

# Table des matières

<b>Introduction générale : Extrêmozymes ; Enzymes de l'extrême</b> .....	1
1. Structure et stabilité des enzymes.....	2
2. Température et vie .....	3
3. Enzymes via extrêmozymes : propriétés structurales.....	4
4. Biotechnologie des extrêmozymes .....	5
5. Références bibliographiques .....	6
<b>Chapitre I : Les Enzymes Adaptées au Froid : Synthèse Bibliographique</b> .....	8
1. Introduction.....	9
2. Le défi de la température basse .....	10
3. Fonction d'enzyme dans les systèmes à faible activité de l'eau .....	11
4. L'activité adaptée au froid .....	12
4.1 Thermolabiles et enzymes instables .....	12
4.2 Le Concept de la flexibilité .....	13
4.3 La flexibilité globale contre la flexibilité locale .....	15
4.4 La dynamique du site actif .....	17
4.5 L'écart adaptatif et l'optimisation adaptative de l'affinité du substrat .....	17
4.6 Énergétique de l'activité à froid .....	19
4.7 Optimiser l'électrostatique comme stratégie de l'adaptation au froid .....	22
5. La stabilité conformationnelle des enzymes psychrophiles .....	22
5.1 Études micro calorimétriques .....	22
5.2 L'origine structurale de la basse stabilité .....	25
5.2.1 Interactions Hydrophobes .....	26
5.2.1.1 L'hydrophobie du cœur .....	26
5.2.1.2 L'hydrophobie de la surface .....	27
5.2.2 L'hydrophilie de surface .....	28
5.2.3 Interactions Électrostatiques .....	29
5.2.3.1 Liaisons hydrogène .....	30
5.2.3.2 Interactions induites par l'arginine .....	30
5.2.3.3 Interactions aromatiques .....	31
5.2.3.4 Ponts salins .....	31

5.2.4	Éléments de la structure secondaire .....	32
5.2.5	Boucles de la surface .....	33
5.2.6	Autres facteurs .....	34
6.	Relation entre l'activité, la flexibilité, et la stabilité .....	35
6.1	Aperçus expérimentaux .....	35
6.2	L'évolution dirigée .....	37
6.3	Exceptions Notables .....	37
7.	Les enzymes psychrophiles en Biotechnologie .....	38
7.1	La thermolabilité dans la biologie moléculaire .....	38
7.2	L'activité à basse température .....	39
7.3	Nouvelles spécificités dans les enzymes psychrophiles .....	40
7.4	Autres protéines psychrophiles en biotechnologie .....	41
8.	Références bibliographiques .....	42
 <b>Chapitre II : L'enzyme Adaptée au Froid : Endonucléase I</b> .....		57
1.	Introduction .....	58
2.	Similarité des séquences et composition .....	60
3.	Propriétés enzymatiques .....	62
3.1	La dépendance en sel .....	62
3.2	pH optimal .....	62
3.3	La dépendance en température .....	62
3.4	Etude cinétique .....	62
3.5	Energie d'activation .....	64
3.6	Stabilité thermique .....	64
4.	Conclusion .....	65
5.	Références bibliographiques .....	67
 <b>Chapitre III : Méthodes de Calcul</b> .....		69
1.	Introduction .....	70
2.	Energie et forces .....	72
3.	Potentils d'énergie entre atomes liés et voisins .....	72
4.	Potentils d'énergie entre atomes non liés .....	75
5.	Paramétrisation du champ de force .....	76
6.	Description du solvant .....	77
7.	Calcul d'une trajectoire de dynamique moléculaire .....	80
7.1	Equations .....	81
7.2	Calcul de la trajectoire .....	82

7.3 Traitement des limites du système et les conditions périodiques .....	83
7.4 Paramètres thermodynamiques .....	84
7.4.1 Contrôle de la température .....	85
7.4.2 Contrôle de la pression .....	86
7.5 Calcul des forces électrostatiques : Sommation d'Ewald .....	87
8. Construction du système .....	89
9. Analyse des trajectoires .....	90
9.1 RMSD .....	90
9.2 RMSF .....	90
9.3 RDF .....	91
9.4 La durée de vie des liaisons hydrogène .....	91
10. Références bibliographiques .....	94

**Chapitre IV : Dynamique Moléculaire de l'Effet de Sel sur l'Enzyme Psychrophile *Vibrio Salmonocida Endonucléase I (VsEndA)* .....**

1. Introduction .....	99
2. Objectif du chapitre .....	101
3. Résultats .....	101
3.1 Stabilité structurale .....	101
3.2 Flexibilité structurale .....	102
3.3 Les fonctions de distribution radiales .....	105
3.4 Nombre des contacts .....	109
3.5 Durée de vie des liaisons hydrogène .....	113
4. Conclusion .....	114
5. Références bibliographiques .....	116

**Chapitre V : Dynamique Moléculaire de l'Effet de Sel sur l'Enzyme Mésophile *Vibrio Cholerae Endonucléase I (VcEndA)* .....**

1. Introduction .....	119
2. Objectif du chapitre .....	120
3. Résultats .....	120
3.1 Stabilité du modèle .....	120
3.2 Flexibilité structurale .....	121
3.3 Les fonctions de distribution radiales .....	123
3.4 Durée de vie des liaisons hydrogènes .....	129
4. Conclusion .....	130
5. Références bibliographiques .....	132

<b>Chapitre VI : Dynamique Moléculaire de l'Effet de la Température Sur la Paire d'Enzyme VsEndA et VcEndA</b> .....	133
1. Introduction .....	134
2. Objectif du chapitre .....	135
3. Résultats .....	136
3.1 Stabilité structurale globale .....	137
3.2 Flexibilité structurale .....	139
3.3 Fonctions de distribution radiales .....	142
3.3.1 RDF de l'enzyme VsEndA .....	142
3.3.2 RDF de l'enzyme VcEndA .....	148
3.4 Durée de vie des liaisons hydrogène .....	151
3.4.1 L'enzyme psychrophile VsEndA .....	151
3.4.2 L'enzyme mésophile VcEndA .....	153
4. Conclusion .....	154
5. Références bibliographiques .....	155
<b>Conclusion générale</b> .....	157
<b>Annexe I : Structure des 20 acides aminés</b> .....	160
<b>Annexe II : Charges atomiques partielles des résidus étudiés</b> .....	162
<b>Annexe III : L'algorithme de LINCS</b> .....	166



# Introduction : Extrêmozymes ;

## Enzymes de l'extrême

Les enzymes sont des protéines bio catalytiques qui accélèrent la vitesse des réactions biologiques de  $10^6$  à  $10^{23}$  fois par rapport aux réactions non catalysées. Un certain nombre d'enzymes ont été isolées d'organismes pour une variété de processus industriels et pour la recherche scientifique. Glucose isomérase, amylase, lipase et les protéases sont utilisés dans une variété de nourriture, boissons, savon et dans l'industrie du détergent, tandis que, Taq polymérase, T4 lysozyme, ribonucléase et malate déshydrogénase sont des enzymes utilisées dans les laboratoires de recherche <sup>[1]</sup>.

Une limitation majeure de la plupart des enzymes utilisées dans les industries /laboratoires de recherches est qu'ils sont très instables même sous la température ambiante sans parler des conditions extrêmes de température, de pression et du pH. Mais la vie existe dans les conditions extrêmes de l'environnement, comme les glaciers, les sources chaudes, les mers profondes et la mer morte. Ainsi le métabolisme et la nature d'enzymes de ces organismes, collectivement appelés extrémophiles, vont probablement nous aider à comprendre et manipuler la stabilité des protéines. Ainsi il y a non seulement un besoin de chercher des enzymes d'extrémophiles, mais aussi de comprendre la base de la tolérance apparaissant de manière naturelle chez les extrêmozymes, à la température élevée ou le pH, à fin que les enzymes mésophiles peuvent être conçus pour se comporter comme les extrêmozymes.

# 1. Structure et stabilité des enzymes

Une structure générale d'une enzyme est décrite dans la Figure 1.

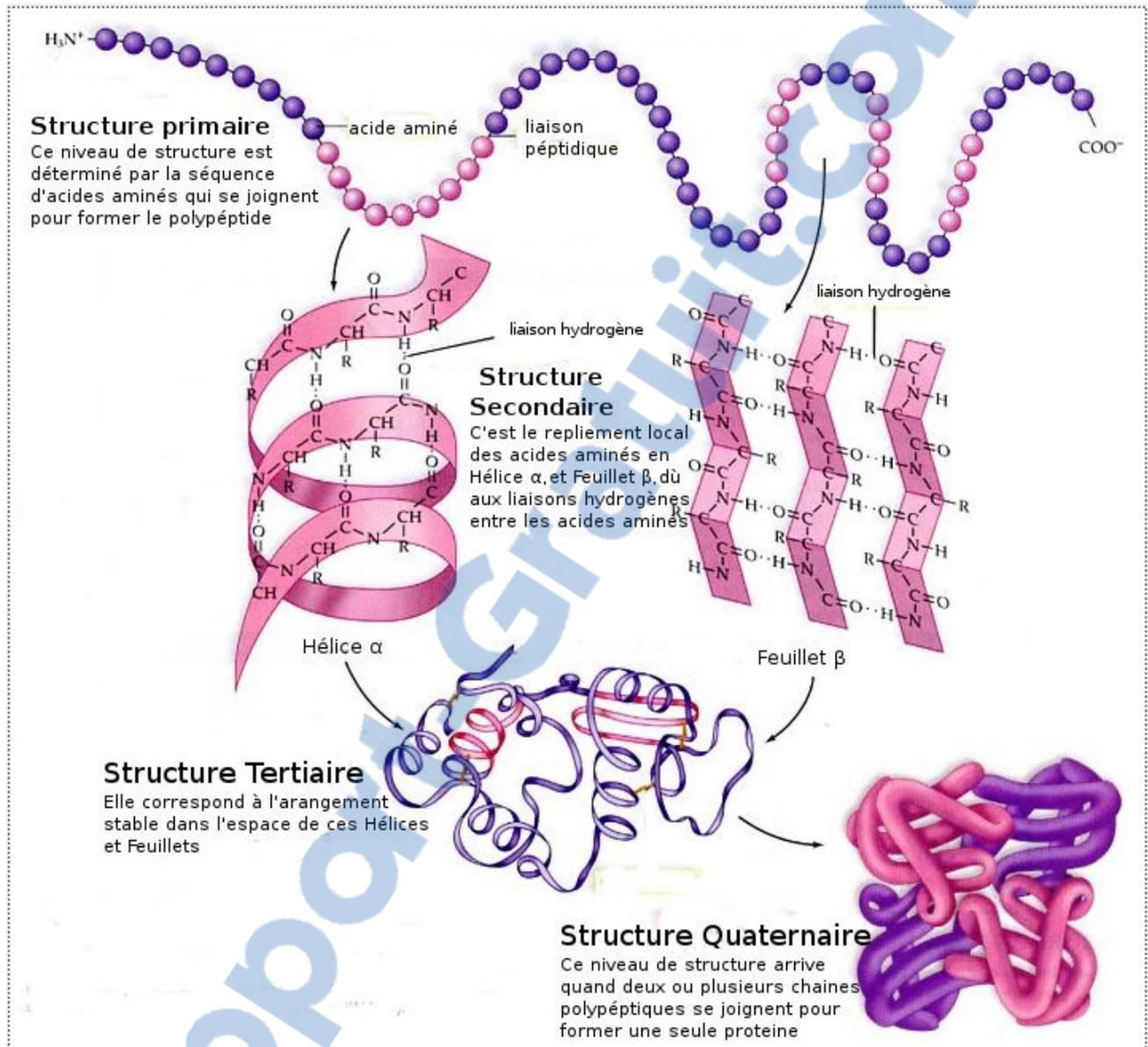


Figure 1 : Structure d'une protéine.

Les enzymes sont composées d'un ordre linéaire d'acides aminés alignés les uns contre les autres par une liaison peptidique ; on parle alors de structure primaire des enzymes (Fig. 1). Les chaînes latérales d'acides aminés (chargé, polaire, apolaire et hydrophobe) interagissent entre elles en raison des forces physiques (liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes, électrostatiques et celles de Van der Waals) s'exerçant entre elles et adoptent une conformation locale pour former des structures secondaires. Ces structures secondaires entrent à nouveau en interaction, et se plient dans une structure tridimensionnelle avec la disposition spatiale de ses chaînes latérales, pour

former la structure tertiaire. La structure tertiaire est acquise en diminuant l'énergie libre (10-15 Kcal.mol<sup>-1</sup>) en raison de la liaison disulfure et d'autres interactions physiques. Parfois deux polypeptides différents (des sous-unités) ayant une structure tertiaire, interagissent dans l'espace et forment une structure stable appelée la structure quaternaire. C'est dans les formes structurales tertiaire et quaternaire que les enzymes sont fonctionnelles pour catalyser les réactions dans les conditions physiologiques.

## 2. Température et vie

Le domaine d'extrémophiles est remarquablement divers (Tableau 1). Certains extrémophiles sont adaptés aux températures extrêmes. Ceux-ci incluent les thermophiles (aiment la chaleur), les hyper thermophiles (comprenant les archaeas et les bactéries qui grandissent aux températures en dessus de 80°C), et les psychrophiles tolérants au froid, qui incluent non seulement des microbes, mais les protoctists, les algues et quelques vertébrés comme icefish Antarctique, et *Chaenocephalus aceratus*.

Tableau1: Quelques extrémophiles <sup>[2]</sup>

Paramètres environnementaux	Description
<b>Température</b>	
Psychrophile	Température optimale de croissance $\leq 15^{\circ}\text{C}$ , maximum $\sim 20^{\circ}\text{C}$ , minimum $\geq 0^{\circ}\text{C}$
Psychrotrophe	Peut croître à ou en dessous de $5^{\circ}\text{C}$ , maximum $25^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$
Mésophile	Température optimale de croissance approx. $37^{\circ}\text{C}$ , peut croître de $8^{\circ}\text{C}$ ou $10^{\circ}\text{C}$ à $45^{\circ}\text{C}$ ou $50^{\circ}\text{C}$
Thermophile	Croît à $> 50^{\circ}\text{C}$
Hyperthermophile	Croît à $> 80^{\circ}\text{C}$
<b>pH</b>	
Acidophile	Croît à $\text{pH} < 2$
Alkaliphile	Croît à $\text{pH} > 10$
<b>Salinité</b>	
Halophile	Les halophiles extrêmes (archaea) ont besoin de 2.5 M - 5.0 M de sel pour la croissance. Les halophiles modérés peuvent croître dans jusqu'à 15-20% de NaCl.

Les extrêmes thermiques les plus grandes pour la croissance surviennent chez l'archaea. *Pyrolobus fumarii* détient le record à présent pour le plus thermophile des micro-organismes. Il vit dans les murs de 'fumeur noire' des cheminées de bouches hydrothermales, avec une limite supérieure de température pour la croissance de 113°C, et il ne peut pas grandir en-dessous de 90°C. L'organisme a de nouvelles propriétés métaboliques, et il est capable de survivre à l'auto-clavage pendant une heure à 121°C <sup>[3]</sup>. Une limite supérieure de température pour la survie est imposée par la dénaturation des protéines et des acides nucléiques, ainsi d'une augmentation de la fluidité membranaire avec l'élévation de température.

Les Archaeas ont des lipides membranaires uniques avec des liaisons éther, et les chaînes d'hydrocarbures sont des polymères basés sur le monomère isoprène. Ils contiennent des tetraethers et des diethers, susceptibles d'être un facteur contribuant majeur dans la capacité des hyper-thermophiles à résister aux températures qui pourraient détruire les membranes composées d'une structure de double couche basée sur des acides gras et le glycérol <sup>[4]</sup>. De plus, ils sont entourés par une surface (S)-couche de glycoprotéines, qui aident l'archaea à maintenir l'intégrité structurelle sous les extrêmes de température, de pH, ou de la salinité.

Les thermophiles sont plus commun que les hyperthermophiles et ceux-ci incluent une vaste gamme de micro-organismes, y compris les bactéries photosynthétiques, divers eubacteria (par exemple, bacille, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *thermus* spp., bactéries d'acide lactique, actinomycetes, spirochetes et beaucoup d'autres genres) et de nombreux archaea.

À l'autre extrémité du spectre thermique, la limite inférieure de la température trouvée jusqu'ici pour les colonies microbiennes actives est -20°C dans la phase liquide de la glace de mer <sup>[5]</sup>, bien que les bactéries survivent au stockage dans l'azote liquide à -196°C. Les microbes adaptés au froid, connus sous le nom de psychrophiles, ont colonisés les habitats à basse température qui couvrent la plupart de la planète, y compris les régions polaires, les montagnes, et les eaux de mer profondes. Les vrai psychrophiles ont des températures optimales de croissance de 15°C ou moins : les psychotrophes sont plus thermiquement adaptable et peuvent grandir aux températures relativement basses ou aux températures plus appropriées aux micro-organismes mésophiles (Tableau 1).

### 3. Enzymes via extremozymes : propriétés structurales

Les différences structurales entre les protéines d'extrêmophiles et ceux de mésophiles sont souvent subtiles. Cela n'est pas surprenant, étant donné que les mêmes acides aminés et les forces intramoléculaires sont utilisés dans la construction des protéines, peu importe dans quel environnement un organisme vit. Un équilibre précis entre les interactions hydrophobes, hydrostatiques et covalentes, doivent être maintenues pour une enzyme à fin de rester active dans les conditions extrêmes. En plus du maintien de la stabilité, une enzyme doit conserver sa conformation active, et rester assez flexible pour se lier aux substrats et cofacteurs et effectuer sa fonction désignée. Ainsi, même si une enzyme puisse survivre à une exposition aux conditions dures, elle peut présenter peu ou pas d'activité dans ces conditions. Cette distinction est importante dans les applications industrielles dans lesquelles les conditions de fonctionnement peuvent varier; les conditions doivent permettre à l'enzyme de rester assez actives pour respecter les exigences du processus, mais pas d'excéder la limite supérieure de la stabilité de l'enzyme.

### 4. Biotechnologie des extrêmozymes

La découverte des polymérases d'ADN thermostables et leur impact sur la recherche, la médecine, et l'industrie a souligné les avantages potentiels d'enzymes d'environnements extrêmes [6]. Depuis ce temps, la demande biotechnologique et industrielle d'enzymes stables fonctionnant dans des conditions opérationnelles dures a fortement augmenté. Beaucoup d'effort actuel vise à examiner pour les nouvelles sources, de nouvelles enzymes capables de fonctionner dans des conditions extrêmes. Le développement parallèle d'outils de biologie moléculaires sophistiqués a aussi permis la conception d'enzymes avec de nouvelles propriétés utilisant des techniques comme la *mutagenèse dirigée*, le *réarrangement génétique*, l'*évolution dirigée*, les *modifications chimiques* et l'*immobilisation* [7-8].

## 5. Références bibliographiques

1. S. Kumar. Enzyme Vs Extremozyme, What makes extremozymes function under harsh conditions? Resonance, March 1998.
2. Irwin, J. A., Baird, A. W. (2004). Extremophiles and their application to veterinary medicine. Irish Veterinary Journal 57: 348-354.
3. Blochl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbrandl, D., Jannasch, H.W. and Stetter, K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of Archaea extending the upper temperature limit for life to 113°C. Extremophiles 1: 14-21.
4. Bullock, C. (2000). The Archaea - a biochemical perspective. Biochemical and Molecular Biology Education 28: 186 – 191.
5. Deming, J.W. (2002). Psychrophiles and Polar Regions. Current Opinion in Microbiology 5: 301-309.
6. Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles 4: 91–98.
7. Kurkal-Siebert, V., Daniel, R. M., L Finney, J., Tehei, M., Dunn, R. V., Smith, J. C. (2006). Enzyme hydration, activity and flexibility: A neutron scattering approach. J Non-Cryst Solids 352: 4387–4393.
8. Siddiqui, K. S., Bokhari, S. A., Afzal, A. J., Singh, S. (2004). A novel thermodynamic relationship based on Kramers theory for studying enzyme kinetics under high viscosity. IUBMB Life 56: 403–407.

**Chapitre I :**  
**Les Enzymes Adaptées au Froid ;**  
**Synthèse Bibliographique**

## 1. Introduction

La biosphère de la terre est principalement froide et de manière permanente exposée aux températures en dessous de 5°C<sup>[1]</sup>. Une telle température moyenne basse, résulte principalement du fait que 71 % de la surface de la terre est couverte par les océans, qui ont une température constante de 2-4°C en dessous de 1000 m de fond, sans tenir compte de la latitude.

Les régions polaires comptent pour un autre 15 %, auxquels le glacier et les régions alpines doivent être ajoutés aussi bien que le permafrost, représentant plus de 20 % de sols terrestres<sup>[2, 3]</sup>. Bien qu'inhospitaliers, tous ces biotopes basse température ont été avec succès colonisés par une large diversité de microbes et incluent les représentants des bactéries, Eucarya et Archaea<sup>[4]</sup>. La plupart des micros organismes isolés d'environnements froids sont soit des psychrotolérants (aussi nommé psychrotrophes) ou des psychrophiles. Les organismes psychrotolerants se développent bien aux températures près du point de congélation de l'eau, mais ont les taux de croissance les plus rapides en dessus 20°C, tandis que les organismes psychrophiles deviennent les plus rapides à une température de 15°C ou plus bas, mais ne peuvent pas grandir en dessus de 20°C.

Sans tenir compte de la manière dont ils peuvent être définis, les micros organismes 'psychro' sont adaptés au froid et exposent des propriétés nettement différentes des autres classes thermiques (par exemple thermophiles). De tels micro-organismes ne survivent simplement pas à de telles conditions extrêmement inhospitalières, mais sont irréversiblement adaptés à ces environnements, comme la plupart des psychrophiles qui ne peuvent pas se développer à température modérée (température mésophile).

La vie dans les environnements froids exige un large éventail de caractéristiques adaptatives à presque tous les niveaux de l'architecture et de la fonction cellulaire. Cependant, un déterminant clé de ces adaptations se trouve dans la fonction de la protéine qui conduit le métabolisme microbien et le cycle cellulaire. Les études antérieures de psychrophiles au niveau moléculaire ont été principalement concentrées sur des enzymes actives à froid parce que cet aspect a été considéré comme un pré requis à l'adaptation environnementale. On a montré que le haut niveau de l'activité spécifique aux températures basses des enzymes adaptées au froid, est une adaptation clé pour compenser la diminution exponentielle dans les vitesses des réactions chimiques, quand la température est abaissée. Une telle activité bio catalytique élevée résulte de la disparition des interactions de stabilisation non-covalentes diverses, aboutissant à une flexibilité améliorée de la conformation de l'enzyme<sup>[5-7]</sup>.

Comme une image générale, les enzymes psychrophiles ont tous fait face à une contrainte principale, être actif aux températures basses, mais les manières pour atteindre ce but sont tout à fait diverses. Il devrait être noté que cette caractéristique adaptative est génétiquement codée dans la séquence de la protéine et résulte d'une sélection à long terme.

## 2. Le défi de la température basse

Le défi pour une enzyme thermophile est facilement compris : rester stable et active aux hautes températures. Par contre, le défi pour une enzyme psychrophile est plus subtil.

Les températures basses réduisent fortement la vitesse de presque toutes les réactions catalysées par les enzymes, et de plus, elles ralentissent les mouvements moléculaires associés à la fonction de la protéine. En ce qui concerne l'activité,  $k_{\text{cat}}$  la constante catalytique correspond au nombre maximal de molécules de substrat converties en produit, par site actif et par unité de temps. La dépendance de la température de la constante de vitesse catalytique est donnée par la relation :

$$k_{\text{cat}} = \kappa \frac{k_{\text{B}}T}{h} e^{-\Delta G^{\#}/RT} \quad (1)$$

Dans cette équation,  $\kappa$  est le coefficient de transmission généralement proche de 1,  $k_{\text{B}}$  est la constante de Boltzmann ( $1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $h$  est la constante de Planck ( $6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ),  $R$  la constante des gaz parfait ( $8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), et  $\Delta G^{\#}$  l'énergie libre d'activation ou la variation de l'énergie de Gibbs entre le complexe activé  $\text{ES}^*$  enzyme-substrat et l'état fondamental  $\text{ES}$ .

En conséquence, la constante d'activité  $k_{\text{cat}}$  dépend exponentiellement de la température. En règle générale, pour une réaction biochimique catalysée par une enzyme mésophile (de bactéries ou d'animaux à sang chaud), une baisse dans la température de  $37^{\circ}\text{C}$  à  $0^{\circ}\text{C}$  permettra de réduire l'activité de 20 à 80 fois<sup>[8]</sup>. Ceci est le facteur principal empêchant la croissance d'organismes non adaptés aux températures basses.

L'effet de température sur l'activité des enzymes psychrophiles et mésophiles est illustré dans la Figure (1)<sup>[8]</sup>. L'équation (1) est seulement valable pour la hausse exponentielle de l'activité avec la température sur la partie gauche des courbes. On a proposé des modèles pour simuler les effets de l'inactivation par la chaleur sur l'activité<sup>[9-11]</sup>, et prendre en considération la viscosité du milieu<sup>[6]</sup>. Cette figure révèle au moins deux caractéristiques de base pour l'adaptation au froid, (i) Pour compenser les vitesses de réaction lentes aux températures basses, les psychrophiles synthétisent des enzymes ayant une activité spécifique jusqu'à dix fois plus élevée dans cet intervalle de température. C'est en fait l'adaptation physiologique principale au froid au niveau de l'enzyme. (ii) La température pour l'activité maximale apparente pour les enzymes actives au froid est déplacée

vers les températures basses. Représentant la stabilité faible de ces protéines et leur dépliage et inactivation à températures modérées.

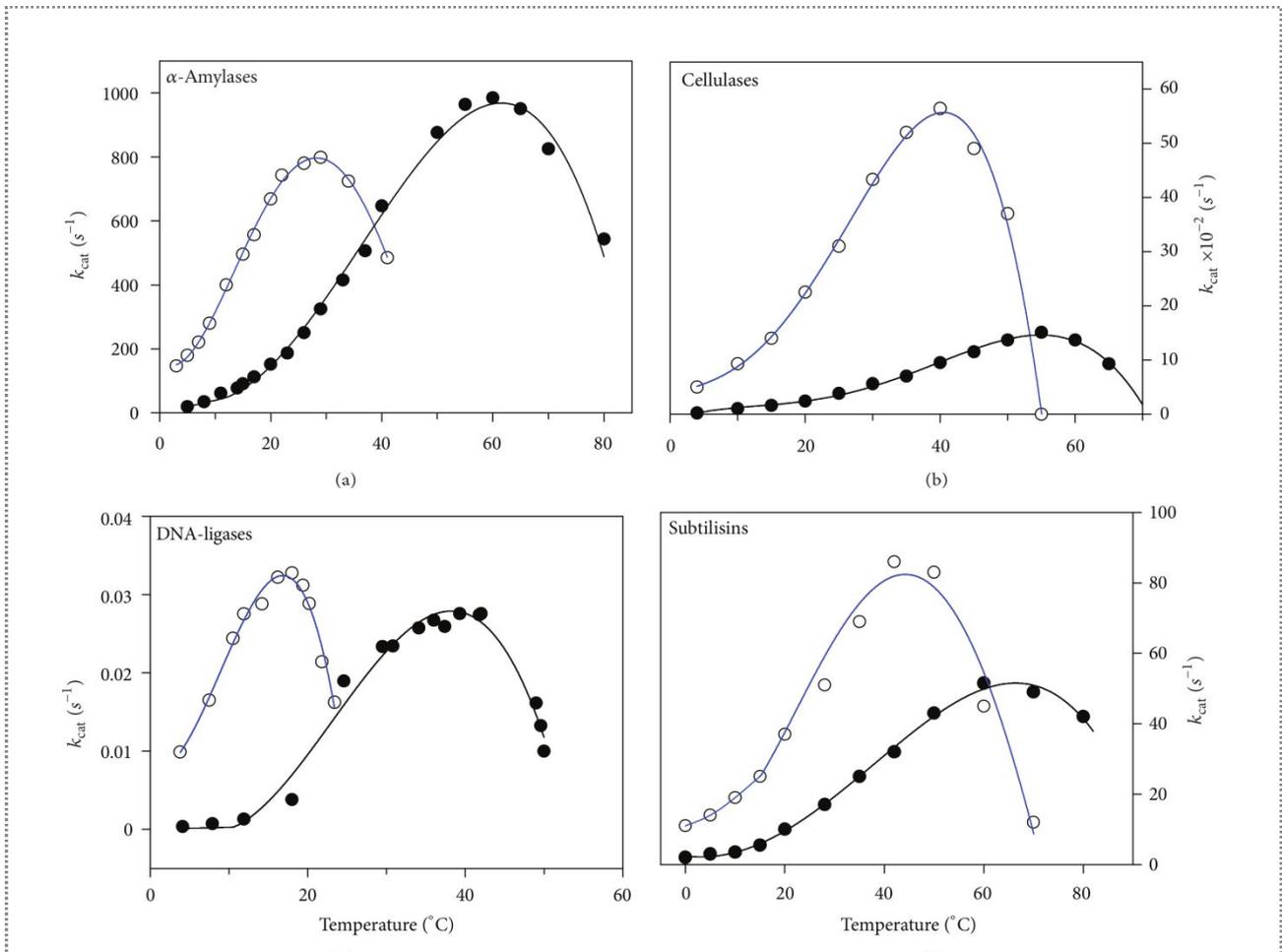


Figure 1 : La variation de l'activité selon la température [8]. L'activité des enzymes psychrophiles (symboles creux, ligne bleue), et mésophiles (symboles pleins) enregistrée à différentes températures.

