Apr-May;86 (4-5):295-303.
44. Madern D, Zaccai G. Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations - effects of temperature, water isotope, cofactor and pH. *Eur J Biochem.* 1997 Oct 15;249 (2):607-11.
45. Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *J Mol Evol.* 2002 Jun;54 (6):825-40.
46. Madern D. The putative L-lactate dehydrogenase from *Methanococcus jannaschii* is an NADPH-dependent L-malate dehydrogenase. *Mol Microbiol.* 2000 Sep;37 (6):1515-20.
47. Oliveira LC, Schug A, Onuchic JN. Geometrical Features of the Protein Folding Mechanism Are a Robust Property of the Energy Landscape: A Detailed Investigation of Several Reduced Models. *J Phys Chem B.* 2008
48. Papaleo E, Pasi M, Riccardi L, Sambì I, Fantucci P, Gioia LD. Protein flexibility in psychrophilic and mesophilic trypsin. Evidence of evolutionary conservation of protein dynamics in trypsin-like serine-proteases. *FEBS Lett.* 2008 Mar 19;582 (6):1008-18.
49. Pineda JR, Callender R, Schwartz SD. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. *Biophys J.* 2007 Sep 1;93 (5):1474-83.
50. Qiu L, Gulotta M, Callender R. Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate. *Biophys J.* 2007 Sep 1;93 (5):1677-86.
51. Richard SB, Madern D, Garcin E, Zaccai G. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry.* 2000 Feb 8;39(5):992-1000.
52. Sánchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR. Human full-length Securin is a natively unfolded protein. *Protein Sci.* 2005 Jun;14 (6):1410-8.
53. Shimizu H, Yokobori S, Ohkuri T, Yokogawa T, Nishikawa K, Yamagishi A. Extremely thermophilic translation system in the common ancestor commonote: ancestral mutants of Glycyl-tRNA synthetase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol.* 2007 Jun 15;369 (4):1060-9.
54. Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:403-33. Review.
55. Solovyova A, Schuck P, Costenaro L, Ebel C. Non-ideality by sedimentation velocity of halophilic malate dehydrogenase in complex solvents. *Biophys J.* 2001 Oct;81 (4):1868-80.
56. Steinbüchel A, Schlegel HG. NAD-linked L (+)-lactate dehydrogenase from the strict aerobic *Halobacterium salinarum*. 2. Kinetic properties and inhibition by oxaloacetate.
57. Sun MM, Caillot R, Mak G, Robb FT, Clark DS. Mechanism of pressure-induced thermostabilization of proteins: studies of glutamate dehydrogenases from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis*. *Protein Sci.* 2001 Sep;10 (9):1750-7.
58. Svergun DI, Richard S, Koch MH, Sayers Z, Kuprin S, Zaccai G. Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95 (5):2267-72.
59. Tehei M, Madern D, Franzetti B, Zaccai G. Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J Biol Chem.* 2005 Dec 9;280 (49):40974-9.
60. Tehei M, Madern D, Pfister C, Zaccai G. Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98 (25):14356-61.
61. Thompson H, Tersteegen A, Thauer RK, Hedderich R. Two malate dehydrogenases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol.* 1998 Jul;170 (1):38-42.
62. Vendruscolo M, Dobson CM. Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2005 Feb 15;363(1827):433-50
63. White RH (2001) Biosynthesis of the methanogenic cofactors. *Vitam Horm* 61, 299-337.
64. Wiwanitkit V. Plasmodium and host lactate dehydrogenase molecular function and biological pathways: implication for antimalarial drug discovery. *Chem Biol Drug Des.* 2007 Apr;69 (4):280-3.
65. Yin Y, Kirsch JF. Identification of functional paralog shift mutations: conversion of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 30;104 (44):17353-7.

66. Zaccai G, Cendrin F, Haik Y, Borochoy N, Eisenberg H. Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol.* 1989 Aug 5;208 (3):491-500.
67. Zaccai G. How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science.* 2000 Jun 2;288 (5471):1604-7.
68. Zeth K, Offermann S, Essen LO, Oesterhelt D. Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of *Halobacterium salinarum* DpsA in its low- and high-iron states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 21;101 (38):13780-5.