### 3. Fonction d'enzyme dans les systèmes à faible activité de l'eau

Les températures froides affectent aussi d'une façon critique les propriétés et les structures d'enzymes, aussi bien que l'eau environnante. Les températures froides affectent l'activité dynamique de l'ensemble des molécules d'eau, aussi bien que les sphères d'hydratation entourant la surface de la protéine [12]. Puisque l'eau agit comme lubrifiant, facilitant la dynamique de la liaison hydrogène amide-carbonyl, qui est la plus essentielle du peptide, les effets d'eau dépendent fortement de la température [13, 14]. La dépendance entre la force des liaisons hydrogènes aqueuses et la température n'est ni linéaire, ni mono tonifiante, mais unimodale, avec la densité maximale pour l'eau pure approximativement à 4  $^{\circ}C$ . Les liaisons hydrogènes rompues se trouvent dans l'eau haute

densité, tandis que les réseaux forts de liaisons hydrogènes se trouvent dans l'eau à basse densité [14].

La déficience ou la perturbation des liaisons hydrogènes et des réseaux d'eau autour de la protéine peuvent être liés avec la perte d'activité biologique et la dénaturation des protéines aux températures basses [15]. Lorsque la température diminue, les molécules d'eau entourant la surface de la protéine deviennent plus ordonnées et ainsi moins associées à la protéine, finalement poussant l'équilibre du système vers l'état déplié ou dénaturé. Ce changement de la structure de protéine est dû à une augmentation des énergies d'hydratation des groupes non-polaires à basses températures [16, 17].

Les énergies d'hydratation d'enzymes actives à froid sont généralement moins affectées par la température inférieure, et leur basse hydrophobie inhérente du coeur est moins sensible que les protéines mésophiles, gardant leurs structures plus intactes [18]. En effet, les protéines actives à froid peuvent se maintenir plus fermement à l'eau disponible, ce qui entraîne une augmentation de l'interaction avec le solvant et contribue pour assurer l'activité catalytique à basse température [6].

Dans ce contexte, une étude de bio informatique des contacts d'acides aminés qui diffèrent entre des protéines adaptées aux températures différentes, qui inclue presque 400 protéines psychrophiles, a révélé que les interactions avec le solvant à la surface de la protéine jouent un rôle important dans l'adaptation à la température [19].

## 4. L'activité adaptée au froid

### 4.1 Thermolabiles et enzymes instables

La plupart des enzymes psychrophiles partagent au moins une propriété: une activité thermolabile, sans tenir compte de la stabilité structurelle de la protéine. En outre, le site actif semble être l'élément structurel le plus thermolabile de ces protéines [20-23]. La figure 2 illustre cette différence significative entre la stabilité du site actif et la stabilité de la structure. Le panneau inférieur montre la stabilité de la structure telle qu'enregistrée par la fluorescence.

Comme attendu, la structure de l'enzyme active à froid est moins stable que celle du mésophile et des homologues thermophiles. Dans le panneau supérieur, l'activité est enregistrée dans les mêmes conditions expérimentales, et on peut voir que les enzymes mésophiles et thermophiles démarrent la désactivation thermique quand la protéine commence à se déplier. En revanche, l'activité de l'enzyme active à froid disparaît avant que la protéine ne se déplie. Cela signifie que le site actif est même plus thermolabile que la structure de la protéine entière. Tous ces aspects

indiquent un site actif très instable et flexible et illustrent un concept central dans l'adaptation au froid : Les augmentations locales de la flexibilité au niveau du site actif sont responsables de l'activité élevée mais thermolabile <sup>[24]</sup>, tandis que d'autres régions de l'enzyme pourraient ou pas être caractérisées par la stabilité basse, lorsqu'elles ne participent pas à la catalyse <sup>[25]</sup>. Par exemple, l'Anhydrase carbonique psychrophile <sup>[26]</sup> et isocitrate déshydrogénase <sup>[27]</sup> sont des enzymes fortement stables, mais avec, une plus grande flexibilité dans les régions entraînant la catalyse.

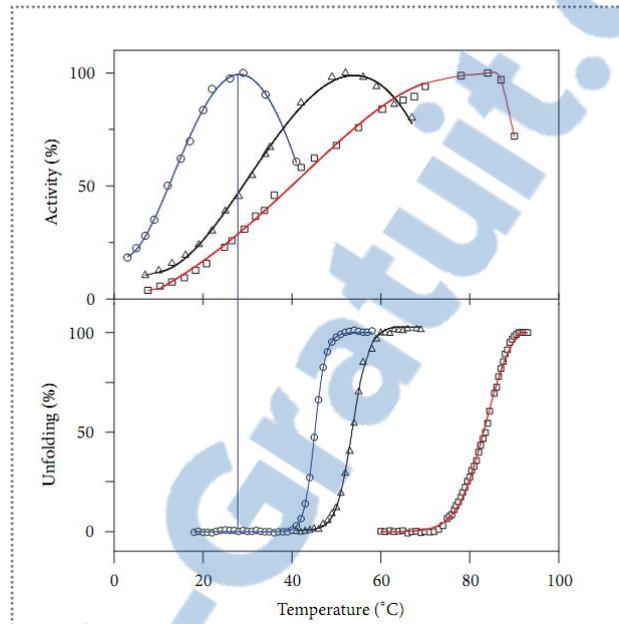


Figure 2 : La désactivation et le dépliement des enzymes psychrophiles <sup>[14, 28]</sup>. L'activité de la plupart des enzymes psychrophiles (panneau supérieur, courbe bleue) est désactivée par la température avant le dépliement de la structure de la protéine (panneau inférieur), illustrant la thermolabilité très marquée du site actif. En revanche, la désactivation des enzymes mésophiles (courbes noir) ou thermophiles (courbes rouge) correspond étroitement au début du dépliement de la protéine.

## 4.2 Le Concept de la flexibilité

Dans certains cas, les acides aminés impliqués dans la catalyse sont conservés entre les homologues froid et thermostable, illustrant que les causes de la flexibilité doivent résider dans d'autres parties de l'enzyme <sup>[24,28]</sup>.

On peut considérer deux types de flexibilité : statique et dynamique <sup>[29, 30]</sup>. La flexibilité statique peut être approximée par les techniques qui fournissent la mobilité moyenne des chaînes latérales d'acides aminés, comme les facteurs de température B (l'évaluation de l'occupation obtenue à partir des cartes de densité électroniques moyennées sur la population et sur le temps), à partir des structures radiographiques RX <sup>[31]</sup> et de l'échange hydrogène/deutérium (H/D). L'échange H/D mesure l'accessibilité d'un acide aminé au solvant et est proportionnel à la vitesse de l'échange des protons de l'enzyme avec le deutérium du solvant <sup>[18, 29, 32, 33]</sup>.

Sur la base des B-facteurs d'un grand ensemble de structures haute résolution, les acides aminés ont été classifiés comme rigide (WYFCIVHLMA) ou flexible (GTRSNQDPEK) (Annexe I), avec la flexibilité augmentant de W à K <sup>[34]</sup>. On a mentionné que le B-facteur moyen pour l'enzyme adaptée au froid malate déshydrogénase était plus bas que son homologue thermophile <sup>[35]</sup>. Cependant, les B-facteurs étaient deux fois plus élevés pour les régions impliquées par la fixation du cofacteur et du substrat.

Dans une autre étude, on a rapporté que les B-facteurs étaient invariables dans les homologues de psychrophiles, mésophiles et thermophiles <sup>[29]</sup>. Quand l'échange H/D a été comparé entre LDH-A 4 issu du poisson adapté au froid et celle de l'eau chaude, aucune différence n'a été observée à 2° C (indiquant une flexibilité équivalente) <sup>[18]</sup>. Cependant, à 23 °C, la vitesse de l'échange H/D était plus élevée pour LDH-A 4 du poisson d'eau froide, ce qui implique une flexibilité plus importante pour l'enzyme adaptée au froid. Pour la déshydrogénase 3-isopropylmalate adaptée au froid, l'échange H/D n'est pas en faveur d'un niveau élevé de flexibilité statique <sup>[33]</sup>.

La flexibilité dynamique est mesurée par l'extinction de fluorescence dynamique (dynamic fluorescence quenching) <sup>[20, 22, 36]</sup> et par la protéolyse par coupure (proteolytic nicking) <sup>[37]</sup>. Pour une enzyme flexible, le désactiveur (l'acrylamide étant le plus fréquemment utilisé), infiltrera la partie intérieure de la structure et diminuera la fluorescence du résidu TRP, donnant ainsi un indice élevé de perméabilité <sup>[22, 36]</sup>. La perméabilité fournit une mesure de toutes les conversions conformationnelles mesurées en moyenne sur une échelle de temps qui est suffisante pour permettre au désactiveur de se répandre dans l'enzyme <sup>[22]</sup>. En d'autres termes, cette technique donne une idée de tous les processus d'ouverture conformationnelle arrivant dans la protéine entière, et mesurés en moyenne sur une large durée de temps, et elle a été appliquée avec succès aux  $\alpha$ -amylases <sup>[22]</sup>, l'ADN ligases <sup>[20]</sup> et les protéases  $\text{Ca}^{2+} \text{Zn}^{2+}$  <sup>[29, 38]</sup>. La perméabilité de la protéine s'est avérée plus importante pour les enzymes adaptées au froid.

La protéolyse par coupure est utilisée pour identifier les régions flexibles dans les isocitrate déshydrogénases chimères, élaborées à partir des homologues adaptés au froid et thermostables <sup>[39]</sup>. L'étude a confirmé que les composants tirés du psychrophile contiennent des régions plus flexibles (plus de coupure) que ceux du mésophile.

### 4.3 La flexibilité globale contre la flexibilité locale

La détermination de la flexibilité moléculaire est complexe dans la mesure où elle nécessite la définition des types et des amplitudes de mouvements atomiques aussi bien d'une échelle de temps pour ces mouvements <sup>[40-42]</sup>. Néanmoins, diverses études biophysiques ont révélé une conformation moins compacte d'enzymes psychrophiles, subissant des micros dépliages fréquents.

Dans ce contexte, la première approche expérimentale est apparemment le travail pionnier de Privalov <sup>[43]</sup> indiquant une analyse vaste de la structure du collagène d'organismes adaptés aux températures différentes (comprenant du poisson de l'arctique ou de l'antarctique) et utilisant la cinétique de l'échange hydrogène/deutérium pour mesurer la flexibilité. L'auteur a conclu que la corrélation entre la température physiologique et la stabilité du collagène peut être expliquée par un niveau défini de mobilité de la structure de la protéine, exigé pour son bon fonctionnement sous les températures physiologiques. Ceci suggère que l'ajustement de la flexibilité conformationnelle est un événement clé dans l'adaptation thermique des protéines <sup>[18, 44, 45]</sup>. De telles différences de flexibilité ont reçu un appui supplémentaire par la quantification de la dynamique macromoléculaire dans la protéine entière des bactéries psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles, par la diffusion des neutrons <sup>[46]</sup>. La spectroscopie des neutrons fournit un outil unique pour étudier les mouvements atomiques thermiques dans les macromolécules, parce que les longueurs d'ondes et les énergies du neutron correspondent aux amplitudes et aux fréquences du mouvement, respectivement <sup>[46, 47]</sup>. Ces expériences ont en effet révélé que la résistance (l'équivalent de la rigidité macromoléculaire en termes d'une constante de force) augmente avec les températures physiologiques.

En outre, on a aussi montré que les amplitudes de fluctuation atomiques (l'équivalent de la flexibilité macromoléculaire) étaient semblables pour chaque micro-organisme à sa température physiologique. Ceci est pleinement en accord avec le concept de Somero ; "l'état correspondant" ("corresponding state") <sup>[48]</sup>, postulant que les protéines homologues présentent des flexibilités comparables pour accomplir leur fonction biologique à leurs températures physiologiquement pertinentes.

Un certain nombre d'études ont abordé ce problème. Est ce que les protéines adaptées au froid ont une flexibilité accrue dans l'ensemble de leur structure (la flexibilité globale), ou bien elles ont des régions distinctes de flexibilité locale ?

Dans plusieurs études, le caractère psychrophile a été relié à une flexibilité globale dans l'ensemble de la structure de la protéine. Des études sur une  $\alpha$ -amylase de *Pseudoalteromonas*

haloplanktis a montré que la stratégie de l'adaptation au froid pour cette enzyme se traduit par une structure uniformément instable <sup>[49]</sup>. La mutagenèse dirigée et la comparaison avec l'enzyme mésophile et thermostable  $\alpha$ -amylase, ont démontré un affaiblissement d'interactions intramoléculaires, quimèment à une diminution globale de la stabilité thermique de la protéine psychrophile. Dans le cas de la Métalloprotéine de la famille des thermolysines, une optimisation de la flexibilité globale de la protéine est réalisée via la réduction de la stabilité des liaisons hydrogènes dans la structure dynamique en raison d'une diminution des acides aminés qui forment ces liaisons hydrogènes <sup>[50]</sup>.

On a pu montrer que la flexibilité globale peut favoriser la haute activité et la basse stabilité des enzymes adaptées au froid; cependant, elle peut aussi faciliter le repliement incorrect de ces dernières <sup>[51]</sup>. Les études des formes de type sauvage et mutante de AHA, qui démontrent que l'enzyme est capable de subir le dépliement réversible à deux états, confirment l'hypothèse que la structure de AHA est uniformément flexible <sup>[22, 32, 51, 52]</sup>.

Les simulations de dynamique moléculaire d'une protéase d'un mésophile (savinase) qui a été conçue pour contenir une structure de boucle qui est présente dans une protéase d'un psychrophile (subtilisine), confirment aussi l'idée qu'un gain au niveau du caractère psychrophile est accompagné par une augmentation globale de la flexibilité <sup>[53]</sup>.

On prévoit que la flexibilité locale, par opposition à la flexibilité globale, joue un rôle central dans l'activité des enzymes froids <sup>[24, 25]</sup>. Cette flexibilité locale a été d'abord suggérée par la structure 3D de la trypsine active à froid <sup>[54]</sup> et observée plus tard dans les études de stabilité des enzymes psychrophiles montrant que, dans quelques cas, le domaine structural portant le site actif est moins stable que le reste de la protéine <sup>[23, 55-58]</sup>. Ceci a été mis en évidence également par les études d'échange hydrogène/deutérium d'un alcool déshydrogénase psychrophile <sup>[59]</sup>. On a montré que les régions fonctionnelles impliquées dans la fixation du substrat et du cofacteur présentent une flexibilité plus élevée comparée à un thermophile homologue, et de plus, cette flexibilité locale peut être découplée de la stabilité thermique globale. Cette flexibilité locale était aussi corrélée avec les paramètres d'activité <sup>[26, 33, 60-62]</sup>.

Plusieurs structures radiographiques d'enzymes psychrophiles ont aussi indiqué une flexibilité locale au niveau, ou autour du site actif, aussi bien que dans des régions fonctionnelles <sup>[27, 63-68]</sup>. En outre, des simulations de dynamique moléculaire mettaient fréquemment en évidence la flexibilité locale comme une stratégie pour l'adaptation au froid <sup>[62, 69-79]</sup>. Une étude récente d'une famille d'élastase <sup>[73, 80]</sup> a montré que les régions de boucle regroupées autour du site actif sont caractérisées

par une flexibilité accrue dans l'enzyme adaptée au froid, et quelques régions dispersées éloignées des sites fonctionnels sont plus rigides dans l'enzyme adaptée au froid.

La nécessité pour une flexibilité globale ou bien locale fait encore débat. Les enzymes présentant une flexibilité globale traitent fréquemment de grands substrats, impliquant vraisemblablement des mouvements concertés des molécules entières, tandis que la flexibilité locale est généralement observée pour des enzymes agissant sur de petits substrats <sup>[6]</sup>. Il y a, cependant, trop d'exceptions pour conclure définitivement.

#### 4.4 La dynamique du site actif

L'activité thermolabile des enzymes psychrophiles suggère que la dynamique des chaînes latérales fonctionnelles au niveau du site actif soit accrue pour contribuer à l'activité à froid. Ce point de vue est fortement soutenu par les propriétés enzymatiques d'enzymes actives à froid.

Les enzymes psychrophiles non spécifiques acceptent divers substrats et ont une spécificité plus large que leur homologues mésophiles, parce que les substrats avec des conformations ou des tailles légèrement distinctes, peuvent s'ajuster et se lier au site. Par exemple, les différences observées de la spécificité du substrat entre les élastases issues du saumon atlantique et des mammifères, ont été interprétées sur la base d'une poche de liaison un peu plus large et plus profonde pour l'élastase adaptée au froid <sup>[81]</sup>.

La large spécificité d'un psychrophile ; alcool déshydrogénase, qui oxyde l'alcool grand et volumineux, a été aussi assignée à un site actif fortement flexible <sup>[82]</sup>. Cette dynamique du site actif en solution a été aussi bien démontrée par une  $\alpha$ -amylase psychrophile <sup>[83]</sup>. Étant plus flexible, le site actif peut facilement recevoir les polysaccharides macromoléculaires, et est plus actif sur ces substrats qu'un homologue mésophile. En revanche, le site actif flexible s'accommode moins efficacement des oligosaccharides courts, et est moins actif sur ces substrats.

#### 4.5 L'écart adaptatif et l'optimisation adaptative de l'affinité du substrat

En conséquence de la dynamique accrue du site actif dans les enzymes actives à froid, les substrats se lient moins fermement au site de liaison (si aucunes mutations ponctuelles n'ont eu lieu) ce qui engendre des valeurs de  $K_m$  (constante de Michaelis ; elle correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximum) plus élevées. Un exemple est donné dans le tableau 1 montrant qu'une  $\alpha$ -amylase psychrophile est plus active sur ses substrats macromoléculaires, tandis que les valeurs de  $K_m$  sont jusqu'à à 30 fois plus grandes ; C'est-à-dire l'affinité pour les substrats est jusqu'à à 30 fois plus

basse. L'idéal serait qu'une adaptation fonctionnelle au froid aurait pour effet d'optimiser tant  $k_{cat}$  que le  $K_m$ . Cependant, une étude des données disponibles sur les enzymes psychrophiles indique que l'optimisation du rapport  $k_{cat} / K_m$  est loin d'une règle générale, mais au contraire que la majorité d'enzymes actives à froid augmentent la valeur de  $k_{cat}$  au détriment de  $K_m$ , menant donc aux valeurs sous optimales du rapport  $k_{cat} / K_m$ , comme le montre également le tableau 1.

Par exemple, de hautes valeurs de  $K_m$  ont été rapporté pour les enzymes psychrophiles; aspartate carbamoyl-transférase [84, 85], triose-phosphate isomérase [86], la subtilisine [87], le lactate déshydrogénase [24, 68], l'ADN ligase [88], facteur d'allongement Tu [89], glutamate déshydrogénase [90,91],  $\alpha$ -amylase [92], dihydrofolate réductase [93, 94], cellulase [95], endonucléase I [96], aspartate amino-transférase [97], isocitrate déshydrogénase [39], xylanase [98], ornithine carbamoyltransférase [99], citrate synthase [100], purine nucleoside phosphorylase [101], protéines de la boîte Dead [102] et l'acétate kinase [103]. Il y a en fait une pression évolutive pour augmenter le  $K_m$ , à fin de maximiser la vitesse de la réaction globale. Un tel écart adaptatif du  $K_m$  a été bien illustré par le lactate déshydrogénase du poisson antarctique [24] et par le psychrophile  $\alpha$ -amylase [92].

Tableau 1 : Paramètres cinétiques pour l'hydrolyse des polysaccharides à 25°C par les enzymes  $\alpha$ -amylases psychrophile et mésophile [8, 83].

Substrat	$\alpha$ -amylase psychrophile			$\alpha$ -amylase mésophile		
	$k_{cat}$ s <sup>-1</sup>	$K_m$ mg L <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> L	$k_{cat}$ s <sup>-1</sup>	$K_m$ mg L <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> L
Starch	663	155	4.3	327	41	8.0
Amylopectin	636	258	2.5	222	53	4.2
Amylose	2148	178	12.1	700	36	19.4
Dextrin	716	586	1.2	311	61	5.1
Glycogen	491	1344	0.3	193	46	4.2

Plusieurs enzymes, particulièrement dans certains poissons adaptés au froid, contrebalancent cet écart adaptatif du  $K_m$  à fin de maintenir ou améliorer l'affinité de liaison pour le substrat, par des substitutions d'acide aminé dans le site actif [81, 104]. La raison fondamentale à ces enzymes pour réagir contre l'écart est évidente en considérant la fonction de régulation associée au  $K_m$ ,

particulièrement pour des enzymes intracellulaires. La deuxième raison est liée à la dépendance de la température des interactions faibles.

La fixation du substrat est une étape particulièrement sensible à la température, parce à la fois la géométrie de la fixation, ainsi que les interactions entre le site de liaison et le ligand sont gouvernés par des interactions faibles, ayant des dépendances parfois opposées à la température.

Les interactions hydrophobes se forment endothermiquement et sont affaiblies par une diminution dans la température. En revanche, les interactions de nature électrostatique (les paires d'ion, les liaisons hydrogènes et les interactions de Van der Waals) se forment exothermiquement et sont stabilisées aux températures basses. Donc, les températures basses ne réduisent pas seulement l'activité de l'enzyme ( $k_{cat}$ ), mais peuvent aussi sévèrement modifier le mode de liaison du substrat, selon le type d'interaction impliquée. Un exemple compréhensif est fourni par la chitobiase active à froid : les substitutions dans le site de liaison du substrat ont tendance à remplacer des résidus hydrophobes (trouvés dans le chitobiase mésophile) par des résidus polaires qui peuvent effectuer des interactions plus fortes à basse température <sup>[55]</sup>.

#### 4.6 Énergétique de l'activité à froid

En se référant à l'équation (1), l'activité élevée des enzymes adaptées au froid correspond à une diminution de l'énergie libre d'activation  $\Delta G^\ddagger$ . Deux stratégies ont été mises en évidence pour réduire la hauteur de cette barrière d'énergie.

La figure 3 illustre la première stratégie, où une pression évolutive augmente le  $K_m$  pour maximiser la vitesse de réaction.

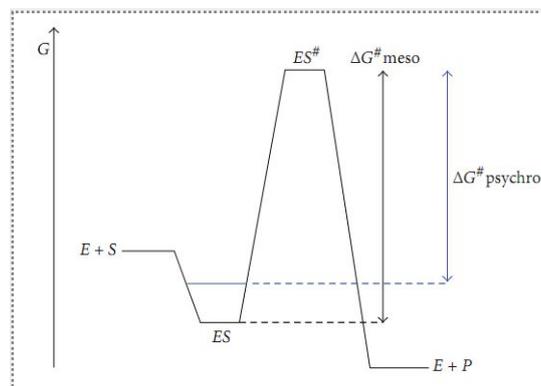


Figure 3 : Optimisation de l'activité par la diminution de l'affinité du substrat pour les enzymes psychrophiles <sup>[8, 125]</sup>. Profile réactionnel d'une réaction à catalyse enzymatique avec le changement de l'énergie de Gibbs sous concentration saturante en substrat. Une faible fixation du substrat (en bleu) diminue l'énergie d'activation ( $\Delta G^\ddagger_{psychro}$ ), et par conséquent, augmente la vitesse de réaction.

Selon la théorie de l'état de transition, quand l'enzyme rencontre son substrat, le complexe enzyme-substrat ES chute dans un puits (fosse) d'énergie. Pour que la réaction se produise, un état activé ES\* doit être atteint, qui se décompose (se rompt) finalement en enzyme et produit. La hauteur de la barrière d'énergie entre l'état fondamental ES et l'état de transition ES\* est défini comme l'énergie libre d'activation  $\Delta G^\ddagger$  : plus cette barrière est basse, plus l'activité est élevée comme l'indique l'équation (1). Dans le cas des enzymes actives à froid présentant une affinité faible pour le substrat, le puit d'énergie pour le complexe ES est moins profond (en pointillé dans la Figure 3).

Il s'ensuit que l'ampleur de la barrière d'énergie est réduite et donc l'activité est augmentée. Ce lien thermodynamique entre l'affinité et l'activité est valable pour la plupart des enzymes (extrêmophiles ou pas) dans la saturation des concentrations en substrat, et ce lien semble être impliqué dans l'amélioration de l'activité aux températures basses dans de nombreuses enzymes actives à froid [24,99, 105].

La deuxième stratégie et la plus générale, concerne la dépendance en température de la réaction catalysée par des enzymes actives à froid. L'énergie libre d'activation  $\Delta G^\ddagger$  contient à la fois les termes enthalpique et entropique selon la relation classique de Gibbs-Helmholtz :

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (2)$$

En conséquence, l'équation (1) peut être réécrite comme suit :

$$k_{cat} = \frac{K_B T}{h} e^{-(\Delta H^\ddagger / RT - \Delta S^\ddagger / R)} \quad (3)$$

L'équation (3) montrent que, à la fois,  $\Delta H^\ddagger$  et  $\Delta S^\ddagger$  ont le potentiel de changer  $k_{cat}$ . Le Tableau 2 rapporte les contributions enthalpique et entropique à l'énergie libre d'activation dans les  $\alpha$ -amylases extrêmophiles. Des données semblables ont été rassemblées pour d'autres enzymes psychrophiles [20, 21, 25, 68, 95, 96, 106, 107]. L'enthalpie d'activation  $\Delta H^\ddagger$  illustre la dépendance entre l'activité et la température ; plus cette valeur est basse, plus basse est la variation de l'activité avec la température. La valeur basse trouvée pour presque toutes les enzymes psychrophiles démontrent que leur vitesse de réaction est moins réduite que les autres enzymes, quand la température est abaissée. En conséquence, on peut considérer que la diminution de l'enthalpie d'activation dans la réaction enzymatique des enzymes psychrophiles, comme une caractéristique adaptative principale aux basses températures [24,105].

Tableau 2 : Paramètres d'activation de la réaction d'hydrolyse des  $\alpha$ -amylases à 10°C [8,22].

	$k_{\text{cat}}$	$\Delta G^\#$	$\Delta H^\#$	$T\Delta S^\#$
	$\text{s}^{-1}$	$\text{Kcal mol}^{-1}$	$\text{Kcal mol}^{-1}$	$\text{Kcal mol}^{-1}$
Psychrophile	294	13.3	8.3	-5.0
Mésophile	97	14.0	11.1	-2.9
Thermophile	14	15.0	16.8	1.8

Cette diminution est structurellement réalisée par une diminution dans le nombre des interactions dépendantes de l'enthalpie qui doivent être rompues pendant les étapes d'activation. Ces interactions contribuent aussi à la stabilité de la conformation repliée de la protéine, et en conséquence, le domaine structurel de l'enzyme portant le site actif devrait être plus flexible. Ainsi, le complexe substrat-enzyme à l'état fondamental (ES) réside dans une distribution plus large d'états conformationnels que le complexe activé ; l'état de transition de l'enzyme ( $ES^\#$ ).

Il est intéressant de noter qu'une telle interprétation macroscopique de la basse enthalpie d'activation dans les enzymes actives à froid, va avec l'observation expérimentale d'une activité manifestement thermolabile illustrée dans la Figure 2. Le Tableau 2 montre que la contribution entropique  $T\Delta S^\#$  pour l'enzyme active à froid est plus grande et négative. Ceci a été interprété comme une grande réduction du désordre apparent entre l'état fondamental avec sa conformation relativement desserrée, et l'état de transition bien organisé et compact [25]. L'activité thermolabile des enzymes actives à froid suggère une interprétation macroscopique pour ce paramètre thermodynamique. En conséquence d'une flexibilité du site actif, le complexe substrat-enzyme (ES) occupe une distribution plus large d'états conformationnels, traduits par l'entropie accrue de cet état, comparé à celui du mésophile ou du thermophile. Cette supposition a reçu un fort support expérimental [23,108]. En outre, une distribution plus large de l'état fondamental (ES) devrait être accompagnée par un substrat de faible force de la liaison du substrat, comme en effet observé pour de nombreuses enzymes psychrophiles.

Finalement, il devrait être mentionné que les paramètres d'activation typiques d'enzymes psychrophiles sont bien reproduits par les simulations des réactions cinétiques [109].

## 4.7 Optimiser l'électrostatique comme stratégie de l'adaptation au froid

De plus, les différences de potentiels électrostatiques dans et autour du site actif d'enzymes psychrophiles, semblent être un paramètre crucial pour l'activité aux températures basses. Des potentiels électrostatiques de surface produits par les groupements chargés et polaires, sont un composant essentiel du mécanisme catalytique à différents niveaux : comme le potentiel s'étend jusqu'au milieu, un substrat peut être orienté et attiré avant que n'importe quel contact entre l'enzyme et le substrat ne se produise.

Il est intéressant de noter que, le citrate synthase actif à froid <sup>[64]</sup>, malate déshydrogénase <sup>[35]</sup>, l'uracil-ADN glycosylase <sup>[110-112]</sup> l'élastase <sup>[69]</sup> et la trypsine <sup>[81, 113, 114]</sup> sont caractérisées par des différences marquées de potentiels électrostatiques près de la région du site actif, comparé à leur homologues mésophiles ou thermophiles, qui peuvent faciliter l'interaction avec le ligand. Dans le cas du malate déshydrogénase, par exemple, le potentiel positif accru au niveau, et autour du site de liaison ; l'oxaloacétate, et le potentiel de surface négative, significativement diminuée au niveau de la région NADH de liaison, peut faciliter l'interaction des ligands possédant des charges opposées, avec la surface de l'enzyme <sup>[35]</sup>. Dans tous les cas, les différences ont été causées par des substitutions discrètes dans les résidus chargés non conservés, aboutissant à un potentiel électrostatique local différant tant dans le signe que l'ampleur. L'implication des potentiels électrostatiques dans l'activité froide a été aussi soutenue par une étude de mutation <sup>[115]</sup>.

## 5. La stabilité conformationnelle des enzymes psychrophiles

Les nombreux aperçus pour des relations étroites entre l'activité et la stabilité dans les enzymes psychrophiles ont suscité une étude de leur stabilité conformationnelle en comparaison avec leur homologues mésophiles et thermophiles. La faible stabilité thermique des protéines adaptées au froid, connue depuis des décennies, a été mise en évidence par des techniques diverses comme la spectroscopie de fluorescence intrinsèque (la figure 2). Cependant, l'énergétique de la stabilité de structure a été essentiellement révélée par la microcalorimétrie <sup>[20, 21, 23, 49, 92, 106, 116, 117]</sup>.

### 5.1 Études micro calorimétriques

Les enregistrements micro calorimétriques du dépliement induit par la chaleur pour des protéines psychrophiles, mésophiles et thermophiles, sont montrés dans la figure 4. Ces enzymes montrent clairement des schémas de stabilité distincts, qui évoluent, d'un profil simple dans les protéines psychrophiles instables, à un profil plus complexe dans les homologues thermophiles très stables.

Le dépliement des enzymes adaptées au froid se produit aux températures plus basses, comme indiqué par la température de demi-dénaturation  $T_m$ , donné par le sommet de la transition.

L'enthalpie calorimétrique  $\Delta H_{cal}$  (la zone sous les courbes dans la figure 4) qui correspond à la quantité de chaleur absorbée pendant le dépliement, reflète l'enthalpie de rupture des liaisons impliquées dans le maintien de la structure compacte, et est manifestement plus basse pour les enzymes psychrophiles (le Tableau3). De plus, il y a une tendance claire de l'augmentation de  $\Delta H_{cal}$  dans l'ordre : psychrophile < mésophile < thermophile.

Tableau 3 : Paramètres micro calorimétriques du dépliement thermique montré dans la figure 4<sup>[8, 20, 92]</sup>.

Proteins	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>-amylases</b>		
Psychrophile	44	214
Mésophile	66	319
Thermophile	86	487
<b>DNA-ligases</b>		
Psychrophile	33	46
Mésophile	54	253
Thermophile	95-101	413

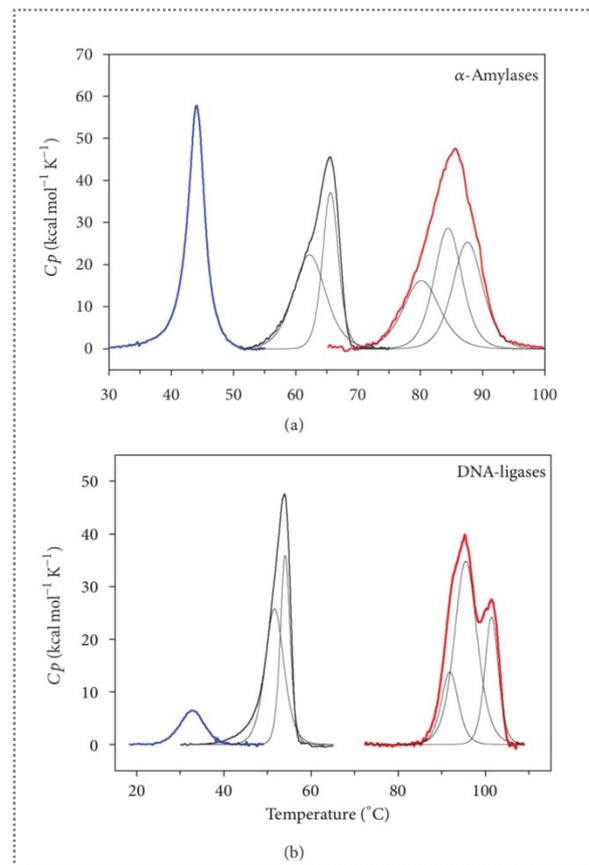


Figure 4 : Le dépliement thermique des protéines extrêmophiles [8, 20, 92]. Thermogrammes des  $\alpha$ -amylases et ADN-ligases enregistrés par la calorimétrie différentielle à balayage, présentant de gauche à droite dans chaque panneau les protéines; psychrophile (en bleu), mésophile (en noir), et (hyper)thermophile (en rouge). Les protéines adaptées au froid sont caractérisées par une basse  $T_m$  (le haut de la transition) et  $\Delta H_{cal}$  (la zone sous la transition), par une transition coopérative aigüe et par l'absence de domaines de stabilité (indiqués par des lignes fines dans les protéines stables).

La transition pour les enzymes psychrophiles est aigüe et symétrique, tandis que d'autres enzymes sont caractérisées par un aplatissement des thermogrammes. Ceci indique une capacité de coopération prononcée pendant le dépliement des enzymes psychrophiles : La structure est stabilisée par des interactions moins faibles, et la perturbation de certaines de ces interactions influence fortement l'édifice moléculaire entier et favorise son dépliage.

Les enzymes psychrophiles se déplient selon un processus "tout ou aucun", révélateur d'une stabilité uniformément basse de l'architecture. En revanche, toutes les autres enzymes homologues présentent deux à trois transitions (indiqué par la déconvolution de la fonction de la capacité de chaleur dans la Figure 4). Donc, la conformation de ces enzymes mésophiles et thermophiles contient des blocs structurels ou des unités, de stabilité distincte qui se déroulent indépendamment. Finalement, le dépliement des protéines psychrophiles est fréquemment plus réversible que celui des autres enzymes homologues, qui sont irréversiblement dépliées après le chauffage. L'hydrophobie faible des clusters du noyau dans les enzymes adaptées au froid, et la température

basse pour le dépliement, qui empêchent l'agrégation, sont certainement à l'origine de ce caractère réversible.

## 5.2 L'origine structurale de la basse stabilité

Un effort considérable a été adressé à la définition des paramètres structuraux essentiels de la protéine qui décrivent les caractéristiques thermiques de son activité et de sa stabilité. La première structure radiographique pour une protéine adaptée au froid est apparue en 1994 <sup>[118]</sup>. La base structurale d'adaptation froide a été déduite des comparaisons de structures radiographiques avec les modèles d'homologie de protéines mésophiles et thermophiles <sup>[6]</sup>.

Il est aussi important de souligner que l'activité et la stabilité d'une enzyme candidate peuvent être grandement affectées par son environnement physiologique. La majorité des études ont été exécutées sur des enzymes adaptées au froid d'organismes marins. À un certain degré (particulièrement pour les enzymes sécrétées), les caractéristiques structurales et de composition peuvent refléter l'adaptation au froid aussi bien que l'adaptation au sel <sup>[81]</sup>.

Les ensembles de données de comparaison utilisées influencent la nature des conclusions tirées à propos de l'adaptation structurale. Les structures radiographiques RX de citrate synthase ont été comparées pour des membres phylogénétiques et biochimiquement distincts de bactéries, Eucarya et Archaea <sup>[119, 120]</sup>. En l'absence d'informations sur la structure cristalline, quelques études de modélisation ont délibérément choisi des organismes phylogénétiques étroitement apparentés (par exemple <sup>[32, 95, 121]</sup>). Thomas et Cavicchioli <sup>[121]</sup> ont constaté que malgré le choix d'un groupe phylogénétiquement cohérent d'organismes, et une protéine (EF-2) qui est fortement conservée, il était difficile d'identifier les changements d'acide aminé qui sont évidemment liés avec l'adaptation thermique. Parce que les changements qui sont critiques pour l'adaptation thermique sont dissimulés au milieu de ceux produits par la dérive génétique et d'autres effecteurs de sélection naturelle. Il peut être avantageux de maximiser des différences thermiques et minimiser des différences phylogénétiques dans les ensembles de données comparatives <sup>[121,122]</sup>, particulièrement si les structures radiographiques RX ne sont pas disponibles.

Une approche alternative aux comparaisons des séries de protéines seules, est d'identifier les tendances statistiquement valables par l'analyse de grands ensembles de données. Une étude de génomique comparative a été effectuée sur l'archaea, couvrant des températures de croissance allant de 0°C à 110°C <sup>[123]</sup>. L'analyse en composante principale a révélé que les protéines d'archaea adaptées au froid avaient un contenu plus haut d'acides aminés non chargés polaires, particulièrement GLN et THR et un contenu inférieur d'acides aminés hydrophobes,

particulièrement le LEU. Utilisant la modélisation par homologie, 1111 structures de protéines modélisées ont été construites.

L'analyse des modèles d'archaea adaptées au froid a montré une tendance forte dans la zone accessible au solvant pour GLN, THR et des résidus hydrophobes aussi bien que pour quelques résidus chargés. Les futures analyses statistiques d'ensembles de données de génome devraient améliorer la capacité d'identifier les caractéristiques structurales les plus abondantes et significatives de l'adaptation au froid.

La vérification expérimentale et la détermination empirique de caractéristiques structurales importantes ont été examinées à travers la conception rationnelle et le criblage de variantes tirées par la modification génétique ou chimique <sup>[36]</sup>. Trois structures radiographiques des mutantes mécanistes de AHA (avec changement d'acides aminés et dont les numéros dans la banque de données des protéines qui suivent : K300R, 1JD7; K300Q, 1JD9; D174N, 1KXH) ont été résolus. Cependant, aucune structure n'est disponible pour les mutantes de n'importe quelles enzymes adaptées au froid avec des propriétés thermiques altérées.

Les caractéristiques structurales impliquées dans la flexibilité d'enzymes adaptées au froid ont été largement documenté (par exemple <sup>[5, 18, 81, 124-127]</sup>). Les sections suivantes décrivent les principales constatations d'un grand nombre d'études.

## 5.2.1 Interactions Hydrophobes

Les facteurs majeurs contribuant à la flexibilité structurale et la thermolabilité d'une protéine adaptée au froid, sont la nature et l'ampleur des interactions entre les résidus hydrophobes (l'hydrophobie du cœur) et entre les résidus hydrophobes et les molécules d'eau solvant (l'hydrophobie de la surface). Ces interactions hydrophobes sont discutées ci-dessous.

### 5.2.1.1 L'hydrophobie du cœur

Les acides aminés enfouis dans les enzymes adaptées au froid ont tendance à être plus petits et moins hydrophobe que dans les homologues mésophiles et thermophiles <sup>[6]</sup>. Les interactions de Van der Waals sont faibles, de très courte portée, et extrêmement sensible à la distance. Donc, la distance entre les groupes hydrophobes à l'intérieur d'une protéine, déterminera la contribution enthalpique à la stabilisation <sup>[81,129,130]</sup>. Les enzymes adaptées au froid seront déstabilisées par suite d'une réduction des interactions de Van Der Waals, et du mouvement accru des groupements internes. À cause de son embranchement et de sa taille (Annexe I), l'acide aminé ILE peut s'emballer plus efficacement à l'intérieur du cœur et stabiliser une protéine. Moins de résidus ILE

sont présents dans le cœur intérieur de la trypsine adapté au froid <sup>[130]</sup>, le citrate synthase <sup>[64]</sup> et AHA <sup>[131]</sup>.

Dans un adénylate kinase d'un thermophile, ILE est présent à la position 26. Dans l'homologue adapté au froid, la présence de THR26 semble augmenter l'accessibilité au solvant du résidu du cœur ; VAL21, de 23 Å<sup>2</sup> à 42 Å<sup>2</sup><sup>[132]</sup>. Dans un uracil-ADN glycosylase adapté au froid <sup>[110]</sup> et dans le domaine catalytique d'un cellulase <sup>[95]</sup>, la diminution de l'hydrophobie du cœur mène à une augmentation à la fois, dans le nombre, que dans le volume des cavités internes. La thermolabilité de l'uracil-ADN glycosylase est compatible avec l'emplacement des cavités, étant près du site actif et de la boucle de liaison d'ADN <sup>[110]</sup>.

Les solubilités des chaînes latérales hydrophobes dans l'eau sont minimales à 20° C, et donc les interactions hydrophobes sont plus fortes à température ambiante <sup>[133]</sup>. Une étude de 31 protéines qui se déroulent de façon réversible, a trouvé que ~3/4 avait la stabilité maximale autour de la température ambiante <sup>[133]</sup>. Bien que l'étude ait seulement inclus une protéine d'un psychrophile, ces découvertes illustrent le rôle important que jouent les interactions hydrophobes dans le cœur d'une protéine pour améliorer la stabilité de la protéine, pour des températures basses à modérées.

### 5.2.1.2 L'hydrophobie de la surface

Les surfaces d'enzymes adaptées au froid ont tendance à avoir une proportion plus élevée de résidus hydrophobes (non polaires). Ceci a été démontré par les structures radiographiques de phosphate glycéraldéhyde-3-déshydrogénase <sup>[127]</sup>, le citrate synthase <sup>[64]</sup>, AHA <sup>[131]</sup>, xylanase <sup>[134]</sup>, trypsine <sup>[54]</sup>, la crevette phosphatase alcalin <sup>[135]</sup> et adénylate kinase <sup>[132]</sup>. Une tendance semblable a été observée dans la modélisation à grande échelle et dans les études structurales, qui ont démontré que la fraction moyenne de la surface accessible au solvant <sup>[133]</sup> ou de la surface enfouie <sup>[127]</sup> qui est hydrophobe était plus élevée dans les protéines adaptées au froid.

La surface exposée au solvant des résidus hydrophobes est 7854 et 4929 Å<sup>2</sup> dans le citrate synthase du psychrophile et du hyper thermophile, respectivement <sup>[64]</sup>. Cependant, dans la forme oligomérique du citrate synthase, l'hydrophobie entre les sous unités est diminuée comparé à l'homologue thermophile <sup>[119]</sup>. Particulièrement, les structures radiographiques révèlent que des clusters ILE à l'interface des sous-unités sont absents dans l'enzyme adaptée au froid, tandis que des clusters hydrophobes fermement entassés sont présents dans l'homologue d'un hyper thermophile <sup>[64]</sup>.

Pour l'adénylate kinase, la surface hydrophobe exposée de l'enzyme adaptée au froid est augmentée de 483 Å<sup>2</sup> et équivaut à  $\Delta G$  de 4-11 kJ mol<sup>-1</sup><sup>[132]</sup>. Dans l'enzyme adaptée au froid, THR

remplace MET à la position 179 d'un thermophile homologue. THR179 est incapable de maintenir des interactions hydrophobes avec une partie éloignée de la protéine, aboutissant à une augmentation marquée de l'accessibilité au solvant de VAL21. Parce que VAL21 fait partie du cœur hydrophobe, le remplacement THR179MET semble être important pour générer la flexibilité d'adénylate kinase <sup>[132]</sup>.

La flexibilité dans la crevette phosphatase alcalin est probablement augmentée par des résidus hydrophobes (55 % de la surface de la protéine), qui sont arrangés dans des clusters <sup>[135]</sup>. Des acides aminés non polaires constituent 32 % et 26 % de la surface d'ADN ligases, des bactéries de psychrophile et thermophile, respectivement <sup>[20]</sup>. Des surfaces hydrophobes semblent aussi être enrichies pour déstabiliser le site actif de l'ADN ligase adaptée au froid <sup>[20]</sup>. Une découverte semblable a été rapportée pour une protéine-tyrosine phosphatase <sup>[66]</sup>.

Des résidus hydrophobes de surface déstabiliseront une structure de protéine à cause de l'entropie diminuée des molécules d'eau, qui forment des structures semblables à la cage autour des résidus non polaires. Cependant, aux températures basses, le gain d'entropie est diminué par suite de la mobilité diminuée des molécules d'eau libérées <sup>[120, 129, 133, 136]</sup>. Ceci implique que les enzymes adaptées au froid peuvent gagner en flexibilité par, et avoir une capacité plus grande pour tolérer, l'hydrophobie accrue de la surface <sup>[123]</sup>.

L'adaptation au froid semble impliquer un arrangement stratégique de la fraction non polaire totale ; exposé et enfouie, menant à une augmentation de l'exposition des résidus non polaires à l'eau, avec une réduction concomitante de l'emballage du cœur hydrophobe <sup>[127]</sup>.

### 5.2.2 L'hydrophilie de surface

Une augmentation de la charge de la surface, particulièrement une charge négative, a été décrite pour la trypsine adaptée au froid <sup>[54, 134, 137]</sup>,  $\beta$ -lactamase <sup>[138]</sup>, malate déshydrogénase <sup>[35]</sup>, subtilisine <sup>[139,140,141]</sup>, le citrate synthase <sup>[64]</sup> et la cellulase <sup>[95]</sup>. Pour la crevette phosphatase alcalin, la charge de surface négative est particulièrement haute (-80), avec un patch de charges positives situé près du site actif <sup>[135]</sup>.

La constante diélectrique d'eau augmente de 55.5 Debye ( $\epsilon_r$ ) à 100°C à 88  $\epsilon_r$  à 0° C <sup>[120]</sup>. Aux basses températures (s'approchant de 0° C), le coût énergétique de perturber les réseaux des liaisons hydrogènes est très élevé, à cause de la haute viscosité et de la haute tension de surface de l'eau <sup>[120]</sup>. Dans les enzymes adaptées au froid, le coût énergétique peut être compensé par des acides aminés de surface chargés ou polaires interagissant avec les molécules d'eau d'une haute constante diélectrique <sup>[18,139]</sup>, permettant ainsi une solvataion appropriée et maintenant la flexibilité <sup>[121]</sup>. De meilleures

interactions du solvant avec HIS positivement chargé ( $pK_a \sim 7$ ) peuvent aussi jouer un rôle dans l'augmentation de la flexibilité aux températures basses. L'anneau d'imidazole de HIS a un  $\Delta H_{\text{ionisation}}$  élevé, et une diminution dans la température favorise sa protonation <sup>[142]</sup>.

En plus de l'amélioration des interactions avec le solvant, la localisation des résidus acides dans des patchs de la surface, peut produire des répulsions de type charge-charge causant la déstabilisation de la structure globale de la protéine. Les modules de liaison cellulase et catalytique d'un cellulase de *P. haloplanktis* sont connectés par un exceptionnel long lieur (109 résidus). Le lieur contient 23 acides aminés acides et manque de résidus positivement chargés. La répulsion de charge des résidus acides va probablement créer un haut niveau de flexibilité dans la région de lieur, et elle est considérée comme une caractéristique structurelle majeure d'adaptation au froid dans cette enzyme <sup>[143]</sup>. Dans le cas de la crevette phosphatase alcalin <sup>[135]</sup>, la surface positivement chargée peut diriger le substrat négativement chargé au site actif.

Contrairement aux études précédentes, une étude génomique a rapporté que l'adaptation froide implique une diminution dans la fraction moyenne de la surface accessible au solvant et dans la surface enfouie qui est chargée <sup>[123]</sup>. Cette tendance peut refléter les caractéristiques de protéines d'Archaea. Cependant, des tendances semblables ont été identifiées utilisant les séquences génomiques de bactéries <sup>[144]</sup>. L'augmentation de l'hydrophilie de la surface dans les protéines psychrophiles et thermophiles a été rapportée <sup>[145]</sup>. La charge de surface accrue dans les protéines thermostable est liée avec une capacité de former les réseaux de ponts salins <sup>[146]</sup>, contrairement aux cas des enzymes adaptées au froid, dans lesquelles elle se trouve liée à l'interaction avec les molécules d'eau <sup>[145]</sup>. Comme les interactions ioniques deviennent plus fortes avec la diminution de la température, il semble que c'est la minimisation de leur nombre qui permet aux protéines adaptées au froid de conserver la flexibilité aux températures basses.

### 5.2.3 Interactions Électrostatiques

Les interactions électrostatiques non covalentes intramoléculaires, sont de haute importance dans le maintien de la structure secondaire et tertiaire. Ces interactions se produisent avec des acides aminés polaires et chargés, et comprennent principalement : les liaisons hydrogène, des ponts salins et les interactions aromatiques. Les interactions électrostatiques sont efficaces sur de longues distances et, en conséquence, peuvent être difficiles de prévoir, particulièrement dans les modèles d'homologie.

### 5.2.3.1 Liaisons hydrogène

Les liaisons H sont le type le plus abondant d'interactions non covalentes, et 4-12 kJ mol<sup>-1</sup> sont nécessaires pour casser une seule liaison <sup>[147]</sup>. Parce que la différence totale dans l'énergie de stabilisation entre homologues d'un psychrophile et mésophile, peut être pas plus de 40-50 kJ mol<sup>-1</sup>, il est clair que ceci peut être comptabilisé par quelques liaisons H placées avec des positions particulièrement importantes. L'adaptation froide d'une triosephosphate isomérase a été liée à un remplacement d'un résidu SER par ALA; on s'attend à ce que SER confère une stabilité thermique en formant deux liaisons H intramoléculaires supplémentaires <sup>[86]</sup>.

L'interprétation des liaisons H dans les modèles d'homologie n'est pas fiable parce que les liaisons H sont fortement directionnelles. Aucune différence dans les liaisons H n'a été identifiée à partir des analyses comparatives des structures radiographiques de AHA, citrate synthase et du malate déshydrogénase <sup>[35, 64, 131]</sup>. Cependant, des enzymes adaptées au froid peuvent avoir moins de liaisons H inter domaine ou inter-sous-unité <sup>[81]</sup>. Dans une étude, une uracil-ADN adaptée au froid glycosylase <sup>[110]</sup> a été rapporté pour avoir trois liaisons H supplémentaires (219 liaisons H) que son homologue d'un mésophile (216 liaisons H).

### 5.2.3.2 Interactions induites par l'arginine

Beaucoup d'enzymes adaptées au froid ont un rapport ARG/LYS réduit, y compris  $\beta$ -galactosidase <sup>[107]</sup>, chitobiase <sup>[55]</sup>, phosphoglycerate kinase <sup>[58]</sup> et la majorité d'enzymes psychrophiles <sup>[6]</sup>. Dans une étude de génomique comparative, les modèles de protéines produites d'Archaea adaptées au froid présentent moins de résidus chargés (ARG + LYS + GLU) sur leur surface accessible au solvant <sup>[123]</sup>. Cependant, un certain nombre d'enzymes adaptées au froid (par exemple, le citrate synthase, métalloprotéase, trypsine, subtilisine) <sup>[6]</sup> ont un rapport ARG / LYS plus élevé comparé aux homologues thermostables. Une uracil-ADN glycosylase adaptée au froid a encore trois résidus ARG qu'un homologue mésophile <sup>[110]</sup>. Dans cette enzyme, les résidus ARG sont localisés surtout près de sa surface. À moins qu'ils ne participent aux interactions ioniques, ils vont probablement former des interactions avec l'eau, communiquant ainsi la flexibilité à la structure globale de l'enzyme <sup>[81, 110]</sup>.

Il semblerait que les résidus Arginine augmentent généralement la stabilité thermique de l'enzyme plus que les résidus LYS, en facilitant un nombre plus grand d'interactions électrostatiques (jusqu'à deux ponts salins et cinq liaisons H) par leur groupement guanidino <sup>[88, 92, 138, 148, 149]</sup>. Le support expérimental pour l'effet thermo-stabilisateur général de l'ARG plus que la LYS, vient d'études sur une gamme d'enzymes mammifères qui ont été mentionnées comme stabilisées par

l'introduction des groupements guanidinium <sup>[148]</sup>. Dans une protéine-tyrosine phosphatase adaptée au froid, MET147 est présent dans une boucle qui fait partie du site actif. L'homologue d'un mésophile contient l'ARG à un emplacement équivalent dans la structure et peut faire cinq liaisons H supplémentaires. Il est probable que le remplacement de MET communique la flexibilité au site actif de l'enzyme adaptée au froid <sup>[66]</sup>. AHA a seulement 13 ARG et 13 résidus LYS comparés à 28 ARG et 19 résidus LYS dans PPA <sup>[150,151]</sup>. En conséquence, il y a une réduction des ponts salins induit par l'ARG (-9), des interactions amino-aromatiques (-11) et des liaisons H (-22) <sup>[131, 152]</sup>. On a constaté que l'augmentation de la stabilité de AHA est due à la conversion des chaînes latérales des résidus LYS en homoarginine <sup>[153]</sup>. Ceci est compatible avec le remplacement de l'ARG par LYS comme un moyen de produire la flexibilité dans AHA.

### 5.2.3.3 Interactions aromatiques

Les cycles aromatiques dans les résidus TRP, TYR et PHE ont un dipôle à cause de la charge négative partielle sur la face du cycle causé par le nuage des électrons- $\pi$  et par une charge positive partielle sur les bords C-H <sup>[152]</sup>. Cette polarité permet des interactions favorables entre les cycles aromatiques à angle droit l'un par rapport à l'autre (des interactions aromatiques-aromatiques), ou entre les cycles et les chaînes latérales d'ARG et de LYS (interactions amino-aromatiques). Les interactions aromatiques peuvent donc promouvoir la stabilisation thermique par une contribution enthalpique.

La subtilisine adaptée au froid a un défaut d'interactions aromatiques, contrairement à l'homologue thermophile, avec 11 interactions identifiées sur la surface <sup>[139]</sup>. Dans un  $\beta$ -lactamase d'un mésophile, deux interactions aromatiques-aromatiques TRP sont présentes en comparaison d'un homologue psychrophile, et semblent être importantes pour la stabilisation thermique <sup>[138]</sup>. Dans AHA, un nombre réduit d'interactions amino-aromatiques, mais non pas aromatique-aromatique, semblent être important pour maintenir la flexibilité <sup>[152]</sup>.

### 5.2.3.4 Ponts salins

Un pont salin est défini comme une paire d'ion avec une distance de 2.5-4.0Å° entre des atomes chargés non hydrogènes <sup>[154]</sup>, et contribue entre 12-21 kJ mol<sup>-1</sup> de stabilisation à une enzyme <sup>[147]</sup>. Le coût de formation d'une paire d'ion seule est très élevé sur la surface d'une enzyme <sup>[147]</sup>. Cependant, les réseaux de paire d'ion sont plus stables par suite de la réduction de moitié de la pénalité de dé-solvatation <sup>[147]</sup>.

Plusieurs études comparatives basées sur des données de structure radiographiques ont rapporté que le nombre de ponts salins est inférieur dans les enzymes adaptées au froid (par exemple <sup>[127]</sup>). La subtilisine adaptée au froid a deux ponts salins, comparés avec cinq et dix ponts salins dans les homologues mésophiles et thermophiles, respectivement <sup>[139]</sup>. Les ponts salins (particulièrement induits par l'ARG) dans AHA sont considérablement moins nombreux que dans PPA et peuvent contribuer à la thermolabilité de AHA et à la capacité de se déplier de façon réversible <sup>[92, 131, 152]</sup>.

Le citrate synthase d'un psychrophile est rapporté d'avoir plus de ponts salins intra subunit qu'un homologue hyper thermophile ; 27 contre 42, respectivement <sup>[64]</sup>. Cependant, l'enzyme adaptée au froid a moins d'interactions inter subunit qu'un homologue mésophile <sup>[64]</sup>. Un nombre réduit de réseaux inter subunit et de paire d'ion semble aussi être important pour la thermolabilité d'un malate déshydrogénase d'un psychrophile <sup>[35]</sup>. Dans une étude de génomique, on a constaté que le nombre des ponts salins diminue significativement pour les enzymes psychrophiles pour quelques modèles de protéines (par exemple, Cpn60). Cependant, contrairement aux tendances pour l'accessibilité au solvant des résidus chargés et hydrophobes, la tendance pour les ponts salins n'est pas une caractéristique générale <sup>[123]</sup>. Des études indiquent que l'adaptation froide corrèle plus fortement avec un nombre réduit d'interactions inter domaine et inter subunit, plutôt qu'avec le nombre de ponts salins en soi <sup>[6]</sup>.

L'importance du placement stratégique du pont salin est bien illustrée dans le citrate synthase, où l'absence d'un pont salin inter subunit R375-E48 semble faire une contribution critique à sa basse stabilité <sup>[64]</sup>. On peut considérer une paire d'ion comme critique, si le pont entre les résidus est situé à une distance ( $> 10$  résidus), et si la paire d'ion ne peut pas se former dans un homologue plus thermolabile à cause du remplacement d'acide aminé, ou de la distance l'un de l'autre de la paire d'ion ( $\geq 6 \text{ \AA}$ ) <sup>[132]</sup>. Ce type de remplacement critique semble faire une contribution importante à la thermolabilité d'adénylate kinase adaptée au froid <sup>[132]</sup>.

#### 5.2.4 Éléments de la structure secondaire

Les éléments de structures secondaires (les hélices- $\alpha$  et les feuillets- $\beta$ ) définissent comment la structure tertiaire d'une protéine se pliera. Comme ils jouent un rôle central dans la structure et la fonction d'une protéine, seulement des changements mineurs de la structure secondaire peuvent être tolérés. La stabilité d'une hélice  $\alpha$  dépend des liaisons H intra-hélice et des interactions du type "chaîne latérale-chaîne latérale". Les propriétés de Ncap (le résidu de N-terminal de l'hélice) et des résidus Ccap peuvent aussi affecter la stabilité d'une enzyme <sup>[155]</sup>. Dans une hélice, les unités de peptide ont tendance à s'aligner d'une manière parallèle à l'axe hélicoïdal et leur effet cumulatif doit créer un macro-dipôle d'hélice (environ +0.5 unité de charge au terminus N, et -0.5 au terminus C).

En conséquence, les résidus envers le terminus N d'une hélice ont tendance à être négativement chargés, et ceux envers le terminus C ont tendance à être positivement chargés.

Les différences d'acide aminé entre les enzymes adaptées au froid et les homologues thermostables créent des différences subtiles dans les propriétés des hélices- $\alpha$  [81]. Dans AHA comparée à PPA, les résidus Ncap négativement chargés diminuent de quatre à deux, et ceux de Ccap positivement chargés diminuent de six à trois [152]. Les interactions de type charge-dipôle affaiblies dans AHA peuvent générer la flexibilité [152]. Dans le cas du triosephosphate isomerase adaptée au froid, la flexibilité peut être favorisée par un niveau plus haut de charge positive près du Ncap et de la charge négative près du Ccap [156].

Quand ils sont situés dans le centre d'hélices- $\alpha$ , les résidus PRO causent au moins la perte de deux liaisons H et, en raison de leurs degrés de liberté limités, ils peuvent causer la déstabilisation en agissant comme un élément de rupture d'hélice [157,158]. Cependant, quand ils sont présents au Ncap, ils peuvent inciter la formation d'hélice [157]. Un certain nombre d'enzymes adaptées au froid ont un nombre plus élevé de résidus PRO dans les hélices- $\alpha$ . Par exemple, une citrate synthase adaptée au froid a des résidus PRO supplémentaires dans le centre de deux hélices- $\alpha$  [64].

En l'absence d'une chaîne latérale, et la liberté conformationnelle des résidus GLY, ils peuvent déstabiliser les hélices- $\alpha$  [158,159]. Cette capacité ne semble pas jouer un rôle dans l'adaptation froide, parce qu'aucune tendance significative impliquant les résidus GLY n'a été identifiée dans des études comparatives [81].

### 5.2.5 Boucles de la surface

La majorité des boucles qui relient les éléments de structure secondaires est trouvée sur la surface de l'enzyme. Beaucoup de poches catalytiques sont entourées par des structures de boucle et produisent la flexibilité au site actif [81]. Pour des raisons semblables à celles décrits dans la section d'Éléments de Structure Secondaire ci-dessus, la chaîne latérale du résidu PRO est liée de façon covalente à l'atome N du squelette peptidique, limitant ainsi la rotation des liaisons N-C $\alpha$  et réduisant la flexibilité conformationnelle des structures en boucle [88]. En revanche, les résidus GLY dans les boucles augmentent la liberté conformationnelle de l'état natif [18].

Le nombre des résidus PRO dans les boucles est inférieur dans la subtilisine adaptée au froid, le malate déshydrogénase, la trypsine, le phosphatase alcalin, l'ADN ligase et, AHA, comparé à leur homologues mésophiles et thermophiles respectifs [12]. Dans 3-isopropylmalate déshydrogénase adaptée au froid, ALA et SER remplacent deux résidus PRO qui sont présents dans deux boucles dans l'homologue thermostable et dans une boucle près du site actif [154]. Dans un citrate synthase

adaptée au froid, une boucle connectant deux hélices- $\alpha$  est plus longue de neuf résidus que dans les enzymes thermostables, et contient plus de résidus chargés [64, 100]. L'enzyme adaptée au froid contient aussi huit résidus PRO en moins dans les boucles comparée à l'homologue hyper thermophile.

La flexibilité de LDH-A 4 d'un poisson antarctique semble être améliorée par une boucle possédant 2 résidus GLY supplémentaires qui sont séparés par 10 résidus [18]. Cependant, un citrate synthase adaptée au froid a 7 résidus GLY en moins (un total de 22) qu'un homologue hyper thermophile; le nombre des résidus GLY est le même dans les hélices- $\alpha$ , mais il est réduit de 7 dans les boucles de l'enzyme adaptée au froid [64]. Il apparaît que l'abondance relative des résidus GLY dans les boucles est expliquée que partiellement par la contribution qu'ils apportent à la flexibilité globale de l'enzyme.

Le Triosephosphate isomerase adaptée au froid a plus, et de plus longues boucles, connectant les hélices- $\alpha$  et les feuillets- $\beta$  que les homologues mésophile et thermophile [86,156]. Les boucles de surface plus longues augmentent l'amplitude possible du mouvement entre les structures secondaires, et peuvent diminuer la stabilité de l'enzyme.

### 5.2.6 Autres facteurs

La teneur en méthionine est plus élevée dans un certain nombre d'enzymes adaptées au froid [6]. Les résidus MET peuvent conférer la flexibilité à cause de leur haut degré de liberté et parce qu'ils sont dépourvus de ramification, de charge ou d'interactions de type dipôle [121]. Alternativement, une haute teneur en MET, identifiée dans la trypsine adaptée au froid du poisson, peut refléter l'adaptation halophile [81,130].

Les métaux peuvent stabiliser une enzyme en reliant simultanément de nombreuses structures secondaires ou des domaines. Beaucoup d'enzymes adaptées au froid reliées par  $\text{Ca}^{2+}$ , sont caractérisées par de basses constantes de liaison. L'affinité de liaison- $\text{Ca}^{2+}$  est 2000 fois plus basse dans AHA comparée à PPA [150], et la subtilisine adaptée au froid d'un Bacille spp. a une plus basse affinité de liaison- $\text{Ca}^{2+}$  qu'un homologue thermostable de *Thermoactinomyces vulgaris* [139]. La subtilisine adaptée au froid de *Vibrio* sp. a un site de liaison- $\text{Ca}^{2+}$  supplémentaire comparé à l'enzyme *T. vulgaris* [141].

L'absence de ponts disulfures dans la phosphatase alcaline adaptée au froid a été suggérée de conférer la flexibilité [160]. En revanche, trois ponts de disulfure sont présents dans une serine protéase de type semblable à la subtilisine adaptée au froid, comparés à aucun dans l'homologue thermophile [141]. Quatre ponts disulfures sont présents dans AHA comparés à cinq dans PPA [150].

L'introduction d'un cinquième pont disulfure dans AHA a entraîné une augmentation dans la stabilité conformationnelle, et une diminution de l'activité <sup>[117]</sup>. La suppression (par modification chimique) de toutes les liaisons disulfure dans AHA, a abouti à la stabilisation de la région la moins stable de l'enzyme, y compris le site actif et une diminution dans l'activité <sup>[161]</sup>. Dans AHA, les ponts disulfures semblent empêcher le site actif de développer des interactions ioniques, promouvant ainsi une déstabilisation localisée pour préserver l'activité.

## 6. Relation entre l'activité, la flexibilité, et la stabilité

### 6.1 Aperçus expérimentaux

Pour vérifier la validité de la relation proposée entre l'activité et la stabilité dans les enzymes actives à froid, un psychrophile  $\alpha$ -amylase a été utilisée comme un modèle parce que l'architecture identique de son site actif, par rapport à un homologue mésophile proche (Fig. 5), indique que les adaptations structurelles affectant les propriétés du site actif apparaissent à l'extérieur de la cavité catalytique. Sur cette base, 17 mutantes de cette enzyme ont été construites, chacune d'entre elles portant un résidu conçu formant une interaction faible trouvée dans les  $\alpha$ -amylases mésophiles, mais absente dans la  $\alpha$ -amylase active à froid, aussi bien que des combinaisons, pouvant aller jusqu'à six, de facteurs structurels stabilisants <sup>[92, 117, 162, 163]</sup>. On a montré que ces interactions mises au point, améliorent tous les paramètres examinés liés à la stabilité de la protéine : La compacité, la stabilité cinétiquement, la stabilité thermodynamique, la résistance envers la dénaturation chimique, et la cinétique du dépliement/repliement. Donc, ces mutantes de la  $\alpha$ -amylase psychrophile systématiquement se rapprochent et reproduisent la stabilité et les tendances du dépliement des enzymes thermostables. Ces effets ont été aussi analysés par la dynamique moléculaire <sup>[164]</sup>. Simultanément à cette stabilité améliorée, les mutantes stabilisées ont perdu l'optimisation cinétique pour l'activité à basse température présentée par l'enzyme psychrophile parente. Comme indiqué dans la Figure 6, la stabilisation de la  $\alpha$ -amylase active à froid, a tendance à diminuer les valeurs de  $k_{cat}$  et simultanément les valeurs de  $K_m$  des enzymes mutantes, révélant ainsi la corrélation élevée entre les deux paramètres cinétiques. En effet, en plus de la stabilité conçue qui est semblable à celle observée avec l'enzyme mésophile, la mutante multiple portant six facteurs structurels stabilisants, montre aussi une activité conçue semblable à l'enzyme mésophile, en termes de modification dans  $k_{cat}$  et des valeurs de  $K_m$ , et même dans les paramètres thermodynamiques d'activation <sup>[162,163]</sup>. Ces résultats fournissent le grand support expérimental de l'hypothèse assumant que, la disparition des interactions stabilisantes dans les enzymes psychrophiles augmente l'amplitude des mouvements exigés par la catalyse et la dynamique des résidus du site actif, à basse température, menant à une activité plus élevée.

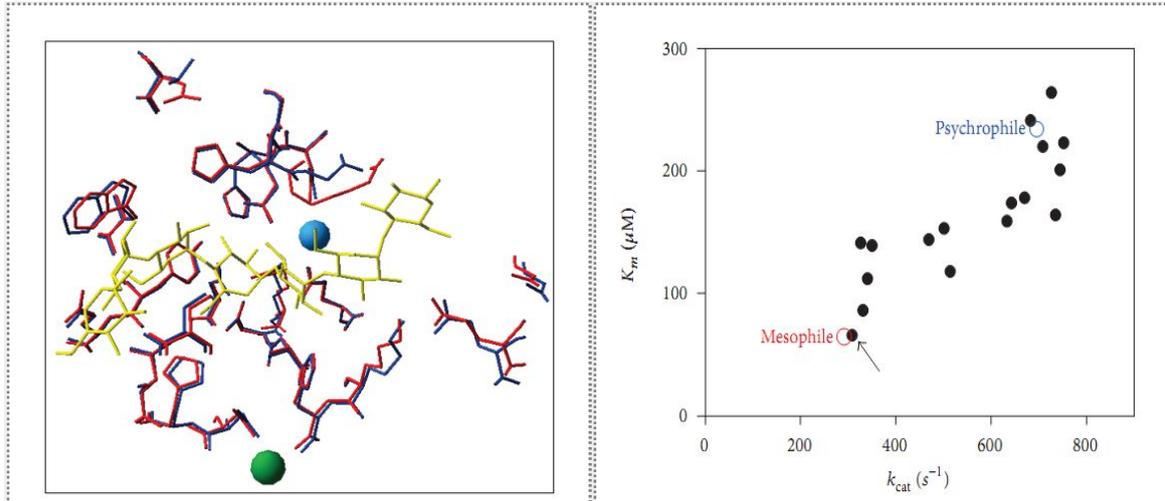


Figure 5 : structure du site actif. Superposition des résidus du site actif, dans les  $\alpha$ -amylases psychrophiles (bleu) et mésophile (rouge).

L'ion chlorure et calcium sont montrés en sphères bleu et vert, respectivement. Les 24 résidus (jaune) qui participent à des interactions avec le substrat directes ou induites par l'eau sont identiques et se superposent presque parfaitement dans la structure <sup>[8]</sup>.

Figure 6 : L'ingénierie de l'activité d'enzymes psychrophiles  $\alpha$ -amylases mutantes semblables aux mésophiles.

Ce graphe des paramètres cinétiques des mutantes stabilisées (symboles pleins) montre que la tendance générale est de diminuer l'activité et d'augmenter l'affinité pour le substrat de l'enzyme psychrophile type sauvage (symbole creux bleu). La mutante la plus stable portant 6 interactions additionnelles (flèche) montre des paramètres cinétiques presque identiques de ceux de l'homologue mésophile (symbole creux rouge) <sup>[8, 92, 163]</sup>.

On devrait mentionner que d'autres études de mutation d'enzymes actives à froid ont été moins conclusives. Diverses enzymes psychrophiles <sup>[87, 115, 165-175]</sup> ont été conçues pour vérifier l'implication des mutations adaptatives spécifiques, dans ou près du site actif. Ces études ont révélé un schéma complexe d'effets sur les paramètres cinétiques, l'énergie d'activation et la stabilité, qui ne peut pas être interprété en termes simples.

## 6.2 L'évolution dirigée

Les relations de stabilité et d'activité dans des protéines adaptées au froid ont été contestées d'un point de vue évolutif. En fait, l'évolution dirigée <sup>[176,177]</sup> et l'ingénierie des enzymes <sup>[178]</sup> a démontré que l'activité et la stabilité ne sont pas physiquement liées dans la protéine, comme passé en revue dans <sup>[179]</sup>.

En conséquence, on a proposé que la stabilité basse d'enzymes actives à froid soit le résultat d'une dérive génétique liée au manque de pression sélective pour des protéines stables. Bien que ceci semble être évident, plusieurs données indiquent que la situation est plus subtile. Comme déjà mentionné, dans les enzymes psychrophiles à domaines multiples, le domaine catalytique est toujours thermolabile, tandis que le domaine non catalytique peut être aussi stable que celui des protéines mésophiles <sup>[55-57]</sup>. Il est donc peu probable qu'une dérive génétique affecte seulement le domaine catalytique sans modifier d'autres régions de la protéine. En outre, plusieurs expériences d'évolution dirigée ont montré que, quand les bibliothèques d'enzymes à mutation aléatoire sont examinées, seulement pour une activité accrue aux basses températures sans d'autres contraintes, les meilleurs candidats affichent systématiquement les propriétés canoniques d'enzymes psychrophiles, comme discuté dans <sup>[180]</sup>. L'examen des tracés de l'activité contre la stabilité pour des centaines de mutantes, montre que les mutations aléatoires améliorant tant l'activité que la stabilité sont rares <sup>[181,182]</sup>. Il s'ensuit que l'amélioration de l'activité aux températures basses associée à la perte de stabilité semble être l'événement le plus fréquent et accessible.

## 6.3 Exceptions Notables

En considérant les leçons mentionnées ci-dessus par l'évolution du laboratoire, il faudrait s'attendre que l'on puisse découvrir des enzymes psychrophiles, qui ne partagent pas les propriétés canoniques. En effet, quelques rapports suggèrent la présence d'exceptions considérables à la règle générale. Par exemple, les mutations ponctuelles simples peuvent représenter la plupart des traits adaptatifs. Une mutation simple dans le site de liaison du calcium d'un psychrophile subtilisine <sup>[87]</sup> et dans l'hélice de fixation du phosphate dans le phosphate triose isomérase <sup>[86]</sup>, augmente considérablement la stabilité thermique des mutantes psychrophiles. Au contraire, une substitution seule d'acide aminé près du site actif d'un thermostable  $\alpha$ -glucosidase offre l'activité froide <sup>[183]</sup>. La chaperonine et la protéine de choc thermique GroEL d'une bactérie antarctique n'est pas adaptée au froid, et affiche une stabilité et une activité semblables que son *E. coli* homologue <sup>[184]</sup>. Il a été suggéré que cette chaperonine reste apte pour fonctionner pendant les augmentations soudaines de température de l'environnement <sup>[185]</sup>.

De même, l'activité du thiorédoxine de la même bactérie est beaucoup plus stable thermiquement que celui d'*E. Coli* <sup>[191, 192]</sup>. On ne peut pas exclure que les enzymes impliquées dans le transfert électronique, n'exigent pas le même type d'adaptation, parce que la vitesse du flux électronique n'est pas significativement affectée par les basses températures biologiques. L'Isocitrate déshydrogénase d'une bactérie psychrophile est plus stable que son homologue mésophile, tandis que l'activité froide a été attribuée à la flexibilité locale au site actif <sup>[27]</sup>.

## 7. Les enzymes psychrophiles en Biotechnologie

Comme déjà mentionné, la plupart des enzymes psychrophiles sont actives à froid et thermolabile. Ces traits spécifiques sont responsables des trois principaux avantages d'enzymes actives à froid dans la biotechnologie : (i) en conséquence de leur haute activité, une plus faible concentration de l'enzyme catalyseur est exigée pour atteindre une activité donnée, réduisant ainsi le montant de la préparation coûteuse de l'enzyme dans un processus; (ii) en conséquence de leur activité froide, elles restent efficaces à l'eau du robinet ou à la température ambiante, évitant donc le chauffage pendant un processus, soit au niveau domestique (par exemple : la machine à laver) ou bien au niveau industriel; et (iii) en conséquence de la thermolabilité, elles peuvent être efficacement et parfois sélectivement inactivées après un processus d'apport de chaleur modéré. À côté de ces traits, les enzymes d'organismes endémiques aux environnements froids peuvent être une source précieuse de nouveaux catalyseurs possédant des caractéristiques enzymologiques utiles, comme de nouvelles spécificités de substrat ou des propriétés de produit.

### 7.1 La thermolabilité dans la biologie moléculaire

Les phosphatases alcalines sont principalement utilisés dans la biologie moléculaire pour la déphosphorylation des vecteurs d'ADN avant le clonage pour empêcher la rediffusion, ou pour la déphosphorylation de 5' - acide nucléique terminal avant 5' - terminal étiquetée au moyen du polynucléotide kinase. Cependant, la phosphatase doit être soigneusement enlevée après la déphosphorylation pour éviter des interférences avec les étapes ultérieures. Il s'ensuit que les phosphatases alcalines thermolabiles sont d'excellentes alternatives comme elles sont inactivées par le traitement thermique modéré permettant d'exécuter les étapes ultérieures dans la même éprouvette et la minimisation de pertes d'acides nucléiques <sup>[188]</sup>. Une phosphatase alcaline d'une bactérie antarctique a été entièrement caractérisée <sup>[189, 190, 191]</sup>. Cette phosphatase alcaline thermolabile, vendue comme phosphatase antarctique, est maintenant proposée sur le marché par New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, les USA). Dans le même contexte, la phosphatase alcaline thermolabile de la crevette arctique *Pandalus borealis*, est aussi disponible par exemple de Biotec Pharmacon

ASA (Tromsø, la Norvège) ou des Services médicaux GE Life Sciences (Little Chalfont, Royaume-Uni).

Deux autres enzymes psychrophiles sont aussi commercialisées pour des applications de biologie moléculaires profitant de la propriété thermolabile. La crevette nucléase dégrade sélectivement l'ADN à double brin: par exemple, elle est utilisée pour le déplacement des contaminants non intentionnels dans les mélanges PCR, et ensuite elle est inactivée par la chaleur avant l'ajout du modèle. Cette enzyme recombinante est disponible auprès de Biotec Pharmacon ASA (Tromsø, la Norvège), la Société USB (Santa Clara, CA, USA), ou Thermo Scientifique (Waltham, MA, USA). L'uracil-ADN N-glycosylase thermolabile de la morue de l'atlantique (*Gadus morhua*), qui présente des caractéristiques de l'adaptation au froid typiques <sup>[110]</sup>, est aussi utilisée pour enlever des polluants d'ADN dans des réactions PCR séquentielles. Après la dégradation des polluants, l'enzyme est complètement et irréversiblement inactivée après le traitement thermique. L'uracil-ADN N-glycosylase thermolabile est disponible auprès de Biotec Pharmacon ASA (Tromsø, la Norvège).

## 7.2 L'activité à basse température

Le marché pour les enzymes utilisées dans les détergents représente 30-40 % de toutes les enzymes produites dans le monde entier. Parmi ces agents nettoyants enzymatiques, la subtilisine (une protéase serine alcaline principalement produite par l'espèce de *Bacillus*) domine en grande partie ce marché. Au niveau domestique, la tendance actuelle est, cependant, d'utiliser des détergents à des températures de lavage plus basses, à cause des réductions associées à la consommation d'énergie et des coûts, tout en protégeant la texture et les couleurs des tissus. Par conséquent, les subtilisines actives à froid sont exigées pour des résultats optimaux de lavage aux températures d'eau du robinet, et les publicités actuelles pour des détergents actives à froid indiquent que ce but a été bien atteint. Les premières subtilisines psychrophiles isolées de l'espèce d'Antarctic *Bacillus* ont été largement caractérisées pour respecter de telles exigences <sup>[139, 87]</sup>. Les subtilisines actuellement incorporées dans les détergents actifs à froid sont des enzymes élaborées qui combinent la stabilité de stockage, la stabilité alcaline et l'activité froide. Bien que les subtilisines psychrophiles ne soient pas en soi des composantes de détergents actives à froid, elles ont en grande partie contribué à l'avancement de ce concept économiquement attractif.

La bêta-galactosidase, ou lactase, est un glucoside hydrolase qui hydrolyse spécifiquement le sucre de lait; lactose, en galactose et glucose. Il devrait être souligné que 75 % de la population mondiale souffre de l'intolérance de lactose résultant de la synthèse déficiente de lactase intestinal chez les adultes et aboutissant aux troubles digestifs. Dans ce contexte, la lactase active à froid

d'une bactérie antarctique a été brevetée (WO 01/04276A1) pour sa capacité d'hydrolyser le lactose pendant le stockage du lait aux températures basses <sup>[107]</sup>. Cette lactase active à froid sera aussi produite bientôt en grandes quantités par Nutrilab NV (Bekkevoort, la Belgique) pour hydrolyser le lactose (comme un sous-produit de l'industrie laitière) dans le processus de la valeur en édulcorant; D-tagatose, un monosaccharide naturel de faible valeur calorique et d'indice glycémique.

Les protéines chaperons aident pour le repliement des polypeptides naissants, en prévenant le mauvais repliement ou même sa réparation. En profitant de ces propriétés, des cellules E. coli d'Arctic-Express de Stratagene (les USA) ont été conçues pour co-exprimer les chaperonines actives à froid d'une bactérie antarctique <sup>[53]</sup> avec la protéine recombinante d'intérêt, améliorant ainsi le traitement des protéines aux températures basses (qui empêche la formation de corps d'inclusion) et augmentant le rendement des protéines recombinantes actives et solubles.

### 7.3 Nouvelles spécificités dans les enzymes psychrophiles

Au niveau industriel, la levure *Candida antarctica* produit deux lipases, A et B, la dernière étant vendue par exemple comme Novozym 435 par Novozymes (Bagsvaerd, le Danemark). En conséquence de son substrat et sa stéréospécificité, la lipase B est impliquée dans un très grand nombre d'applications organo-synthétiques liées au traitement de la nourriture/alimentation, aux produits pharmaceutiques, ou à la cosmétique <sup>[192]</sup>. Dans une enquête de brevets liés à l'antarctique <sup>[193]</sup>, on a montré que les lipases de *C. antarctica* dominant de loin le nombre de brevets axés sur les processus, ou sur les produits. Ceci est un exemple significatif du potentiel des nouveaux catalyseurs de ressources génétiques dans les environnements froids.

Les xylanases sont des glucosides hydrolases qui dégradent le polysaccharide bêta-1,4-xylan, décomposant ainsi l'hémicellulose, un des composants majeurs des parois de la cellule végétale. Les xylanases sont un ingrédient clé pour le conditionnement industriel de pâtes, utilisées pour améliorer la qualité du pain. Il a été trouvé que le xylanase d'une bactérie antarctique appartient à une nouvelle classe de xylanases <sup>[21, 98, 134, 194, 195]</sup>. En outre, des cuissons d'essais ont révélé que le xylanase psychrophile était très efficace dans l'amélioration des propriétés de pâte et la qualité du pain avec, par exemple, un effet positif sur le volume du pain <sup>[196, 197]</sup>. Cette efficacité semble être reliée à la haute activité du xylanase psychrophile aux températures fraîches exigées pour le repos de la pâte et à son mode spécifique d'hydrolyse. Cette xylanase est maintenant vendue par Puratos (Grand-Bigard, la Belgique). C'est apparemment l'enzyme psychrophile produite avec les plus grandes quantités, à ce jour.

## 7.4 Autres protéines psychrophiles en biotechnologie

Dans ce contexte, quelques protéines adaptées au froid valent aussi la peine d'être mentionner. Ceci inclut une protéine antigel recombinante d'un poisson arctique ajoutée à plusieurs marques de crèmes glacées alimentaire d'Unilever (les Pays-Bas, l'Angleterre) pour ses propriétés structurantes de la glace. L'antigel bactérien Antarticine-NF3 (parfois sous le nom Antarctilyne), qui est efficace pour des traitements de cicatrice et réépithelialisation de blessures, ou les extraits des algues antarctiques *Durvillea antarctica*, qui sont incluses dans la cosmétique pour améliorer la vitalité de la peau comme dans la crème de jour raffermissant, en tête des ventes de Clarins (France). L'amélioration de l'activité froide par la modification chimique d'enzymes mésophiles a aussi été rapportée <sup>[198-200]</sup> et s'est avérée fructueuse dans quelques cas spécifiques.

## 8. Références bibliographiques

1. Rodrigues, D.F., Tiedje, J.M. (2008). Coping with our cold planet. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1677–1686.
2. Casanueva, A., Stafford, W., Cowan, D.A. (2007). Ecology and Biodiversity of Cold-Adapted Microorganisms, in: Glansdorff, N., Gerday, C. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. American Society of Microbiology, pp. 119–132.
3. Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.-C., Gerday, C. (Eds.). (2008). *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
4. Struvay, C., Feller, G. (2012). Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 11643–11665.
5. Feller, G., Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 200–208.
6. Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 403–433.
7. Feller, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *J Phys Condens Matter* 22: 323101
8. Feller, G. (2013). Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology, *Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology*. Scientifica 2013, e512840.
9. Peterson, M.E., Eisenthal, R., Danson, M.J., Spence, A., Daniel, R.M. (2004). A New Intrinsic Thermal Parameter for Enzymes Reveals True Temperature Optima. *Journal of Biological Chemistry* 279: 20717–20722.
10. Lee, C.K., Daniel, R.M., Shepherd, C., Saul, D., Cary, S.C., Danson, M.J., Eisenthal, R., Peterson, M.E. (2007). Eurythermalism and the temperature dependence of enzyme activity. *FASEB J.* 21: 1934–1941.
11. Peterson, M.E., Daniel, R.M., Danson, M.J., Eisenthal, R. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem. J.* 402: 331–337.
12. Zhong, D., Pal, SK, Zewail AH. (2010). Biological water: A critique. *Chem. Phys. Lett.* 503:1-11.
13. Fernández, A., Scheraga. HA. (2003). Insufficiently dehydrated hydrogen bonds as determinants of protein interactions. *Proc Natl Acad. Sci.* 100: 113-118.
14. Chaplin, M. (2006). Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006, 11: 861-866.
15. Koizumi, M., Hirai, H., Onai, T., Inoue, K., Hirai, M.: Collapse of the hydration shell of a protein prior to thermal unfolding. (2007). *J. Appl. Cryst.* 40: 175-178.
16. Lopez, C.F., Darst, R.K., Rossky, P.J. (2008). Mechanistic elements of protein cold denaturation. *J. Phys. Chem. B.* 112: 5961–5967.
17. Dias, C.L., Ala-Nissila, T., Wong-ekkabut, J., Vattulainen, I., Grant, M., Karttunen, M. (2010). The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology* 60: 91–99.

18. Fields, P.A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 129: 417–431.
19. Saelensminde, G., Halskau, Ø., Jonassen, I. (2009). Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles* 13: 11–20.
20. Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V.N., Gerday, C., Feller, G. (2003). Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J. Biol. Chem.* 278: 37015–37023.
21. Collins, T., Meuwis, M.-A., Gerday, C., Feller, G. (2003). Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.* 328: 419–428.
22. D'Amico, S., Marx, J.-C., Gerday, C., Feller, G. (2003). Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J. Biol. Chem.* 278: 7891–7896.
23. Siddiqui, K.S., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., Giaquinto, L., Cavicchioli, R. (2005). The active site is the least stable structure in the unfolding pathway of a multidomain cold-adapted alpha-amylase. *J. Bacteriol.* 187: 6197–6205.
24. Fields, P.A., Somero, G.N. (1998). 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* 95: 11476–11481.
25. Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. (2000). Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim. Biophys. Acta* 1543: 1–10.
26. Chiuri, R., Maiorano, G., Rizzello, A., del Mercato, L.L., Cingolani, R., Rinaldi, R., Maffia, M., Pompa, P.P. (2009). Exploring Local Flexibility/Rigidity in Psychrophilic and Mesophilic Carbonic Anhydrases. *Biophysical Journal* 96: 1586–1596.
27. Fedøy, A.-E., Yang, N., Martinez, A., Leiros, H.-K.S., Steen, I.H. (2007). 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.* 372: 130–149.
28. D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2000). Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent alpha-amylases. *Gene* 253: 95–105.
29. Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.-A., Sonan, G., Gerday, C. (2001). Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles* 5: 313–321.
30. Tang, K.E., Dill, K.A. (1998). Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16: 397–411.
31. Halle, B. (2002). Flexibility and packing in proteins. *PNAS* 99: 1274–1279.
32. Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.-C., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C. (2004). Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 25–42.

33. Svingor, Á., Kardos, J., Hajdú, I., Németh, A., Závodszky, P. (2001). A Better Enzyme to Cope with Cold comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHS. *J. Biol. Chem.* 276: 28121–28125.
34. Smith, D.K., Radivojac, P., Obradovic, Z., Dunker, A.K., Zhu, G. (2003). Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Sci.* 12: 1060–1072.
35. Kim, S.Y., Hwang, K.Y., Kim, S.H., Sung, H.C., Han, Y.S., Cho, Y. (1999). Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *J. Biol. Chem.* 274: 11761–11767.
36. Cavicchioli, R., Curmi, P.M., Siddiqui, K.S., Thomas, T. (2006). In *Extremophiles-Methods in Microbiology*, Vol. 35, ed. FA Rainey, A Oren, pp.395–436. London: Elsevier-Acad.
37. Siddiqui, K.S., Rangarajan, M., Hartley, B.S., Kitmitto, A., Panico, M., Blench, I.P., Morris, H.R. (1993). *Arthrobacter* D-xylose isomerase: partial proteolysis with thermolysin. *Biochem. J.* 289 (Pt 1): 201–208.
38. Aghajari, N., Van Petegem, F., Villeret, V., Chessa, J.-P., Gerday, C., Haser, R., Van Beeumen, J. (2003). Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins* 50: 636–647.
39. Watanabe, S., Yasutake, Y., Tanaka, I., Takada, Y. (2005). Elucidation of stability determinants of cold-adapted monomeric isocitrate dehydrogenase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia maris*, by construction of chimeric enzymes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151: 1083–1094.
40. Gurd, F.R.N., Rothges, T.M. (1979). Motions in Proteins, in: C.B. Anfinsen, J.T.E. and F.M.R. (Ed.), *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp. 73–165.
41. Henzler-Wildman, K.A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S.J., Karplus, M., Kern, D. (2007). A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450, 913–916.
42. Baldwin, A.J., Kay, L.E. (2009). NMR spectroscopy brings invisible protein states into focus. *Nat. Chem. Biol.* 5: 808–814.
43. Privalov, P.L., 1982. Stability of Proteins: Proteins which do not Present a Single Cooperative System, in: C.B. Anfinsen, J.T.E. and F.M.R. (Ed.), *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp. 1–104.
44. Závodszky, P., Kardos, J., Svingor, null, Petsko, G.A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 7406–7411.
45. Shlyk-Kerner, O., Samish, I., Kaftan, D., Holland, N., Maruthi Sai, P.S., Kless, H., Scherz, A. (2006). Protein flexibility acclimatizes photosynthetic energy conversion to the ambient temperature. *Nature* 442: 827–830.
46. Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Giudici-Orticoni, M.-T., Bruschi, M., Zaccai, G. (2004). Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Rep.* 5: 66–70.

47. Tehei, M., Zaccai, G. (2005). Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in complex systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1724: 404–410.
48. Somero, G.N. (1995). Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 43–68.
49. Feller, G., d'Amico, D., Gerday, C. (1999). Thermodynamic stability of a cold-active alpha-amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry* 38: 4613-4619.
50. Xie, B.B., Bian, F., Chen, X.L., He, H.L., Guo, J., Gao, X., Zeng, Y.X., Chen, B., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z. (2009). Cold Adaptation of Zinc Metalloproteases in the Thermolysin Family from Deep Sea and Arctic Sea Ice Bacteria Revealed by Catalytic and Structural Properties and Molecular Dynamics. *J Biol. Chem.* 284: 9257–9269.
51. Feller, G. (2007). Life at low temperatures: is disorder the driving force? *Extremophiles* 11: 211–216.
52. Goodchild, A., Raftery, M., Saunders, N.F.W., Guilhaus, M., Cavicchioli, R. (2004). Biology of the cold adapted archaeon, *Methanococoides burtonii* determined by proteomics using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 3: 1164–1176.
53. Ferrer, M., Chernikova, T.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Timmis, K.N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* 21: 1266–1267.
54. Smalås, A.O., Heimstad, E.S., Hordvik, A., Willassen, N.P., Male, R. (1994). Cold adaption of enzymes: structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins* 20: 149–166.
55. Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C.E., Feller, G., Gerday, C., Bouriotis, V. (2001). Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* 310: 291–297.
56. Claverie, P., Vigano, C., Ruyschaert, J.-M., Gerday, C., Feller, G. (2003). The precursor of a psychrophilic alpha-amylase: structural characterization and insights into cold adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 1649: 119–122.
57. Suzuki, Y., Takano, K., Kanaya, S. (2005). Stabilities and activities of the N- and C-domains of FKBP22 from a psychrotrophic bacterium overproduced in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 272: 632–642.
58. Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P., Gerday, C. (2000). Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. TACH18. *J. Biol. Chem.* 275: 11147–11153.
59. Liang, Z.X., Tsigos, I., Lee, T., Bouriotis, V., Resing, K.A., Ahn, N.G., Klinman, J.P. (2004). Evidence for increased local flexibility in psychrophilic alcohol dehydrogenase relative to its thermophilic homologue. *Biochemistry* 43: 14676–14683.
60. Fields, P.A., Wahlstrand, B.D., Somero, G.N. (2001). Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes: the interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. *Eur. J. Biochem.* 268: 4497–4505.
61. Liang, Z.-X., Tsigos, I., Bouriotis, V., Klinman, J.P. (2004). Impact of protein flexibility on hydride-transfer parameters in thermophilic and psychrophilic alcohol dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 9500–9501.

62. Olufsen, M., Smalås, A.O., Moe, E., Brandsdal, B.O. (2005). Increased flexibility as a strategy for cold adaptation: a comparative molecular dynamics study of cold- and warm-active uracil DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 280: 18042–18048.
63. Merlino, A., Russo Krauss, I., Castellano, I., De Vendittis, E., Rossi, B., Conte, M., Vergara, A., Sica, F. (2010). Structure and flexibility in cold-adapted iron superoxide dismutases: the case of the enzyme isolated from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Struct. Biol.* 172: 343–352.
64. Russell, R.J., Gerike, U., Danson, M.J., Hough, D.W., Taylor, G.L. (1998). Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure* 6: 351–361.
65. Leiros, H.K.S., Pey, A.L., Inneset, M., Moe, E., Leiros, I., Steen, I.H., Martinez, A. (2007). Structure of Phenylalanine Hydroxylase from *Colwellia psychrerythraea* 34H, a Monomeric Cold Active Enzyme with Local Flexibility around the Active Site and High Overall Stability. *J. Biol. Chem.* 282: 21973–21986.
66. Tsuruta, H., Mikami, B., Aizono, Y. (2005). Crystal structure of cold-active protein-tyrosine phosphatase from a psychrophile, *Shewanella* sp. *J. Biochem.* 137: 69–77.
67. Tsuruta, H., Mikami, B., Higashi, T., Aizono, Y. (2010). Crystal structure of cold-active alkaline phosphatase from the psychrophile *Shewanella* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 69–74.
68. Coquelle, N., Fioravanti, E., Weik, M., Vellieux, F., Madern, D. (2007). Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.* 374: 547–562.
69. Papaleo, E., Olufsen, M., De Gioia, L., Brandsdal, B.O. (2007). Optimization of electrostatics as a strategy for cold-adaptation: a case study of cold- and warm-active elastases. *J. Mol. Graph. Model.* 26: 93–103.
70. Heimstad, E.S., Hansen, L.K., Smalås, A.O. (1995). Comparative molecular dynamics simulation studies of salmon and bovine trypsins in aqueous solution. *Protein Eng.* 8: 379–388.
71. Brandsdal, B.O., Heimstad, E.S., Sylte, I., Smalås, A.O. (1999). Comparative molecular dynamics of mesophilic and psychrophilic protein homologues studied by 1.2 ns simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 17: 493–506.
72. Adekoya, O.A., Helland, R., Willassen, N.-P., Sylte, I. (2006). Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaptation of an enzyme in the thermolysin family. *Proteins* 62: 435–449.
73. Papaleo, E., Riccardi, L., Villa, C., Fantucci, P., De Gioia, L. (2006). Flexibility and enzymatic cold-adaptation: a comparative molecular dynamics investigation of the elastase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 1397–1406.
74. Spiwok, V., Lipovova, P., Skalova, T. et al. (2007). Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling* 13: 485–497.
75. Papaleo, E., Pasi, M., Riccardi, L., Sambì, I., Fantucci, P., De Gioia, L. (2008). Protein flexibility in psychrophilic and mesophilic trypsins. Evidence of evolutionary conservation of protein dynamics in trypsin-like serine-proteases. *FEBS Lett.* 582: 1008–1018.

76. Aurilia, V., Rioux-Dubé, J.F., Marabotti, A., Pézolet, M., D'Auria, S. (2009). Structure and dynamics of cold-adapted enzymes as investigated by FT-IR spectroscopy and MD. The case of an esterase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Phys. Chem. B.* 113: 7753–7761.
77. Pasi, M., Riccardi, L., Fantucci, P., De Gioia, L., Papaleo, E. (2009). Dynamic properties of a psychrophilic alpha-amylase in comparison with a mesophilic homologue. *J. Phys. Chem. B.* 113: 13585–13595.
78. Papaleo, E., Tiberti, M., Invernizzi, G., Pasi, M., Ranzani, V. (2011). Molecular determinants of enzyme cold adaptation: comparative structural and computational studies of cold- and warm-adapted enzymes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12: 657–683.
79. Tiberti, M., Papaleo, E. (2011). Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases. *J. Struct. Biol.* 174: 69–83.
80. Riccardi, L., Papaleo, E. (2010). Unfolding simulations of cold- and warm-adapted elastases. *IIOABJ* 1: 11-17.
81. Smalås, A.O., Leiros, H.K., Os, V., Willassen, N.P. (2000). Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1–57.
82. Tsigos, I., Velonia, K., Smonou, I., Bouriotis, V. (1998). Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *Eur. J. Biochem.* 254: 356–362.
83. D'Amico, S., Sohler, J.S., Feller, G. (2006). Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: insights into active site mobility in a psychrophilic alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 358: 1296–1304.
84. Sun, K., Camardella, L., Di Prisco, G., Hervé, G. (1998). Properties of aspartate transcarbamylase from TAD1, a psychrophilic bacterial strain isolated from Antarctica. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 375–382.
85. Xu, Y., Zhang, Y., Liang, Z., Van de Castele, M., Legrain, C., Glansdorff, N. (1998). Aspartate carbamoyltransferase from a psychrophilic deep-sea bacterium, *Vibrio* strain 2693: properties of the enzyme, genetic organization and synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 5): 1435–1441.
86. Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K., Maes, D. (1998). Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273: 2199–2206.
87. Narinx, E., Baise, E., Gerday, C. (1997). Subtilisin from psychrophilic antarctic bacteria: characterization and site-directed mutagenesis of residues possibly involved in the adaptation to cold. *Protein Eng.* 10: 1271–1279.
88. Georlette, D., Insson, Z.O., Van Petegem, F., Chessa, J., Van Beeumen, J., Hübscher, U., Gerday, C. (2000). A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. *Eur. J. Biochem.* 267: 3502–3512.

89. Masullo, M., Arcari, P., de Paola, B., Parmeggiani, A., Bocchini, V. (2000). Psychrophilic elongation factor Tu from the antarctic *Moraxella* sp. Tac II 25: biochemical characterization and cloning of the encoding gene. *Biochemistry* 39: 15531–15539.
90. Ciardiello, M. A., Camardella, L., Carratore, V., Di Prisco, G. (2000). L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*: primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 11–23.
91. Di Fraia, R., Wilquet, V., Ciardiello, M.A., Carratore, V., Antignani, A., Camardella, L., Glansdorff, N., Di Prisco, G. (2000). NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase in the Antarctic psychrotolerant bacterium *Psychrobacter* sp. TAD1. Characterization, protein and DNA sequence, and relationship to other glutamate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 267: 121–131.
92. D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2001). Structural Determinants of Cold Adaptation and Stability in a Large Protein. *J. Biol. Chem.* 276: 25791–25796.
93. Xu, Y., Feller, G., Gerday, C., Glansdorff, N. (2003). Moritella cold-active dihydrofolate reductase: are there natural limits to optimization of catalytic efficiency at low temperature? *J. Bacteriol.* 185: 5519–5526.
94. Evans, R.M., Behiry, E.M., Tey, L.-H., Guo, J., Loveridge, E.J., Allemann, R.K. (2010). Catalysis by dihydrofolate reductase from the psychropiezophile *Moritella profunda*. *Chembiochem* 11: 2010–2017.
95. Garsoux, G., Lamotte, J., Gerday, C., Feller, G. (2004). Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Biochem. J.* 384: 247–253.
96. Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N.P., Smalås, A.O., Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold-adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 274: 252–263.
97. Birolo, L., Tutino, M.L., Fontanella, B., Gerday, C., Mainolfi, K., Pascarella, S., Sannia, G., Vinci, F., Marino, G. (2000). Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling. *Eur. J. Biochem.* 267: 2790–2802.
98. Collins, T., Meuwis, M.-A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., Gerday, C. (2002). A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 277: 35133–35139.
99. Xu, Y., Feller, G., Gerday, C., Glansdorff, N. (2003). Metabolic enzymes from psychrophilic bacteria: challenge of adaptation to low temperatures in ornithine carbamoyltransferase from *Moritella abyssi*. *J. Bacteriol.* 185: 2161–2168.
100. Gerike, U., Danson, M.J., Russell, N.J., Hough, D.W. (1997). Sequencing and expression of the gene encoding a cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium, strain DS2-3R. *Eur. J. Biochem.* 248: 49–57.

101. Li, X., Jiang, X., Li, H., Ren, D. (2008). Purine nucleoside phosphorylase from *Pseudoalteromonas* sp. Bsi590: molecular cloning, gene expression and characterization of the recombinant protein. *Extremophiles* 12: 325–333.
102. Cartier, G., Lorieux, F., Allemand, F., Dreyfus, M., Bizebard, T. (2010). Cold adaptation in DEAD-box proteins. *Biochemistry* 49: 2636–2646.
103. Tang, M.A.K., Motoshima, H., Watanabe, K. (2012). Fluorescence studies on the stability, flexibility and substrate-induced conformational changes of acetate kinases from psychrophilic and mesophilic bacteria. *Protein J.* 31: 337–344.
104. Asgeirsson, B., Cekan, P. (2006). Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod. *FEBS Lett.* 580: 4639–4644.
105. Low, P.S., Bada, J.L., Somero, G.N. (1973). Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 430–432.
106. Thomas, T., Cavicchioli, R. (2000). Effect of Temperature on Stability and Activity of Elongation Factor 2 Proteins from Antarctic and Thermophilic Methanogens. *J. Bacteriol.* 182: 1328–1332.
107. Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., François, J.M., Baise, E., Feller, G., Gerday, C. (2001). Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1529–1535.
108. Lam, S.Y., Yeung, R.C.Y., Yu, T.H., Sze, K.H., Wong, K.B. (2011). A rigidifying salt-bridge favors the activity of thermophilic enzyme at high temperatures at the expense of low-temperature activity. *PLoS Biol.* 9, e1001027.
109. Bjelic, S., Brandsdal, B.O., Aqvist, J. (2008). Cold adaptation of enzyme reaction rates. *Biochemistry* 47: 10049–10057.
110. Leiros, I., Moe, E., Lanes, O., Smalås, A.O., Willassen, N.P. (2003). The structure of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) reveals cold-adaptation features. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59: 1357–1365.
111. Olufsen, M., Smalås, A.O., Brandsdal, B.O. (2008). Electrostatic interactions play an essential role in DNA repair and cold-adaptation of uracil DNA glycosylase. *J. Mol. Model.* 14: 201–213.
112. Raeder, I.L.U., Moe, E., Willassen, N.P., Smalås, A.O., Leiros, I. (2010). Structure of uracil-DNA N-glycosylase (UNG) from *Vibrio cholerae*: mapping temperature adaptation through structural and mutational analysis. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66: 130–136.
113. Gorfe, A.A., Brandsdal, B.O., Leiros, H.K., Helland, R., Smalås, A.O. (2000). Electrostatics of mesophilic and psychrophilic trypsin isoenzymes: qualitative evaluation of electrostatic differences at the substrate binding site. *Proteins* 40: 207–217.
114. Brandsdal, B.O., Smalås, A.O., Aqvist, J. (2001). Electrostatic effects play a central role in cold adaptation of trypsin. *FEBS Lett.* 499: 171–175.
115. Moe, E., Leiros, I., Riise, E.K., Olufsen, M., Lanes, O., Smalås, A., Willassen, N.P. (2004). Optimisation of the surface electrostatics as a strategy for cold adaptation of uracil-DNA N-glycosylase (UNG) from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Mol. Biol.* 343: 1221–1230.

116. Huston, A.L., Haeggström, J.Z., Feller, G. (2008). Cold adaptation of enzymes: structural, kinetic and microcalorimetric characterizations of an aminopeptidase from the Arctic psychrophile *Colwellia psychrerythraea* and of human leukotriene A(4) hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 1865–1872.
117. D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2002). Dual Effects of an Extra Disulfide Bond on the Activity and Stability of a Cold-adapted  $\alpha$ -Amylase. *J. Biol. Chem.* 277: 46110–46115.
118. Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293–308.
119. Bell, G.S., Russell, R.J.M., Connaris, H., Hough, D.W., Danson, M.J., Taylor, G.L. (2002). Stepwise adaptations of citrate synthase to survival at life's extremes. From psychrophile to hyperthermophile. *Eur. J. Biochem.* 269: 6250–6260.
120. Kumar, S., Nussinov, R. (2004). Different roles of electrostatics in heat and in cold: adaptation by citrate synthase. *Chembiochem* 5: 280–290.
121. Thomas, T., Cavicchioli, R. (1998). Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett.* 439: 281–286.
122. Sheridan, P.P., Panasik, N., Coombs, J.M., Brenchley, J.E. (2000). Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1543: 417–433.
123. Saunders, N.F.W., Thomas, T., Curmi, P.M.G., Mattick, J.S., Kuczek, E., Slade, R., Davis, J., Franzmann, P.D., Boone, D., Rusterholtz, K., Feldman, R., Gates, C., Bench, S., Sowers, K., Kadner, K., Aerts, A., Dehal, P., Detter, C., Glavina, T., Lucas, S., Richardson, P., Larimer, F., Hauser, L., Land, M., Cavicchioli, R. (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Res.* 13: 1580–1588.
124. Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S. (2004). In *Enzyme Technology*, ed. A Pandey, C Webb, CR Soccol, C Larroche, pp. 615–38. New York, NY: Springer Science.
125. Feller, G., Gerday, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 830–841.
126. Arpigny, J.L., Feller, G., Davail, S., Genicot, S., Narinx, E., et al. (1994). In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, ed. R Gilles, pp. 269–95. Berlin: Springer-Verlag.
127. Gianese, G., Bossa, F., Pascarella, S. (2002). Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes. *Proteins* 47: 236–249.
128. Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. (1994). Hydration effects in protein unfolding. *Biophys. Chem.* 51: 291–304; discussion 304–309.
129. Privalov, P.L., Gill, S.J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* 39: 191–234.

130. Leiros, H.K., Willassen, N.P., Smalås, A.O. (2000). Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur. J. Biochem.* 267: 1039–1049.
131. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., Haser, R. (1998). Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* 7: 564–572.
132. Bae, E., Phillips, G.N. (2004). Structures and Analysis of Highly Homologous Psychrophilic, Mesophilic, and Thermophilic Adenylate Kinases. *J. Biol. Chem.* 279: 28202–28208.
133. Kumar, S., Tsai, C.-J., Nussinov, R. (2002). Maximal stabilities of reversible two-state proteins. *Biochemistry* 41: 5359–5374.
134. Van Petegem, F., Collins, T., Meuwis, M.-A., Gerday, C., Feller, G., Van Beeumen, J. (2003). The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J. Biol. Chem.* 278: 7531–7539.
135. de Backer, M., McSweeney, S., Rasmussen, H.B., Riise, B.W., Lindley, P., Hough, E. (2002). The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *J. Mol. Biol.* 318: 1265–1274.
136. Tsai, C.-J., Maizel, J.V., Nussinov, R. (2002). The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 55–69.
137. Leiros, HK, Willassen, NP, Smalas, AO. (2000). *Eur. J. Biochem.* 267:1039–49.
138. Feller, G., Zekhnini, Z., Lamotte-Brasseur, J., Gerday, C. (1997). Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur. J. Biochem.* 244: 186–191.
139. Davail, S., Feller, G., Narinx, E., Gerday, C. (1994). Cold adaptation of proteins. Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J. Biol. Chem.* 269: 17448–17453.
140. Narinx, E., Davail, S., Feller, G., Gerday, C. (1992). Nucleotide and derived amino acid sequence of the subtilisin from the antarctic psychrotroph *Bacillus* TA39. *Biochim. Biophys. Acta* 1131: 111–113.
141. Arnórsdóttir, J., Kristjánsson, M.M., Ficner, R. (2005). Crystal structure of a subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species reveals structural aspects of cold adaptation. *FEBS J.* 272: 832–845.
142. Bhattacharya, S., Lecomte, J.T. (1997). Temperature dependence of histidine ionization constants in myoglobin. *Biophys. J.* 73: 3241–3256.
143. Violot, S., Aghajari, N., Czjzek, M., Feller, G., Sonan, G.K., Gouet, P., Gerday, C., Haser, R., Receveur-Bréchet, V. (2005). Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 348: 1211–1224.
144. Methé, B.A., Nelson, K.E., Deming, J.W., Momen, B., Melamud, E., Zhang, X., Moulton, J., Madupu, R., Nelson, W.C., Dodson, R.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., Sullivan, S.A., Zhou, L., Davidsen, T.M., Wu, M., Huston, A.L., Lewis, M., Weaver, B.,

- Weidman, J.F., Khouri, H., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V., Fraser, C.M. (2005). The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 10913–10918.
145. Spassov, V.Z., Karshikoff, A.D., Ladenstein, R. (1995). The optimization of protein-solvent interactions: thermostability and the role of hydrophobic and electrostatic interactions. *Protein Sci* 4: 1516–1527.
146. Kumar, S., Ma, B., Tsai, C.J., Nussinov, R. (2000). Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *Proteins* 38: 368–383.
147. Vieille, C., Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1–43.
148. Cupo, P., El-Deiry, W., Whitney, P.L., Awad, W.M. (1980). Stabilization of proteins by guanidination. *J. Biol. Chem.* 255: 10828–10833.
149. Mrabet, N.T., Van den Broeck, A., Van den brande, I., Stanssens, P., Laroche, Y., Lambeir, A.M., Matthijssens, G., Jenkins, J., Chiadmi, M., van Tilbeurgh, H. (1992). Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry* 31: 2239–2253.
150. Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M., Haser, R., Gerday, C. (1994). Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur. J. Biochem.* 222: 441–447.
151. Chessa, J.P., Feller, G., Gerday, C. (1999). Purification and characterization of the heat-labile alpha-amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. *Can. J. Microbiol.* 45: 452–457.
152. Feller, G., 2003. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 648–662.
153. Siddiqui, K.S., Poljak, A., Guilhaus, M., De Francisci, D., Curmi, P.M.G., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., Uversky, V.N., Cavicchioli, R. (2006). Role of lysine versus arginine in enzyme cold-adaptation: Modifying lysine to homo-arginine stabilizes the cold-adapted  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteramonas haloplanktis*. *Proteins* 64: 486–501.
154. Wallon, G., Lovett, S.T., Magyar, C., Svingor, A., Szilagyi, A., Závodszy, P., Ringe, D., Petsko, G.A. (1997). Sequence and homology model of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the psychrotrophic bacterium *Vibrio* sp. I5 suggest reasons for thermal instability. *Protein Eng.* 10: 665–672.
155. Kapp, G.T., Richardson, J.S., Oas, T.G. (2004). Kinetic role of helix caps in protein folding is context-dependent. *Biochemistry* 43: 3814–3823.
156. Rentier-Delrue, F., Mande, S.C., Moyens, S., Terpstra, P., Mainfroid, V., Goraj, K., Lion, M., Hol, W.G.J., Martial, J.A. (1993). Cloning and Overexpression of the Triosephosphate Isomerase Genes from Psychrophilic and Thermophilic Bacteria: Structural Comparison of the Predicted protein Sequences. *Journal of Molecular Biology* 229: 85–93.
157. Richardson, J.S., Richardson, D.C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* 240: 1648–1652.

158. O'Neil, K.T., DeGrado, W.F. (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250: 646–651.
159. Aurora, R., Creamer, T.P., Srinivasan, R., Rose, G.D. (1997). Local interactions in protein folding: lessons from the alpha-helix. *J. Biol. Chem.* 272: 1413–1416.
160. Asgeirsson, B., Nielsen, B.N., Højrup, P. (2003). Amino acid sequence of the cold-active alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 136: 45–60.
161. Siddiqui, K.S., Poljak, A., Guilhaus, M., Feller, G., D'Amico S, et al. (2005). Role of disulfide bridges in the activity and stability of a cold-active alpha- amylase. *J. Bacteriol.* 187: 6206–12.
162. Cipolla, A., D'Amico, S., Barumandzadeh, R., Matagne, A., Feller, G. (2011). Stepwise adaptations to low temperature as revealed by multiple mutants of psychrophilic  $\alpha$ -amylase from Antarctic Bacterium. *J. Biol. Chem.* 286: 38348–38355.
163. D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2003). Temperature adaptation of proteins: engineering mesophilic-like activity and stability in a cold-adapted alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 332: 981–988.
164. Papaleo, E., Pasi, M., Tiberti, M., De Gioia, L. (2011). Molecular dynamics of mesophilic-like mutants of a cold-adapted enzyme: insights into distal effects induced by the mutations. *PLoS One*, 6, e24214.
165. Mavromatis, K., Tsigos, I., Tzanodaskalaki, M., Kokkinidis, M., Bouriotis, V. (2002). Exploring the role of a glycine cluster in cold adaptation of an alkaline phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 269: 2330–2335.
166. Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., Esaki, N. (2004). Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly-->Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 59–65.
167. Sakaguchi, M., Matsuzaki, M., Niimiya, K., Seino, J., Sugahara, Y., Kawakita, M. (2007). Role of proline residues in conferring thermostability on aqualysin I. *J. Biochem.* 141: 213–220.
168. Laurell, H., Contreras, J.A., Castan, I., Langin, D., Holm, C. (2000). Analysis of the psychrotolerant property of hormone-sensitive lipase through site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* 13: 711–717.
169. Gerike, U., Danson, M.J., Hough, D.W. (2001). Cold-active citrate synthase: mutagenesis of active-site residues. *Protein Eng.* 14: 655–661.
170. Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S. (2001). Heat labile ribonuclease HI from a psychrotrophic bacterium: gene cloning, characterization and site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* 14: 975–982.
171. Tsigos, I., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Pozidis, C., Kokkinidis, M., Bouriotis, V., (2001). Engineering the properties of a cold active enzyme through rational redesign of the active site. *Eur. J. Biochem.* 268: 5074–5080.
172. Mavromatis, K., Feller, G., Kokkinidis, M., Bouriotis, V. (2003). Cold adaptation of a psychrophilic chitinase: a mutagenesis study. *Protein Eng.* 16: 497–503.

173. Arnórsdóttir, J., Helgadóttir, S., Thorbjarnardóttir, S.H., Eggertsson, G., Kristjánsson, M.M., (2007). Effect of selected Ser/Ala and Xaa/Pro mutations on the stability and catalytic properties of a cold adapted subtilisin-like serine proteinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1774: 749–755.
174. Yang, Y.R., Zhu, H., Fang, N., Liang, X., Zhong, C.Q., Tang, X.F., Shen, P., Tang, B. (2008). Cold-adapted maturation of thermophilic WF146 protease by mimicking the propeptide binding interactions of psychrophilic subtilisin S41. *FEBS Lett.* 582: 2620–2626.
175. Matsuo, S., Shirai, H., Takada, Y. (2010). Isocitrate dehydrogenase isozymes from a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas psychrophila*. *Arch. Microbiol.* 192: 639–650.
176. Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N., Arnold, F.H. (2000). Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297: 1015–1026.
177. Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Arnold, F.H. (2000). Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J. Biol. Chem.* 275: 31635–31640.
178. E. Bae, E., Phillips Jr., G. N. (2006). Roles of static and dynamic domains in stability and catalysis of adenylate kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 2132–2137.
179. Wintrode, P.L., Arnold, F.H. (2000). Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution. *Adv. Protein Chem.* 55: 161–225.
180. D’Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.A., Feller, G., Gerday, C. (2002). Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 917–925.
181. Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.O., Arnold, F.H. (1998). Directed evolution of a thermostable esterase. *PNAS* 95: 12809–12813.
182. Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., Pedersen, A.H. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17: 379–384.
183. Noguchi, A., Nishino, T., Nakayama, T. (2009). Kinetic and thermodynamic characterization of the cold activity acquired upon single amino-acid substitution near the active site of a thermostable  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56: 300–306.
184. Tosco, A., Birolo, L., Madonna, S., Lolli, G., Sannia, G., Marino, G. (2003). GroEL from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: molecular characterization and gene cloning. *Extremophiles* 7: 17–28.
185. Piette, F., D’Amico, S., Struvay, C., Mazzucchelli, G., Renaut, J., Tutino, M.L., Danchin, A., Leprince, P., Feller, G. (2010). Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Mol. Microbiol.* 76: 120–132.
186. Cotugno, R., Rosaria Ruocco, M., Marco, S., Falasca, P., Evangelista, G., Raimo, G., Chambery, A., Di Maro, A., Masullo, M., De Vendittis, E. (2009). Differential cold-adaptation among protein components of the thioredoxin system in the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Mol Biosyst* 5: 519–528.

187. Falasca, P., Evangelista, G., Cotugno, R., Marco, S., Masullo, M., De Vendittis, E., Raimo, G. (2012). Properties of the endogenous components of the thioredoxin system in the psychrophilic eubacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *Extremophiles* 16: 539–552.
188. Kobori, H., Sullivan, C.W., Shizuya, H. (1984). Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: Rapid 5' end-labeling of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6691–6695.
189. Wang, E., Koutsioulis, D., Leiros, H.-K.S., Andersen, O.A., Bouriotis, V., Hough, E., Heikinheimo, P. (2007). Crystal structure of alkaline phosphatase from the Antarctic bacterium TAB5. *J. Mol. Biol.* 366: 1318–1331.
190. Rina, M., Pozidis, C., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Kokkinidis, M., Bouriotis, V., (2000). Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. Properties and psychrophilic adaptations. *Eur. J. Biochem.* 267: 1230–1238.
191. Koutsioulis, D., Wang, E., Tzanodaskalaki, M., Nikiforaki, D., Deli, A., Feller, G., Heikinheimo, P., Bouriotis, V. (2008). Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Eng. Des. Sel.* 21: 319–327.
192. Babu, J., Ramteke, P. W., Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances.* 26: 457–470.
193. Lohan, D., Johnston, S., “UNU-IAS report: bioprospecting in Antarctica, [http://www.ias.unu.edu/binaries2/antarctic\\_bioprospecting.pdf](http://www.ias.unu.edu/binaries2/antarctic_bioprospecting.pdf).
194. De Vos, D., Collins, T., Nerinckx, W., Savvides, S.N., Claeysens, M., Gerday, C., Feller, G., Van Beeumen, J. (2006). Oligosaccharide Binding in Family 8 Glycosidases: Crystal Structures of Active-Site Mutants of the  $\beta$ -1,4-Xylanase pXyl from *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a in Complex with Substrate and Product. *Biochemistry* 45: 4797–4807.
195. Collins, T., De Vos, D., Hoyoux, A., Savvides, S.N., Gerday, C., Van Beeumen, J., Feller, G. (2005). Study of the active site residues of a glycoside hydrolase family 8 xylanase. *J. Mol. Biol.* 354: 425–435.
196. Collins, T., Hoyoux, A., Dutron, A., Georis, J., Genot, B., Dauvrin, T., Arnaut, F., Gerday, C., Feller, G. (2006). Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *Journal of cereal science.*
197. Dornez, E., Verjans, P., Arnaut, F., Delcour, J.A., Courtin, C.M. (2011). Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9553–9562.
198. Siddiqui, K. S., Poljak, A., Cavicchioli, R. (2004). Improved activity and stability of alkaline phosphatases from psychrophilic and mesophilic organisms by chemically modifying aliphatic or amino groups using tetracarboxy-benzophenone derivatives. *Cellular and Molecular Biology.* 50: 657–667.
199. Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. (2005). Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides. *Extremophiles* 9: 471–476.

200. Siddiqui, K.S., Parkin, D.M., Curmi, P.M.G., De Francisci, D., Poljak, A., Barrow, K., Noble, M.H., Trehella, J., Cavicchioli, R. (2009). A novel approach for enhancing the catalytic efficiency of a protease at low temperature: reduction in substrate inhibition by chemical modification. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 676–686.

**Chapitre II :**  
**L'Enzyme Adaptée au Froid :**  
**Endonucléase I**

## 1. Introduction

Les enzymes extracellulaires et péri-plasmiques d'organismes marins sont exposées aux environnements dans lesquels de grandes variations dans la température et la salinité peuvent arriver. De telles conditions exigent que les protéines se replient efficacement et maintiennent leur stabilité malgré les tensions auxquelles elles font face <sup>[1]</sup>. En même temps, l'activité enzymatique est dépendante d'une flexibilité structurelle bien ajustée <sup>[2]</sup>. Comment les enzymes font-elles face à ces demandes contradictoires ?

L'étude de l'adaptation structurelle et fonctionnelle des protéines d'organismes extrêmophiles est un domaine de recherche très actif, et plusieurs observations intéressantes des mécanismes adaptatifs ont été faites. La stabilité à une température extrême des protéines thermophiles est considérée comme le résultat des vastes réseaux intramoléculaires et de l'emballage compact qui limite leur flexibilité <sup>[3,4]</sup>. Les enzymes psychrophiles, au contraire, sont thermolabiles et on a émis l'hypothèse qu'elles utilisent la flexibilité accrue pour faire face à la viscosité élevée et à la diminution des vibrations thermiques à basse température <sup>[5,6]</sup>.

Comparées aux non-halophiles, les protéines halophiles ont un excès de résidus acides d'acides aminés qui créent un potentiel superficiel négatif et un réseau d'ion hydraté protecteur <sup>[1,7]</sup>. On considère que cette augmentation de l'acidité empêcherait l'agrégation <sup>[8]</sup>. La surface chargée est, cependant, déstabilisante, particulièrement aux basses concentrations en sel <sup>[8]</sup> et la plupart des protéines halophiles sont désactivées à des concentrations en NaCl ou KCl en dessous de 2M <sup>[1]</sup>.

La base structurelle de l'activité tolérante au sel reste à élucider, bien que des interactions électrostatiques aient été impliquées <sup>[9]</sup>. La salinité d'eau de mer est significativement plus basse que celle des habitats halophiles extrêmes, pour que seulement les formes d'adaptation les plus douces puissent être nécessaires pour les protéines extracellulaires et péri-plasmiques d'organismes marins.

L'environnement marin et estuarien héberge une diversité énorme de bactéries. Parmi les bactéries marines ou estuariennes les plus étudiées appartiennent au genre *Vibrio*, avec *Vibrio cholerae* étant l'espèce la plus connue, comme c'est la cause de choléra chez l'homme. *V. Cholerae* est trouvée dans les régions tropicales et tempérées, et peut être classifiée comme une bactérie mésophile avec une croissance optimale autour de 37°C, en plus elle préfère les eaux estuariennes <sup>[10,11]</sup>. La bactérie avec une des températures optimales de croissance les

plus basses trouvées dans le genre *Vibrio* est la *Vibrio salmonicida*, un pathogène du poisson. Elle a une température de croissance optimale de  $\approx 15^{\circ}\text{C}$  et exige le NaCl pour la croissance [12]. Elle peut donc être classifiée comme une bactérie psychrophile et légèrement halophile.

La membrane extérieure et la paroi cellulaire des bactéries gram-négative ne limitent pas le passage des ions, et les protéines péri-plasmiques sont, comme les protéines extracellulaires, constamment exposées à la salinité de l'eau environnante. EndA est une endonucléase péri-plasmique ou extracellulaire non spécifique. On ne connaît pas sa fonction physiologique, mais il a été proposé pour qu'elle soit impliquée dans la prévention de l'assimilation d'ADN étranger, la dégradation de mucus intestinal pour faciliter la colonisation et l'apport des nucléotides pour les cellules [13]. Bien que l'EndA a été isolée de beaucoup de bactéries pathogènes, elle ne semble pas être impliquée dans la virulence [13-15]. Elle peut, cependant, affecter le taux de survie bactérien par la dégradation des pièges neutrophiles extracellulaires dans les mammifères et probablement aussi dans le poisson [16,17]. Les structures de trois *Vibrio* endonucléases ; *V. salmonicida* (VsEndA) [18], *V. cholerae* (VcEndA) [19] et *V. vulnificus* (Vvn) [20], sont disponibles et aussi la structure de Vvn attaché à 8 bp et 16 bp dsDNA [20,21]. On a proposé un mécanisme réactionnel basé sur la structure du complexe ADN-protéine [20].

L'endonucléase est une enzyme connue pour cliver tant l'ARN que l'ADN aux sites (endo) internes non spécifiques. Elle clive aussi l'ADN plasmidique et simple brin [14]. L'enzyme clive au côté 3' de la liaison phosphodiester, laissant des produits avec des extrémités 5'-phosphate. Il fonctionne comme une base générale, qui active une molécule d'eau pour une attaque en vigueur sur le phosphate scissile dans le substrat d'ADN. Une histidine (HIS80) fonctionne comme une base générale, qui active une molécule d'eau pour une attaque en vigueur sur le phosphate scissile dans le substrat d'ADN. Le rôle de l'ion magnésium du site actif est de stabiliser l'état de transition phosphoanion, et rendre un proton disponible pour le 3'-oxygène du groupe partant, par une molécule d'eau liée. Une arginine (ARG99) est censée stabiliser le produit par une liaison hydrogène avec le phosphate, ce qui ralentit aussi la réaction inverse [20].

Une étude antérieure a présenté le clonage, l'expression et la purification de l'endonucléase I des enzymes du psychrophile *V. salmonicida* (VsEndA) et du mésophile *V. cholerae* (VcEndA) [22]. Les deux enzymes orthologues ont été biochimiquement et bio physiquement caractérisées pour révéler les différences possibles liées à l'adaptation environnementale.

## 2. Similarité des séquences et composition

VsEndA et VcEndA montrent l'identité à 71 % et la similitude à 80 % (Blosum62) au niveau d'acide aminé, quand les enzymes actives sont comparées sans leur peptide-signal N-terminal (Fig. 1). Le repli structurel et le site actif important pour la catalyse et contenant HIS80 et ARG99, sont identiques dans les deux structures. On montre un alignement de séquences de VcEndA et VsEndA dans la figure 1. Les deux premiers acides aminés au N-terminal (THR et MET) sont codés par le vecteur d'expression.

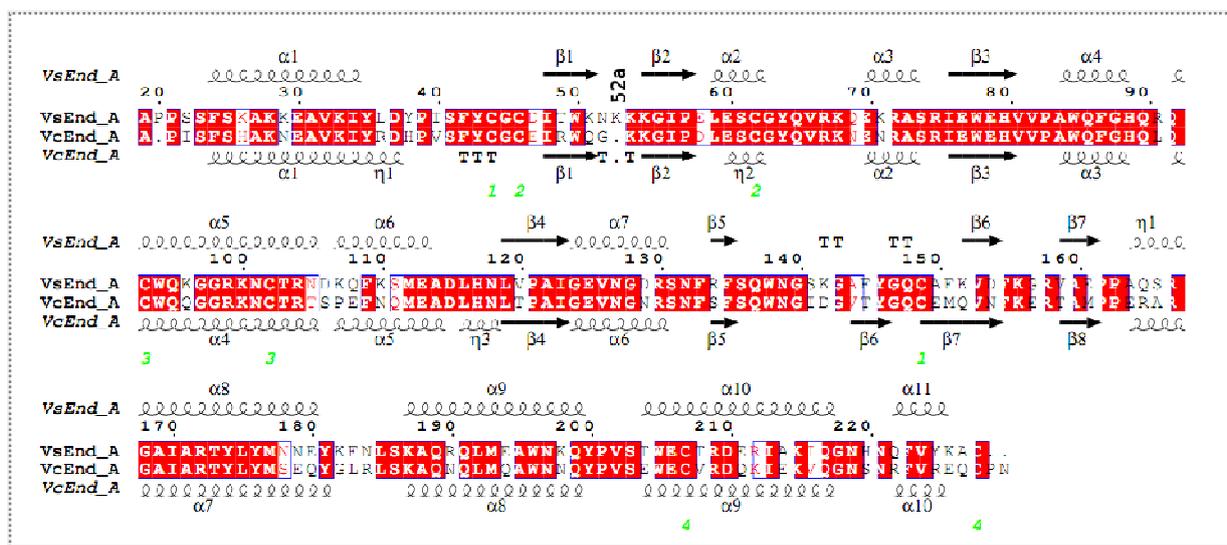


Figure 1 : Alignement des séquences des enzymes VsEndA et VcEndA, utilisant le programme ESPript 3.0 [23]. Les nombres indiquent les cystéines impliquées dans les ponts disulfures.

Une analyse de la composition d'acide aminé montre que VsEndA contient 13 lysines de plus et deux arginines en moins que VcEndA, aboutissant à un rapport R/K très élevé pour l'enzyme mésophile (1.6 contre 0.6, respectivement). De plus, VsEndA contient deux D+E en moins que VcEndA. Cependant, toutes les cystéines impliquées dans la formation de pont disulfure dans VcEndA sont aussi trouvées dans la séquence de VsEndA (figure 1). Le PI théorique est 9.61 pour VsEndA et 8.62 pour VcEndA.

Les enzymes halophiles ont été rapportées pour être plus enrichies avec les acides aminés négativement chargés que leurs homologues non halophiles [24, 25]. C'est le contraire avec les enzymes étudiées ici où, il y a une grande augmentation du nombre d'acides aminés positivement chargés dans VsEndA, aboutissant à un pI théorique très élevé. Ceci est

principalement causé par la présence d'un grand nombre de résidus LYS dans VsEndA. VsEndA a aussi un nombre légèrement plus haut de résidus ALA que l'autre enzyme. Cette augmentation du contenu en LYS et ALA semble être au détriment de ASN et des résidus GLN (un total de 28 dans VsEndA, 35 dans VcEndA). La structure primaire de VsEndA contient aussi une lysine supplémentaire (LYS52a) qui crée un vide dans l'alignement dans la figure 1.

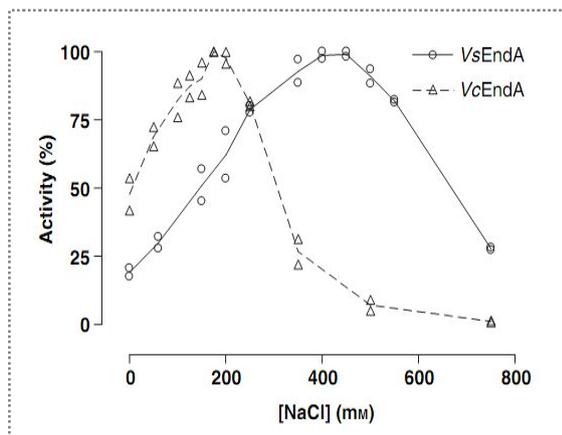


Figure 2 : La concentration en NaCl optimale pour l'activité du DNase. DNaseAlert est utilisé comme substrat<sup>[22]</sup>.

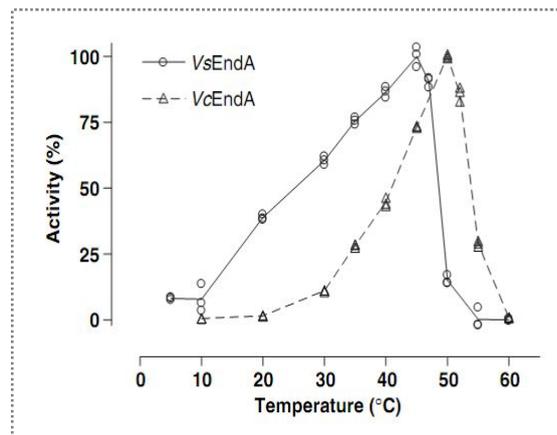


Figure 3 : La température optimale pour l'activité<sup>[22]</sup>.

### 3. Propriétés enzymatiques

#### 3.1 La dépendance en sel

Les concentrations optimales de NaCl pour l'activité révélés sont 425 mM pour VsEndA et 175 mM pour VcEndA, respectivement (figure 2) <sup>[22]</sup>. VsEndAsemble s'adapter à des concentrations en NaCl plus élevées en augmentant le nombre des résidus positivement chargés sur la surface de l'enzyme. Ces résidus sont distribués sur toute la surface, mais avec un léger regroupement sur le côté faisant face au substrat d'ADN. Une concentration en sel inférieure à l'optimale ; 425 mM, peut aboutir à une affinité pour le substrat qui est trop forte pour la catalyse efficace et la libération du produit.

Il devrait être noté que la concentration de NaCl influence aussi le potentiel électrostatique du substrat. Donc, l'activité optimale des deux enzymes doit impliquer un ajustement bien précis des potentiels positifs des sites de liaison de l'enzyme, et du potentiel négatif du substrat d'ADN.

#### 3.2 pH optimal

Le pH optimal pour l'activité de VsEndA et VcEndA est de  $\approx 8.5-9.0$  et  $7.5-8.0$ , respectivement, quand il est mesuré dans des solutions tampons de Tris / HCl et diethanolamine / HCl <sup>[22]</sup>. Le pH optimal reste inchangé par la modification des concentrations en NaCl dans les solutions tampons.

#### 3.3 La dépendance en température

La température optimale pour l'activité a été déterminée en utilisant une analyse de Kunitz modifiée. Les résultats ont révélé une activité optimale à  $\approx 45^{\circ}\text{C}$  pour VsEndA et  $50^{\circ}\text{C}$  pour VcEndA <sup>[22]</sup>, comme indiqué dans la figure 3.

#### 3.4 Etude cinétique

Les constantes cinétiques pour VsEndA et VcEndA ont été mesurées en incubant les enzymes en présence du substrat avec des concentrations différentes et à températures différentes. Les constantes cinétiques pour les deux enzymes à 5, 15, 25, 30 et  $37^{\circ}\text{C}$  sont montrées dans le tableau 1. VsEndA possède un  $k_{\text{cat}}$  plus élevé que VcEndA à toutes les

températures, et les valeurs de  $K_m$  de VcEndA sont légèrement plus basses que pour VsEndA, à toutes les températures.

L'efficacité physiologique est la plus haute pour VsEndA, mais la différence diminue avec l'augmentation concomitante de la température. L'analyse cinétique exécutée dans les conditions optimales pour chaque enzyme (le Tableau 1) montre que VsEndA est un meilleur catalyseur que VcEndA à toutes les températures et les différences de l'efficacité catalytique ( $K_{cat}/K_m$ ) augmentent avec la diminution concomitante de la température. Les valeurs de  $K_m$  pour VcEndA sont inférieures que celles pour VsEndA, indiquant que la première a l'affinité légèrement plus grande pour le substrat. Cependant,  $k_{cat}$  est très différent pour les deux enzymes, particulièrement aux températures basses, étant 9 fois plus haut pour VsEndA que pour VcEndA. Il est clair que VsEndA s'adapte aux basses températures en augmentant le  $k_{cat}$ . Le  $K_m$  plus élevé pour VsEndA comparé à VcEndA à toutes les températures, peut indiquer que VsEndA est plus flexible, et que cette flexibilité diminue la fixation du substrat <sup>[26]</sup>.

Tableau 1 : Les constantes cinétiques de VsEndA et VcEndA à 5, 15, 25, 30 et 37°C <sup>[22]</sup>.

	T (°C)	VsEndA	VcEndA	VsEndA / VcEndA
$K_m$ (nM)	5	246 ± 15	118 ± 13	2.1
	15	202 ± 9.6	131 ± 10	1.5
	25	169 ± 20	156 ± 17	1.1
	30	208 ± 14	161 ± 12	1.3
	37	181 ± 10	174 ± 10	1.0
	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	5	9.41	1.03
15		14.7	3.10	4.7
25		18.5	7.18	2.6
30		32.8	15.6	2.1
37		48.4	32.1	1.5
$K_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> .nM <sup>-1</sup> )		5	0.0383	0.00873
	15	0.0728	0.0237	3.1
	25	0.109	0.0461	2.4
	30	0.158	0.0972	1.6
	37	0.268	0.185	1.4

### 3.5 Energie d'activation

Comme déterminé par les courbes d'Arrhenius, l'énergie d'activation ( $E_a$ ) est  $35.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour VsEndA et  $76.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour VcEndA <sup>[22]</sup>. Les calculs de l'enthalpie ( $\Delta H^\#$ ) et de l'entropie ( $\Delta S^\#$ ) d'activation révèlent des valeurs nettement plus faibles pour VsEndA comme indiqué dans le Tableau 2. Nottant aussi que les valeurs de  $T\Delta S^\#$  pour VsEndA sont négatives, tandis que celles pour VcEndA sont positives (Tableau 2).

Tableau 2 : Les paramètres d'énergie d'activation ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ). Pour l'enzyme psychrophile VsEndA (p), et mésophile VcEndA (m). La différence en valeurs (p-m) est aussi montrée<sup>[22]</sup>.

T (°C)	Enzyme	$\Delta G^\#$	$\Delta H^\#$	$T\Delta S^\#$	$\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$	$\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$	$T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$
5	p	62.8	33.4	-29.4	-5.1	-40.6	-35.4
	m	67.9	74.0	6.1			
15	p	64.0	33.3	-30.7	-3.7	-40.6	-36.8
	m	67.8	73.9	6.1			
25	p	65.8	33.2	-32.6	-2.3	-40.6	-38.2
	m	68.1	73.8	5.7			
30	p	65.5	33.2	-32.3	-1.9	-40.6	-38.7
	m	67.4	73.7	6.4			
37	p	66.1	33.1	-32.9	-1.1	-40.6	-39.5
	m	67.1	73.7	6.6			

### 3.6 Stabilité thermique

La stabilité en température a été analysée en évaluant le dépliement thermique utilisant la calorimétrie à balayage différentiel (differential scanning calorimetry : DSC). Les résultats ont révélé un  $T_m$  de  $44.8^\circ\text{C}$  pour VsEndA et  $52.8^\circ\text{C}$  pour VcEndA comme indiqué dans la figure 4 <sup>[22]</sup>. L'enthalpie calorimétrique (la zone en dessous de la transition) est aussi beaucoup plus basse pour VsEndA ( $328 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) que pour VcEndA ( $480 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ).

Les mesures de DSC montrent que VsEndA est moins thermostable que VcEndA avec une température de dépliement qui est 8°C plus basse. Ceci est en parfait accord avec les résultats de l'analyse de stabilité d'autres enzymes adaptées au froid, qui montrent la stabilité en température réduite comparée avec leur homologues mésophiles [27,28]. Les résultats soutiennent la théorie de flexibilité structurelle accrue menant à la thermostabilité basse dans les enzymes adaptées au froid. Les concentrations en NaCl dans lesquelles les balayages thermiques ont été effectués imitent les conditions physiologiques que chacune des enzymes fait face dans leurs environnements naturels.

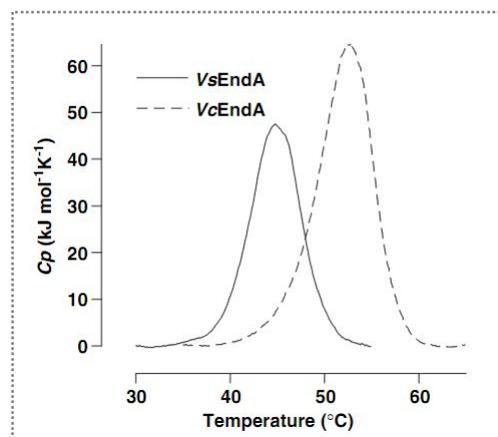


Figure 4 : Endothermes DSC pour VsEndA et VcEndA<sup>[22]</sup>

#### 4. Conclusion

L'Endonuclease I de la bactérie psychrophile *V. salmonicida* est une enzyme qui montre les caractéristiques de l'adaptation au froid, comme la basse stabilité thermique, la basse température optimale, et l'efficacité catalytique accrue, comparée à l'enzyme correspondante de la bactérie mésophile liée *V. cholerae*.

L'efficacité catalytique accrue d'enzymes psychrophiles est généralement admise d'être causée par une augmentation de la flexibilité de la protéine. Le nombre plus grand des résidus lysine dans VsEndA ne semble pas causer une augmentation du nombre de liaisons hydrogènes ou une augmentation du nombre des ponts salins qui pourraient potentiellement aboutir à une structure moins flexible de la protéine. Le caractère fortement cationique de VsEndA (pI = 9.6), avec une augmentation de dix résidus positivement chargés, indique aussi

la présence d'une répulsion électrostatique déstabilisante entre les charges positives qui fait que l'enzyme est moins stable et plus flexible.

Le nombre élevé des résidus lysine dans VsEndA semble servir deux buts adaptatifs. D'une part, VsEndA a dû s'adapter à la basse température. Un potentiel de surface positif accru favoriserait la fixation du substrat négativement chargé, mais une fixation trop serrée peut empêcher la libération du produit. Une plus grande flexibilité de l'enzyme est recherchée pour effectuer la catalyse efficace aux températures basses et ceci semble être accompli, entre autres, par le placement de plusieurs résidus positivement chargés relativement proches les uns des autres, dans l'espace tridimensionnel tel que ces régions deviennent déstabilisées.

D'autre part, l'enzyme doit s'adapter à la salinité de l'habitat. NaCl peut créer un écran sur le potentiel de surface électrostatique aussi bien de l'enzyme que du substrat. Il est donc raisonnable de croire que l'augmentation du contenu en lysines dans VsEndA n'est pas seulement un résultat d'adaptation à la basse température de son habitat naturel, mais il est aussi un résultat de la nécessité pour s'adapter à la salinité de l'habitat.

Une augmentation notable de l'activité face au substrat Dnase-Alerte a été observée pour les deux enzymes quand NaCl a été ajouté à la solution tampon d'essai. Les concentrations de NaCl optimales coïncident avec les salinités rencontrées par les bactéries dans leurs habitats naturels. L'eau de mer à 3.5% de salinité est constituée d'environ 470 mM d'ions  $\text{Na}^+$  et 540 mM d'ions  $\text{Cl}^-$ <sup>[20]</sup>. La concentration optimale en NaCl trouvée pour VsEndA correspond assez bien à ça. *V. cholerae* réside dans l'eau plus saumâtre avec une salinité inférieure, et la concentration en NaCl optimale plus basse de VcEndA reflète ceci. Cela met en évidence, une fois de plus qu'il est crucial d'exécuter l'analyse comparative dans des conditions physiologiques pour chaque enzyme, comme le sel interfère à la fois avec l'activité et la stabilité des enzymes.

## 5. Références bibliographiques

1. Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91–98.
2. Miller, G. P., Benkovic, S. J. (1998). Stretching exercises – flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. *Chem. Biol.* 5: 105–R113.
3. Hough, D. W., Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 39–46.
4. Li, W. F., Zhou, X. X., Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnol. Adv.* 23: 271–281.
5. Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D’Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georgette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., et al. (2001). Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles* 5: 313–321.
6. Hochachka, P. W., Somero, G. N. (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
7. Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86: 155–164.
8. Elcock, A. H., McCammon, J. A. (1998). Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J. Mol. Biol.* 280: 731–748.
9. Premkumar, L., Greenblatt, H. M., Bageshwar, U. K., Savchenko, T., Gokhman, I., Sussman, J. L., Zamir, A. (2005). Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7493–7498.
10. Borroto, R. J. (1997). Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup 01 in aquatic environments. *Rev. Panam. Salud. Publica* 1: 3–8.
11. Colwell, R. R. (2004). Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. *Int. Microbiol.* 7: 285–289.
12. Colquhoun, D. J., Alvheim, K., Dommarsnes, K., Syvertsen, C., Sorum, H. (2002). Relevance of incubation temperature for *Vibrio salmonicida* vaccine production. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1087–1096.
13. Focareta, T., Manning, P. A. (1991). Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. *Mol. Microbiol.* 5: 2547–2555.
14. Wu, S. I., Lo, S. K., Shao, C. P., Tsai, H. W., Hor, L. I. (2001). Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 82–88.
15. Moulard, M., Condemine, G., Robert-Baudouy, J. (1993). Search for the function of the nuclease NucM of *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 112: 99–103.

16. Buchanan, J. T., Simpson, A. J., Aziz, R. K., Liu, G. Y., Kristian, S. A., Kotb, M., Feramisco, J., Nizet, V. (2006). Dnase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 16: 396–400.
17. Palic, D., Ostojic, J., Andreasen, C. B., Roth, J. A. (2006). Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 805–816.
18. Altermark, B., Helland, R., Moe, E., Willassen, N. P., Smalas, A. O. (2008). Structural adaptation of endonuclease I from the cold-adapted and halophilic bacterium *Vibrio salmonicida*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64: 368-76.
19. Altermark, B., Smalas, A. O., Willassen, N. P., Helland, R. (2006). The structure of *Vibrio cholerae* extracellular endonuclease I reveals the presence of a buried chloride ion. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* 62: 1387–1391.
20. Li, C. L., Hor, L. I., Chang, Z. F., Tsai, L. C., Yang, W. Z., Yuan, H. S. (2003). DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J.* 22: 4014–4025.
21. Wang, Y. T., Yang, W. J., Li, C. L., Doudeva, L. G., Yuan, H. S. (2007). Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases. *Nucleic Acids Res* 35, 584–594.
22. Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N. P., Smalas, A. O., Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold-adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 274: 252–263.
23. Robert, X., Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research.* 42: 320–324.
24. Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86: 155–164.
25. Oren, A., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., Csonka, L. N. (2005). How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles* 9: 275–279.
26. Fields, P. A. (2001). Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. A* 129: 417–431.
27. Bae, E., Phillips, G. N. Jr. (2004). Structures and analysis of highly homologous psychrophilic, mesophilic, and thermophilic adenylate kinases. *J. Biol. Chem.* 279: 28202–28208.
28. Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V. N., Gerday, C., Feller, G. (2003). Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J. Biol. Chem.* 278: 37015–37023.

# **Chapitre III**

## **Méthodes de Calcul**

## 1. Introduction

La dynamique conformationnelle des protéines est codée dans leurs structures et est souvent un élément critique de leur fonction. Une appréciation fondamentale sur la manière dont les protéines travaillent exige donc une compréhension du lien entre la structure tridimensionnelle, obtenue avec une rapidité croissante par la cristallographie radiographique RX et la RMN, et la dynamique, qui est beaucoup plus difficile à explorer expérimentalement. Les simulations de dynamique moléculaires fournissent les liens entre la structure et la dynamique en permettant l'exploration du paysage d'énergie conformationnelle accessible aux molécules de protéine <sup>[1-3]</sup>.

La Dynamique Moléculaire permet de simuler, à partir des lois de la mécanique classique, les trajectoires des atomes en phase cristalline, en solution ou en phase gaz <sup>[4-8]</sup>. Elle donne l'évolution d'un système au cours du temps. Une résolution numérique des équations classiques du mouvement est utilisée pour calculer l'énergie du système le long de son parcours sur la surface de potentiel du système. Cette surface peut être approchée de manière empirique (Modèle du champ de force), semi empirique (traitement des électrons de valence) ou encore ab initio (tout électron). Il est bien entendu que devant la taille du système, la première approche demeure la moins coûteuse du point de vue temps de calcul CPU. Ainsi, une molécule est considérée comme un ensemble d'atomes dont les interactions mutuelles peuvent être décrites par une fonction d'énergie potentielle, c'est le "Champ de Force". Les atomes (représentés par des sphères), dans le cas des liaisons covalentes, sont reliés par des ressorts. Les ions ne sont attachés par aucune liaison aux autres atomes. La distribution des électrons, considérée comme implicite, est localisée sur les liaisons du système et est représentée par la distribution de charges sur les atomes de chaque molécule. Ces charges peuvent être calculées de façon à reproduire le moment dipolaire de la molécule ou la surface de potentiel électrostatique obtenue par des calculs ab initio.

La première simulation de dynamique moléculaire d'une protéine a été rapportée en 1977 et comprenait une trajectoire de 9.2 ps pour une petite protéine dans le vide <sup>[9]</sup>. Ce temps correspond à l'âge de la simulation, il traduit la longueur temporelle de la trajectoire sur des pas de temps (pas d'intégration de l'ordre de 1.0E-15 s (1.0 femto seconde). Onze années plus tard, une simulation de 210 ps de la même protéine dans l'eau a été rapportée <sup>[10]</sup>, et l'augmentation phénoménale de la puissance de calcul depuis lors, permet désormais de réaliser des simulations de protéines beaucoup plus grandes, et qui sont 1 000 à 10 000 fois plus longues que la simulation originelle (~10-100 ns), dans laquelle la protéine est entourée par l'eau et le sel. Des améliorations significatives des fonctions de potentiel ont aussi été réalisées, rendant les simulations beaucoup plus stables et précises <sup>[11]</sup>.

Les simulations numériques des biomolécules peuvent agir comme un pont entre les échelles microscopiques des macromolécules et le monde macroscopique. Les simulations peuvent être utilisées pour comprendre les mouvements des protéines au niveau atomique (atome, groupe d'atomes, résidu...) et ainsi lier leurs caractéristiques à bas niveau avec des propriétés globales, comme la stabilité thermodynamique, dans les limites données par les approximations présentées dans les simulations numériques<sup>[12]</sup>.

La description théorique la plus précise pour les systèmes chimiques, c'est-à-dire la mécanique quantique, n'est toujours pas applicable aux biomolécules, du fait de leur taille. Cette méthode n'est toujours pas accessible pour les ressources actuelles de calcul intensif, si la biomolécule dans l'étude inclut plus que d'une centaine d'atomes dans des limites de temps de calcul raisonnable. A titre d'exemple, un complexe d'éther couronne peut atteindre 1 mois (temps CPU) de calcul intensif sur 4 nœuds avec 12 processeurs par nœud.

L'application de la mécanique classique, considérant tous les électrons dans leur état fondamentale, rapporte une description appropriée du système et permet l'investigation de grandes macromolécules sur des échelles adéquates. Cependant, il faut garder à l'esprit qu'une description classique des mouvements de la protéine présente aussi un niveau plus poussé d'approximation, puisque quelques processus comme la rupture et la formation des liaisons, ou la dépendance précise de la polarisation atomique vis à vis de la conformation, ne peuvent pas être représentés dans les implémentations classiques.

Des études pionnières de D. M. sur les enzymes adaptées au froid ont été effectuées sur des échelles de temps courtes (plus basses que 1000-1500 ps), et souvent la comparaison des simulations de D. M. sont réalisées une seule fois (single run) pour des enzymes froids avec leur homologues mésophiles, en raison des efforts de calcul exigés<sup>[13]</sup>. Ces premières études de D. M., étaient fondamentales du point de vue méthodologique, puisqu'elles ont montré que, tandis que la stabilité d'éléments de structure secondaires et l'accessibilité du solvant étaient reproductibles, les mouvements de boucle étaient plus randomisés. Ces observations sont susceptibles d'être liées à la durée plutôt courte accessible aux simulations de D. M., et l'exécution de simulations une seule fois par système, qui affecte fortement l'échantillonnage conformationnel<sup>[14-16]</sup>.

En moins de dix ans, l'optimisation de la puissance informatique a permis aux ressources de calcul nécessaires d'effectuer des simulations de D. M. sur de grandes échelles. En conséquence, l'étude des propriétés structurales et dynamiques d'enzymes adaptées au froid a pris d'importants avantages, soulignant plusieurs détails cruciaux et ponctuels sur les différences de dynamique des protéines et la flexibilité des enzymes adaptées au froid et mésophiles<sup>[17-21]</sup>.

## 2. Energie et forces

L'ensemble des formes de potentiels utilisées pour décrire les interactions entre atomes, ainsi que les valeurs des paramètres définissant ces potentiels, forment ce que l'on appelle le *champ de force* de la modélisation. Plusieurs familles de champs de force existent à l'heure actuelle, pour les biomolécules :

- les champs de force Parmxx associés au logiciel AMBER<sup>[22, 23]</sup> ;
- les champs de force Charmxx associés au logiciel CHARMM<sup>[24, 25]</sup> ;
- le champ de force associé au logiciel GROMOS<sup>[26, 27]</sup> .

Les forces s'appliquant sur le système dérivent du potentiel, c'est-à-dire que les coordonnées  $F_x, F_y, F_z$  des forces  $F$  sont calculées à l'aide du gradient du potentiel  $V$  :

$$\begin{aligned} F_x &= -\frac{\partial}{\partial x} V \\ F_y &= -\frac{\partial}{\partial y} V \\ F_z &= -\frac{\partial}{\partial z} V \end{aligned} \quad (1)$$

Le potentiel d'énergie entre les atomes du système se divise en des termes d'**énergie dite « liée »**, entre les atomes qui sont reliés par une, deux, trois ou quatre liaisons covalentes, et des termes d'**énergie dite « non liée »**, entre les autres atomes. Il est important de noter que cette force est liée à l'accélération subie par chaque corps du système selon la 2<sup>ème</sup> loi fondamentale (Principe Fondamental de la Dynamique) de Newton.

$$\sum F_{ext} = m\gamma = m \frac{dv}{dt} = m \frac{d^2r}{dt^2} \quad (2)$$

## 3. Potentiels d'énergie entre atomes liés et voisins

Le potentiel d'énergie entre atomes liés (figure 1) correspond aux potentiels des liaisons covalentes, des angles de valence et des angles dièdres. Le potentiel des liaisons covalentes est de forme harmonique :

$$V = K^{\text{cov}}(r - r_0)^2 \quad (3)$$

Avec  $r$  la longueur de la liaison,  
 $r_0$  sa longueur à l'équilibre,  
 $K^{\text{cov}}$  la constante de force.

Le potentiel correspondant aux angles de liaisons (figure 1b) est aussi harmonique :

$$V = K_i^{\text{ang}}(\theta - \theta_0)^2 \quad (4)$$

Avec  $\theta$  la valeur de l'angle de valence,  
 $\theta_0$  sa valeur à l'équilibre,  
 $K_i^{\text{ang}}$  la constante de force.

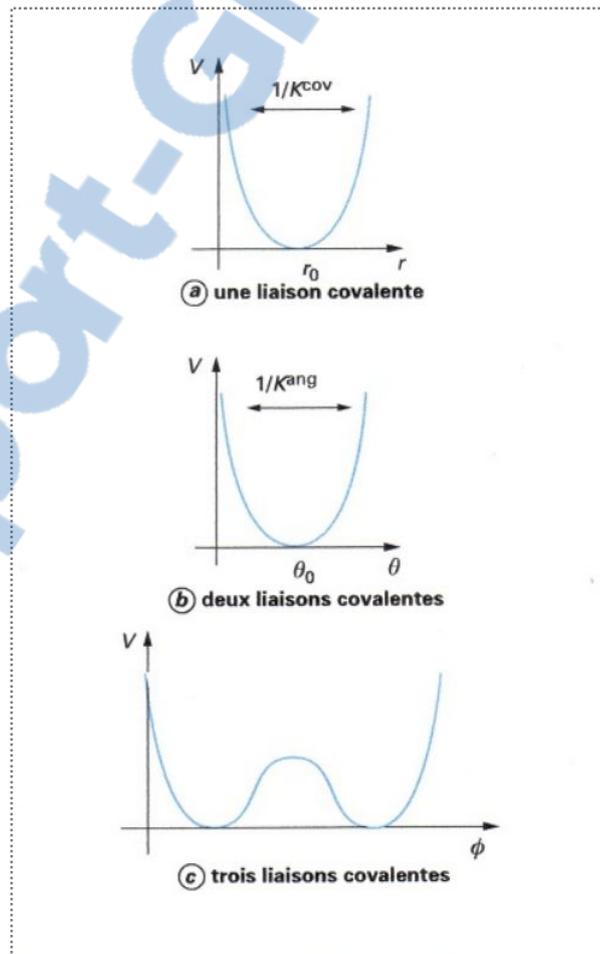


Figure 1 : Formes de potentiel d'énergie entre atomes liés.

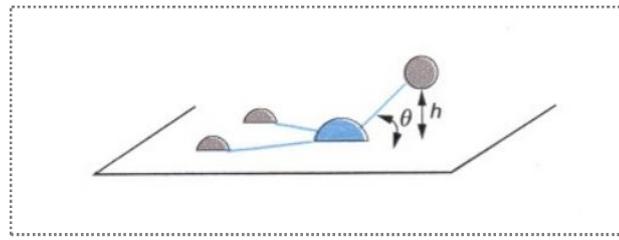


Figure 2 : Application d'un potentiel d'angle de torsion impropre, à l'aide de déviation du quatrième atome par rapport au plan formé par les trois autres.

Le potentiel correspondant à un angle dièdre (figure 1c) est de la forme :

$$V = \sum_{n=0}^N \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (5)$$

Avec  $V_n$  terme donnant une indication qualitative sur les barrières de rotations,

$n$  la multiplicité : sa valeur donne le nombre de minima dans la fonction quand l'angle dièdre tourne de  $360^\circ$ .

La valeur de la phase  $\gamma$  détermine le minimum global du potentiel.

L'énergétique des liaisons covalentes et des angles de valence est modélisée à l'aide d'un potentiel harmonique relativement «dur» (figures 1a et 1b), afin que les valeurs de liaisons et d'angles ne s'écartent pas trop des valeurs  $r_0$  et  $\theta_0$  produites par le recouvrement des orbitales moléculaires. Le potentiel utilisé pour les angles dièdres est plus permissif que celui utilisé pour les liaisons et angles de valence. Il permet une mobilité des angles dièdres, tout en pénalisant les conformations éclipsées (figure 1c).

Des potentiels impropres sont utilisés pour imposer à plusieurs atomes de se trouver dans le même plan, comme par exemple dans le cas des cycles aromatiques ou de la liaison peptidique. Un potentiel impropre s'applique sur un angle  $\omega$  entre les atomes, qui est maintenu à  $0$  ou  $180^\circ$  à l'aide du potentiel :

$$V(\omega) = k(1 - \cos 2\omega) \quad (6)$$

Une autre méthode consiste à définir le plan formé par trois des quatre atomes, et à appliquer un potentiel harmonique pour maintenir à zéro la déviation du quatrième atome par rapport au plan. Cette déviation se mesure à l'aide de la hauteur ou de l'angle du quatrième atome par rapport au plan (figure 2).

#### 4. Potentiels d'énergie entre atomes non liés

Deux grands types d'interaction énergétique sont modélisés entre les atomes non liés: le potentiel électrostatique et le potentiel de Van der Waals. Le **potentiel électrostatique** est modélisé à l'aide de l'interaction de Coulomb entre deux charges partielles atomiques  $q_i$  et  $q_j$  séparées par une distance  $r_{ij}$ :

$$V = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (7)$$

La valeur de la constante diélectrique (permittivité relative)  $\epsilon$  utilisée dépend des conditions de paramétrisation des charges atomiques partielles. En particulier, pour diminuer les temps de calcul, on peut vouloir effectuer des simulations en l'absence de solvant, qui sont dites simulations « en phase gaz ». Dans ce cas, l'électrostatique des charges du système n'est plus écrantée par la présence des molécules de solvant et cela peut conduire à une surestimation de l'énergie électrostatique du système. Pour remédier à cette surestimation, il est alors possible de choisir dans le calcul  $\epsilon = r$ , ce qui réduit d'autant plus l'interaction électrostatique entre deux atomes que ceux-ci sont éloignés l'un de l'autre dans l'espace cartésien ; ce choix permet ainsi de réintroduire l'effet d'écrantage des interactions électrostatiques. Par ailleurs, des modèles et des champs de force ont été développés <sup>[28]</sup> pour inclure les effets de polarisation des charges partielles atomiques, à l'aide d'une polarisabilité  $a_i$  de chaque charge.

Le potentiel électrostatique possède la caractéristique d'être le potentiel à plus longue portée ( $1/r$ ) dans une simulation de dynamique moléculaire (figure 3). Les interactions de Van der Waals sont généralement décrites à l'aide d'un **potentiel de Lennard-Jones** (figure 3) dit **potentiel en 12-6** :

$$V = 4 \epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (8)$$

Avec  $\sigma$  : Le diamètre de collision (rayon de sphère dure) relié aux rayons de Van der Waals des atomes,

$\epsilon$  : La profondeur du puits de potentiel (figure 3).

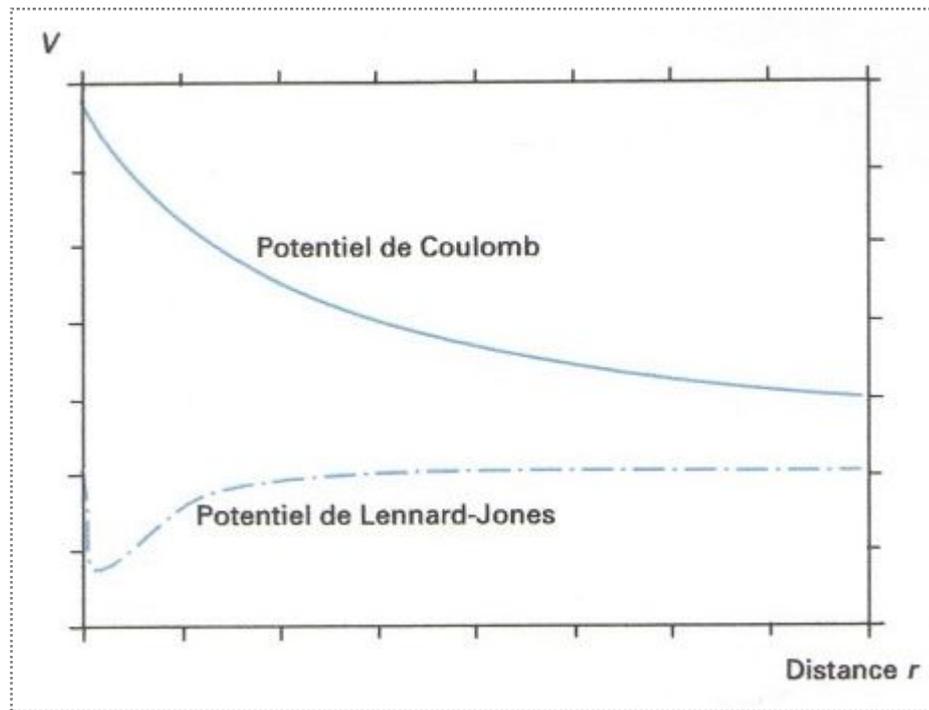


Figure 3 : Forme de potentiel de Coulomb et du potentiel de Lennard-Jones.

Les interactions de Van der Waals peuvent aussi être décrites par le **potentiel de Buckingham**:

$$V = \varepsilon \left[ \frac{6}{\alpha-6} \exp \left[ -\alpha \frac{r}{r_m-1} \right] - \frac{\alpha}{\alpha-6} \left( \frac{r_m}{r} \right)^6 \right] \quad (9)$$

Où le terme en  $r^{-12}$  est remplacé par un terme exponentiel.

Le calcul du potentiel entre atomes non liés est une étape lourde des calculs de simulation de dynamique moléculaire, car il varie en  $N^2$  ou  $N^3$ , où  $N$  est le nombre d'atomes. Pour réduire les temps de calcul, on utilise un rayon de coupure sur les interactions non liées, mais la discontinuité du potentiel induite par ce type d'approche peut provoquer des instabilités dans le calcul <sup>[21]</sup>. Par ailleurs, pour gagner du temps, la liste des paires d'atomes entre lesquels une interaction non liée est calculée, n'est pas remise à jour à chaque pas de l'intégration des équations du mouvement.

## 5. Paramétrisation du champ de force

Les paramètres géométriques des potentiels entre atomes liés ont été fixés à partir des mesures effectuées dans des structures cristallographiques, et les valeurs de constantes de force définissant le potentiel sont déterminées à partir des fréquences de vibration des

molécules.

Les charges partielles atomiques utilisées dans le calcul de l'énergie électrostatique sont paramétrées sur des fragments des biomolécules étudiées (acides aminés, bases ou sucres) à partir du potentiel électrostatique calculé à l'aide des méthodes de chimie quantique. Les charges partielles des atomes sont ensuite ajustées de manière à reproduire ce potentiel électrostatique [29].

Certains paramètres ont été déterminés de manière à reproduire les propriétés thermodynamiques des liquides, comme les paramètres OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulation*) [30]. Il y a une certaine spécialisation des champs de force, qui est autant due à des raisons scientifiques qu'à l'utilisation de différents champs de force et programmes par différentes communautés de scientifiques. Ainsi, les champs de force Parmxx (AMBER) sont plutôt utilisés sur les **acides nucléiques**, tandis que les champs de force Charmmxx sont plutôt employés sur les **protéines**, et le champ de force de GROMOS est utilisé sur les **systèmes membranaires**. Globalement, un champ de force peut avoir la forme analytique suivante :

$$V = \underbrace{\sum \frac{1}{2} K_l (l - l_0)^2}_{\text{Paires liées}} + \underbrace{\sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2}_{\text{Angles de liaison}} + \underbrace{\sum K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)]}_{\text{Angles dièdres}} + \underbrace{\sum 4\varepsilon_{ij} \left[ \left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}}_{\text{Paires non liées}} \quad (10)$$

## 6. Description du solvant

L'eau joue un rôle très important dans la structure et la dynamique des édifices bio macromoléculaires. On a cherché à déterminer des paramètres en donnant une description, à la fois la plus précise possible, et la plus efficace en termes de temps de calcul. Les deux modèles les plus utilisés en biochimie sont SPC (*Single Point Charge*) [31] et TIP3P (*Transferable Intermolecular Potential 3 Points*) [32]; ils ont des caractéristiques très similaires. La molécule d'eau est modélisée à l'aide de trois potentiels harmoniques de liaison covalente, entre l'oxygène et chacun des deux hydrogènes, et entre les deux hydrogènes, ainsi qu'un potentiel d'angle de valence (H-O-H). Il y a trois sites d'interactions pour les interactions électrostatiques: les charges positives partielles sur les hydrogènes sont exactement contre balancées par une charge négative sur l'oxygène. Les interactions de Van der Waals entre

deux molécules d'eau sont calculées en utilisant une fonction de Lennard-Jones avec un seul point d'interaction centré sur l'atome d'oxygène. L'aspect hautement polarisable de la molécule d'eau rend cette dernière très difficile à modéliser. Des travaux récents ont entrepris des études comparatives sur la complexité du modèle de l'eau [33, 34].

D'autres modèles ont été donnés pour d'autres solvants, pouvant intervenir en physico-chimie [35]. Les membranes lipidiques sont modélisées, la plupart du temps, à l'aide de modèles atomiques de chaque lipide les constituant. Il est aussi possible de modéliser un solvant ou une membrane lipidique, de façon implicite, c'est-à-dire en ne modélisant pas les molécules, mais l'effet de leur présence sur le soluté, à travers un potentiel d'interaction soluté-solvant ou soluté-membrane.

Deux méthodes actuellement utilisées pour **la modélisation implicite du solvant aqueux** sont : le modèle de Born généralisé ou la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann, ces méthodes permettent de calculer la contribution électrostatique à l'énergie de solvation.

- Le **modèle de Born généralisé** est basé sur le calcul, effectué par Born en 1920, de la composante électrostatique de l'énergie de solvation d'une charge dans une cavité de solvant sphérique :

$$\Delta G_{\text{elec}} = -\frac{q^2}{2a} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \quad (11)$$

Dans un système multi-atomes, cette expression a été réécrite [36] comme:

$$\Delta G_{\text{elec}} = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{f(r_{ij}, a_i, a_j)} \quad (12)$$

Où  $f(r_{ij}, a_i, a_j)$  dépend de la distance  $r_{ij}$  entre les atomes  $i$  et  $j$ , et de leurs rayons de Born  $a_i$  et  $a_j$ . Plusieurs formes sont possibles pour la fonction  $f$ ; l'une proposée par Still et coll. [36] est :

$$f(r_{ij}, a_{ij}) = \sqrt{r_{ij}^2 + a_i a_j} \exp(-D) \quad (13)$$

Où  $D$  est un paramètre qui dépend des rayons de Born  $a_i$  et  $a_j$  des deux atomes considérés.

L'utilisation de la fonction  $f$  revient à utiliser une fonction mixte, qui est proche de  $r$  et donc du potentiel de Coulomb pour les atomes éloignés, et qui tend vers une valeur finie égale à  $\sqrt{a_i a_j}$  pour les atomes proches. Cette méthode permet donc de s'affranchir des problèmes de divergence du potentiel électrostatique pour les charges proches, en remplaçant des charges ponctuelles par des charges plus diffuses de rayon  $a_i$ . Les **rayons de Born**  $a_i$  sont des paramètres supplémentaires, qui peuvent être soit inclus dans le champ de force <sup>[37]</sup>, soit recalculés pour chaque conformation des molécules considérées <sup>[38]</sup>.

• **L'équation de Poisson** relie la variation du potentiel électrostatique  $\Phi$  dans un milieu de constante diélectrique (permittivité relative)  $\varepsilon(r)$ , à la densité de charge  $\rho$  :

$$\nabla\varepsilon(r)\nabla\Phi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (14)$$

Lorsque des ions mobiles sont présents, l'équation de Poisson est modifiée pour tenir compte de leur redistribution dans la solution en réponse au potentiel électrique, et devient l'**équation de Poisson-Boltzmann** <sup>[39]</sup> :

$$\nabla\varepsilon(r)\nabla\Phi(r) - \kappa \sinh(\Phi(r)) = -4\pi\rho(r) \quad (15)$$

Où  $\kappa$  est donné par :

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{1000 \varepsilon k_B T} \quad (16)$$

Avec  $e$  la charge électronique,

$I$  la force ionique de la solution,

$N_A$  le nombre d'Avogadro

$k_B$  la constante de Boltzmann,

$T$  la température.

L'inverse de  $\kappa$  est appelé longueur de Debye.

Le sinus hyperbolique dans l'équation (15) peut être développé en série de Taylor, et l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée est obtenue en ne considérant que le premier terme de la série. L'équation de Poisson-Boltzmann peut être résolue soit de manière analytique en ne considérant que des formes simples (cylindres, sphères, plan infini) pour les objets (ADN, protéines, membranes) considérés, soit par résolution numérique sur les

formes réelles en utilisant une méthode des différences finies <sup>[40]</sup>. Dans ce cas, les différentes fonctions à calculer sont discrétisées dans l'espace sur les points d'une grille. Plus la grille est fine, plus le calcul est précis, mais plus il est long. Par ailleurs, une grille trop large peut conduire à des résultats incorrects.

Les méthodes de solvant implicite ont été utilisées dans différentes applications, qui vont du raffinement de structures RMN <sup>[41]</sup> aux simulations de dynamique moléculaire en présence d'une perturbation (pression, température ou mécanique) <sup>[42]</sup>, et aux calculs d'énergie libre <sup>[43, 44]</sup>. Un inconvénient des méthodes de modélisation implicite du solvant est justement l'absence des molécules d'eau. En effet, le repliement dans l'espace 3D des biomolécules repose sur l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogènes, et l'équilibre entre les liaisons hydrogènes intermoléculaires et les liaisons hydrogènes entre le soluté et les molécules de solvant est important pour la compréhension et l'étude des systèmes macromoléculaires.

## 7. Calcul d'une trajectoire de dynamique moléculaire

Pour un système de  $N$  atomes,  $6N$  valeurs sont nécessaires pour définir l'état du système (trois valeurs de coordonnées et trois valeurs de vitesses par atome). Chaque combinaison de ces valeurs donne un point dans l'espace à  $6N$  dimensions; cet espace est appelé **espace des phases**, et une configuration de la trajectoire est donc une collection de points dans cet espace.

Les calculs de trajectoires de dynamique moléculaire s'effectuent toujours sous l'**hypothèse ergodique**; c'est-à-dire que la moyenne d'une quantité sur un ensemble de particules équivalentes est égale à la moyenne sur le temps d'une particule. Cet axiome de la mécanique statistique permet le calcul de propriétés moyennes du système à partir d'une simulation de dynamique moléculaire. S'il était possible de visiter tous les points de l'espace des phases, la trajectoire serait appelée ergodique et ne dépendrait pas de la configuration initiale. Dans la pratique, l'espace des phases est immense, et une trajectoire ergodique n'est pas réalisable. L'hypothèse ergodique de Boltzmann (appelée continuité du parcours de Maxwell) est tout simplement le point de l'espace des phases pour un quelconque système isolé, qui passe successivement à travers chaque point compatible à l'énergie du système avant de revenir à sa position originale dans l'espace des phases. Une propriété macroscopique  $A_{\text{obs}}$  est une moyenne calculée sur une longue période de temps  $A(\Gamma)$  :

$$A_{obs} = \langle A \rangle_{temps} = \langle A(\Gamma(t)) \rangle_{temps} = \lim_{t_{obs} \rightarrow \infty} \frac{1}{t_{obs}} \int_0^{t_{obs}} A \langle \Gamma(t) \rangle dt \quad (17)$$

$\Gamma$  Étant un point particulier de l'espace des phases. En D. M. l'intégration se fait sur un temps fini  $t_{obs}$ . puisque l'intégration des équations du mouvement se fait sur une série de pas de temps  $\delta t$  alors  $\delta t = t_{obs}/\tau_{obs}$ .

$$A_{obs} = \langle A \rangle_{temps} = \frac{1}{\tau_{obs}} \sum_{\tau_{obs}=1}^{\tau_{obs}} A(\Gamma(t)) \quad (18)$$

Différentes trajectoires, ou sous-intervalles d'une trajectoire, vont donc permettre de calculer des valeurs plus ou moins différentes d'une propriété du système. L'écart-type obtenu à partir de cette série de valeurs peut donner une idée de la précision à laquelle la propriété considérée est déterminée.

## 7.1 Equations

On décrit, très généralement, les équations de la dynamique moléculaire dans l'espace des phases à l'aide des **équations de Hamilton**:

$$\begin{aligned} \dot{q}_i &= -\frac{\partial H}{\partial p_i} \\ \dot{p}_i &= -\frac{\partial H}{\partial q_i} \end{aligned} \quad (19)$$

Avec  $p_i$  et  $q_i$  la quantité de mouvement et la position de l'atome  $i$  du système. En coordonnées cartésiennes, l'hamiltonien  $H$  est la somme d'un terme d'énergie cinétique et d'un terme de potentiel empirique ;

$$H = \sum_i \frac{p_i^2}{2m} + V(q_i) \quad (20)$$

Et les équations de Hamilton se réduisent à l'équation de Newton :

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial U(q)}{\partial q_i} \quad (21)$$

$$m_i \vec{\gamma}_i = \vec{F}_i$$

Avec  $m_i$ ,  $\vec{\gamma}_i$  et  $\vec{F}_i$  la masse, l'accélération et la force s'appliquant sur l'atome  $i$ .

## 7.2 Calcul de la trajectoire

Le calcul de la trajectoire se fait par intégration numérique de l'équation de Newton (équation 21). Cette intégration numérique repose sur des méthodes de différences finies, utilisant un pas de temps  $\delta t$ . Un des algorithmes les plus utilisés est l'algorithme de Verlet<sup>[45]</sup>. Cet algorithme procède de la façon suivante :

- calcul des positions à  $t + \delta t$  à partir des positions et des vitesses à  $t$  :

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \delta t v_i(t) + \frac{\delta t^2}{2m_i} f_i(t) \quad (22)$$

- calcul des forces  $f_i(t + \delta t)$  aux positions  $r(t + \delta t)$  et stockage pour le pas suivant ;
- mise à jour des vitesses :

$$v_i(t + \delta t) = v_i(t) + \frac{\delta t}{2m_i} [f_i(t) + f_i(t + \delta t)] \quad (23)$$

Ces équations sont obtenues à partir d'un développement de Taylor au voisinage de  $r_i(t)$ . Bien que d'autres algorithmes présentent une meilleure précision à court terme, l'algorithme de Verlet a une stabilité à long terme supérieure, ce qui le rend précieux pour la simulation de liquides.

Au temps initial, les vitesses sont attribuées de manière aléatoire aux atomes du système, en respectant une distribution de Boltzmann pour une température donnée. Le choix du pas de temps  $\delta t$  est primordial pour la stabilité de la trajectoire obtenue. On considère que  $1/\delta t$  doit être supérieur à la plus haute fréquence de mouvement présente dans le système. Les fréquences les plus hautes du système étant les fréquences de vibration des liaisons covalentes, un pas de temps de 1 fs ( $10^{-15}$  s) est donc en principe nécessaire.

L'incorporation des contraintes pour les longueurs des liaisons covalentes (et parfois pour les angles de liaisons) épargne environ un facteur de 4 dans le pas de temps permis pour le système moléculaire, et a été une pratique courante pendant de nombreuses années <sup>[46]</sup>. L'algorithme le plus utilisé pour appliquer des contraintes est l'algorithme SHAKE <sup>[47]</sup>. Récemment, l'algorithme Linear Constraint Solver LINCS a été introduit <sup>[48]</sup>, ce dernier est plus rapide et plus stable que SHAKE, et il est mieux approprié pour l'implémentation dans les programmes pour les calculs en parallèle. Il consiste à maintenir constantes les longueurs de liaisons covalentes des hydrogènes en appliquant des forces supplémentaires (contraintes) au système, qui anticipent les déformations de ces liaisons. Le gel des fréquences de vibration des liaisons covalentes des hydrogènes permet d'augmenter le pas de temps de 1 à 2 fs.

Un argument physique pour l'utilisation des contraintes sur les liaisons, est que les liaisons covalentes réelles correspondent à des oscillateurs harmoniques de mécanique quantique, avec des fréquences supérieures à  $K_B T/h$ . Elles sont donc en permanence à l'état fondamental stationnaire, et ne prennent aucune énergie potentielle ou cinétique additionnelle. Leur traitement comme des oscillateurs classiques peut provoquer un échange d'énergie non physique, et nécessite l'application des corrections quantiques à l'énergie.

### 7.3 Traitement des limites du système et les conditions périodiques

Les systèmes étudiés en dynamique moléculaire sont forcément de taille finie, alors que, dans l'expérience, ils sont intégrés au sein de systèmes beaucoup plus vastes, dont la simulation totale par les méthodes numériques est complètement impossible. La question du traitement des limites du système, et de la réduction des effets de surface (bord, frontière), se pose donc avec acuité. Plusieurs méthodes ont été proposées pour ce traitement.

Il est possible d'appliquer une perturbation au potentiel ressenti par les atomes du système proches du bord, afin de contre balancer les effets de bord par un champ de réaction. Une sphère est construite autour du soluté avec un rayon égal au rayon de coupure  $r_c$  du calcul des interactions entre atomes non liés. Les interactions entre les molécules à l'intérieur de la sphère sont calculées explicitement lorsque la distance les séparant est inférieure au rayon de coupure. À ces interactions est ajoutée l'énergie d'interaction de la sphère avec le milieu environnant, qui est modélisé comme un milieu homogène de constante diélectrique (permittivité relative)  $\epsilon_s$ . Le champ électrostatique dû au diélectrique environnant sur la molécule  $i$  du système est :

$$E_i = \frac{2(\epsilon_s - 1)}{(\epsilon_s + 1)} \frac{1}{r_c^3} \sum_{j; r_{ij} \leq r_c} \mu_j \quad (24)$$

Avec  $\mu_j$  les dipôles des molécules voisines de  $i$  se trouvant à une distance inférieure à  $r_c$  de  $i$ . L'énergie d'interaction entre la molécule  $i$  et le champ de réaction vaut :  $E_i \mu_i$ . Il est aussi possible d'utiliser des conditions périodiques (figure 4), où le système est mis sous forme d'une boîte, parallélépipédique ou octaédrique, et est entouré de boîtes virtuelles, qui sont des copies exactes de la première boîte. Les interactions entre atomes sont tronquées à l'aide de la limite de calcul sur les interactions non liées (rayon de coupure), et les atomes plus proches des bords que le rayon de coupure ont une interaction calculée avec les atomes virtuels.

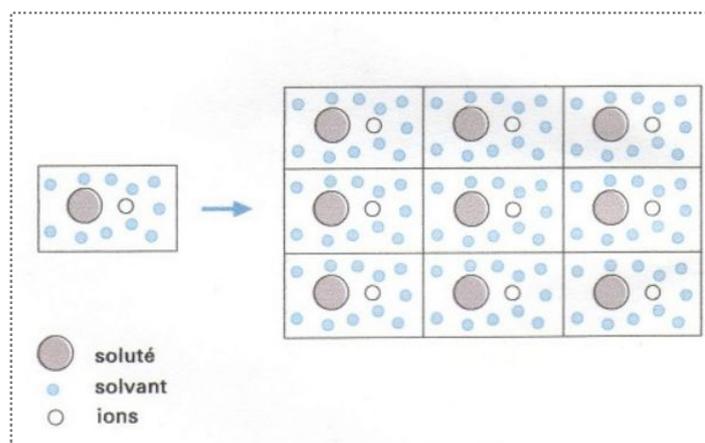


Figure 4 : Conditions périodiques (à deux dimensions) dans les simulations de D. M.

## 7.4 Paramètres thermodynamiques

Les simulations de dynamique moléculaire sont traditionnellement réalisées sous des conditions de nombre de particules  $N$  (*masse*), de volume  $V$  et d'énergie  $E$  constantes, c'est-à-dire dans l'ensemble microcanonique  $NVE$ . Mais les simulations de dynamique moléculaire peuvent être modifiées pour échantillonner d'autres ensembles : l'ensemble canonique ( $N, V, T$ ), l'ensemble isotherme-isobare ( $N, T, P$ ), ou l'ensemble grand canonique ( $V, T, \mu$ ) où  $\mu$  est le potentiel chimique sont autant d'ensemble pouvant contrôler les différentes variables thermodynamiques.

Le système décrit par les équations de Hamilton (équations 19) permet d'étudier l'évolution naturelle de  $N$  particules. Cependant, maintenir une température constante, et donc une trajectoire stable au cours de la simulation, pose certains problèmes. Premièrement,

l'algorithme de Verlet génère des trajectoires à énergie constante, c'est-à-dire micro-canoniques, où la température a peu de raisons de rester constante. Deuxièmement, des états initiaux hors de l'équilibre peuvent conduire à un réchauffement ou un refroidissement rapide, et à une instabilité de la trajectoire. Il est donc nécessaire d'effectuer un contrôle de la température. La température du système est définie à l'aide de l'**énergie cinétique du système**, qui est donnée par l'équation de CLAUSIUS, basée sur la théorie de l'équipartition de l'énergie :

$$E_c = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{3}{2} K_B T (3N - N_c) \quad (25)$$

Avec  $N_c$  le nombre de contraintes sur le système,  
 $3N - N_c$  le nombre total de degrés de liberté.

Dans cette équation, une quantité mécanique (l'énergie cinétique du système) est posée égale à une quantité thermodynamique (l'énergie interne à la température  $T$  du système). Cela permet de définir une température de la simulation, mais qui a des propriétés bien différentes de la température thermodynamique.

#### 7.4.1 Contrôle de la température

Nous avons utilisé la méthode dite de *Faible Couplage à un bain thermique* ("weak coupling method") développée par Berendsen et coll.<sup>[49]</sup>. Cette méthode est basée sur la modification de l'équation des mouvements des atomes afin d'obtenir une relaxation du premier ordre de la température  $T$  vers la température de référence  $T_0$  :

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T} [T_0 - T(t)] \quad (26)$$

Le thermostat de Berendsen applique un facteur multiplicatif aux vitesses, de manière à contrôler l'énergie cinétique. Il couple le système à un bain de température  $T_0$  en multipliant à chaque pas d'intégration les vitesses par une valeur  $\lambda$  telle que :

$$\lambda = \left[ 1 + \frac{\Delta t}{2\tau_T} \left( \frac{T_0}{T} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (27)$$

$$v_i := \lambda v_i \quad (28)$$

Avec  $\Delta t$  la taille du pas d'intégration,  
 $\tau_T$  le temps caractéristique de relaxation,  
 $T$  la température instantanée.

Cette méthode ne produit pas une trajectoire dans l'ensemble canonique, seule l'énergie cinétique moyenne est contrôlée, mais elle a un temps de réponse rapide qui convient pour l'équilibration du système.

## 7.4.2 Contrôle de la pression

### 7.4.2.1 Le viriel

La pression est appliquée au système à travers le calcul du viriel et de la température. Le viriel est défini comme:

$$W = \sum x_i \dot{p}_i \quad (29)$$

Avec  $x_i$  les coordonnées,  
 $\dot{p}_i$  les dérivées des moments (c'est-à-dire les forces).

D'après le théorème du viriel :

$$W = -3NK_B T \quad (30)$$

Pour un gaz parfait, les forces sont celles entre les particules et la paroi, et on peut montrer que dans ce cas le viriel est égal à :  $-3PV$ . Dans un gaz ou un liquide réel, le viriel total est égal à la somme de la contribution de gaz parfait ( $-3PV$ ) et d'une contribution provenant des interactions entre particules :

$$W = -3PV + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N r_{ij} \frac{dv(r_{ij})}{dr_{ij}} \quad (31)$$

Avec  $dv(r_{ij})/dr_{ij}$  la dérivée de l'interaction entre les atomes  $i$  et  $j$ , qui est donc égale à la force  $f_{ij}$  agissant entre les deux atomes.

La pression peut donc s'écrire, à l'aide des équations (29) et (30), comme :

$$P = \frac{1}{V} [NK_B T + \frac{1}{3} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N r_{ij} \frac{dv(r_{ij})}{dr_{ij}}] \quad (32)$$

La pression fluctue en général plus que la température, car le produit  $\frac{r_{ij} dv(r_{ij})}{dr_{ij}}$  change beaucoup plus rapidement en fonction des variations de coordonnées que l'énergie cinétique.

#### 7.4.2.2 Barostat de Berendsen

Le contrôle de la pression s'effectue de manière analogue à celui de la température <sup>[49]</sup>. Dans ce cas, la correction est appliquée au volume global et donc à la position des atomes. On modifie l'équation de mouvement des atomes afin d'obtenir une relaxation du premier ordre de la pression  $P$  par rapport à la pression de référence  $P_0$  :

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_p} [P_0 - P(t)] \quad (33)$$

Où  $\tau_p$  est la *temps de relaxation de la pression*. La pression instantanée peut être obtenue à l'aide de l'équation (31).

La pression est modifiée par un ajustement du volume de la boîte. Cette variation est reliée à la compressibilité isotherme  $\kappa$ . Le couplage s'effectue donc par ajustement de la valeur des coordonnées atomiques et de la taille de la boîte de simulation grâce à un facteur d'homothétie  $\mu$  (pour la taille de boîte) et  $\mu^{1/3}$  (pour les coordonnées) :

$$\mu(t) = [1 - \frac{\Delta t}{\tau_p} (P_0 - P(t))] \quad (34)$$

Avec  $\tau_p = \tau_p / \kappa$ . Le temps de relaxation  $\tau_p$  étant un paramètre adaptable. Il n'est pas nécessaire de connaître la valeur de  $\kappa$  avec précision (dans le cas d'un liquide peu compressible, comme l'eau,  $\kappa = 4.591 \cdot 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$ ).

## 7.5 Calcul des forces électrostatiques : Sommation d'Ewald

Le calcul des forces entre atomes non liés est le calcul de forces qui demande le plus de temps, car il varie en  $N^2$ , où  $N$  est le nombre de particules du système. Pour alléger ce calcul,

on n'effectue le calcul entre paires d'atomes, que si la distance les séparant est inférieure à un rayon de coupure. Comme les interactions de Van der Waals décroissant rapidement avec la distance interatomique ( $1/r^6$ ) et que les interactions électrostatiques ( $1/r$ ), un rayon de coupure permettant un calcul précis pour le terme électrostatique est aussi suffisant pour le terme de Van der Waals.

Le potentiel électrostatique coulombien est à plus longue portée ( $1/r$ ), ce qui rend critique pour la précision de la modélisation, l'utilisation d'un rayon de coupure. De plus, dans le cas des conditions périodiques, l'énergie électrostatique totale est la somme d'une série :

$$E_{eel} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sum_{|n|=0} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|} \quad (35)$$

Qui converge lentement, et est même conditionnellement divergente. En effet, les termes positifs et les termes négatifs de cette somme forment deux séries divergentes. Une méthode de calcul des forces électrostatiques a été proposée <sup>[50]</sup>, elle consiste à diviser la somme à calculer en deux parties de telle sorte que :

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1-f(r)}{r} \quad (36)$$

**La sommation d'Ewald** utilise en général la fonction :

$$f(r) = \operatorname{erfc}(r) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_r^\infty \exp(-t^2) dt \quad (37)$$

Physiquement, cela revient à considérer que chaque charge est entourée par une distribution de charge neutralisante d'intensité égale, mais de signe opposé. Une distribution de charge gaussienne est communément utilisée :

$$\rho_i = \frac{q_i \alpha^3}{\pi^{3/2}} \exp(-\alpha^2 r^2) \quad (38)$$

La somme des interactions électrostatiques se calcule alors sous la forme de la somme de deux termes. Le premier terme est une somme dans l'espace réel 3D :

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sum_{|n|=0} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \operatorname{erfc}\left[\frac{\alpha|r_{ij} + n|}{|r_{ij} + n|}\right] \quad (39)$$

Le second terme est une somme dans l'espace réciproque :

$$\frac{1}{2} \sum_{k \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(kr_{ij}) \quad (40)$$

Qui est calculée à l'aide d'une transformée de Fourier rapide (FFT) dans l'espace 3D.

Lors des simulations, nous avons utilisé la méthode *Particle Mesh Ewald (PME)*<sup>[51,52]</sup>, qui est une méthode proposée par Tom Darden pour améliorer la performance de la somme réciproque (équation 39). Au lieu de directement faire la sommation des vecteurs d'onde, les charges sont attribués à une grille au moyen d'une interpolation cardinale de type « B-spline ». Cette grille est ensuite soumise à une transformation de Fourier avec un algorithme 3D FFT, et le terme d'énergie réciproque est obtenu par une seule sommation sur la grille en k-espace. Le potentiel aux points de la grille est calculé par une transformation inverse, et les forces sur chaque atome sont obtenues par les facteurs d'interpolation. L'algorithme PME est significativement plus rapide que la sommation d'Ewald ordinaire, surtout sur les systèmes médiums à larges.

## 8. Construction du système

Les simulations de D. M. ont été réalisées par le programme GROMACS 4.5.3<sup>[53, 54]</sup> utilisant le champ de force CHARMM 27<sup>[24, 55]</sup>. Les structures natives des deux enzymes Endonucléases I ; VsEndA et VcEndA, de code PDB, 2PU3<sup>[56]</sup> et 2G7F<sup>[56]</sup>, respectivement, sont utilisées comme point de départ dans les calculs de D. M. Les acides aminés manquants dans la structure de VsEndA (les résidus 19–22) sont ajoutés en utilisant une procédure de modélisation par simple homologie. La structure entière a été obtenue avec le programme MODELLER<sup>[57]</sup> basé sur la structure originelle PDB comme modèle. Les atomes d'hydrogène sont ajoutés avec le programme GROMACS. La structure de départ pour chaque enzyme est immergée dans une boîte de simulation dodécaèdre de molécules d'eau TIP3P<sup>[32]</sup>. Tous les atomes de la protéine sont à une distance plus grande ou égale à 1 nm des bords de la boîte. Dans le but de neutraliser la charge globale de chaque système, 16 molécules d'eau ont été remplacées par les ions Cl<sup>-</sup> dans les simulations menées sur l'enzyme VsEndA, et 5 ions Cl<sup>-</sup> qui ont remplacés des molécules d'eau dans le cas de l'enzyme VcEndA. Des ions additionnels Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> ont été ajoutés pour créer les concentrations de sel

désirées; 50, 175, 425 et 650 mM. Chaque système a été sujet à une minimisation d'énergie utilisant l'algorithme Steepest Descent. Par la suite, des simulations de D. M. de réchauffement de 50 ps chacune sont effectuées à volume constant en augmentant la température graduellement de 0 jusqu'à la température désirée (300 K pour les études de l'effet de sel sur les deux enzymes, et 276, 318, 326K pour l'étude de l'effet de température). La simulation est enfin réalisée dans l'ensemble NPT ( $p = 1$  bar), pour 10 ns. Les conditions périodiques sont utilisées sous les conditions isothermiques isobariques utilisant l'algorithme de couplage de Berendsen<sup>[49]</sup> avec des temps de relaxation de 0.1 et 1 ps, respectivement. L'algorithme LINCS<sup>[48]</sup> est utilisé pour restreindre les longueurs des liaisons, permettant d'utiliser un pas de temps de 2 fs pour tous les calculs. Les interactions électrostatiques sont calculées par le schéma de sommation PME (Particle Mesh Ewald)<sup>[51,52]</sup>. Les interactions de Van der Waals et de Coulomb sont tronquées à 1.2 nm. La liste des paires non liées sont actualisées chaque 5 pas de temps, et les conformations sont enregistrées chaque 2 ps.

## 9. Analyse des trajectoires

### 9.1 RMSD

L'écart quadratique moyen (the root mean square deviation) de certains atomes dans une molécule, par rapport à la structure de référence peut être calculé par un ajustement à la structure de référence ( $t_2=0$ ) par une méthode des moindres carrées. En bioinformatique, le RMSD est une mesure de la similarité des structures tridimensionnelles des protéines :

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2} \quad (41)$$

### 9.2 RMSF

La fluctuation de la racine moyenne carrée (the root mean square fluctuation) est une mesure de la flexibilité d'un résidu. Il est typiquement calculé pour les atomes  $C_\alpha$  de chaque résidu et est simplement par la suite la racine carrée de la variance de la fluctuation autour de la position moyenne :

$$RMSF_i = \sqrt{\langle (r_i - \langle r_i \rangle)^2 \rangle} \quad (42)$$

### 9.3 RDF

La fonction de distribution radiale (RDF) ou la fonction de corrélation de paire  $g_{AB}(r)$  entre les particules de type A et B est définie par la manière suivante :

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} \quad (43)$$

$$= \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}$$

Avec  $\langle \rho_B(r) \rangle$  la densité de la particule de type B à une distance  $r$  autour des particules A, et  $\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}$  la moyenne de la densité de la particule de type B sur toutes les sphères autour des particules A avec un rayon maximale  $r_{\text{max}}$  (figure 5). Usuellement la valeur de  $r_{\text{max}}$  est la moitié de la longueur de la boîte. On doit aussi noter que la moyenne calculée pour  $g(r)$  est aussi réalisée sur le temps. En pratique le programme `g_rdf` dans GROMACS divise le système en tranches sphériques (de  $r$  jusqu'à  $r+dr$ ), et construit un histogramme au lieu d'une fonction- $\delta$ .

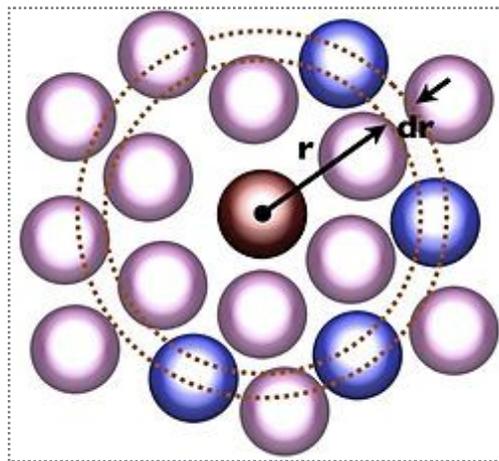


Figure 5 : Représentation schématique de « dr » dans la fonction de distribution radiale.

### 9.4 La durée de vie des liaisons hydrogène

Le programme `g_hbond` de GROMACS analyse les liaisons hydrogène (HB) entre tous les donneurs possibles D et accepteurs A. Pour déterminer si une liaison-H existe, un critère géométrique est utilisé (figure 6) :

$$r \leq r_{HB} = 0.35 \text{ nm} \quad (44)$$

$$\alpha \leq \alpha_{HB} = 30^\circ$$

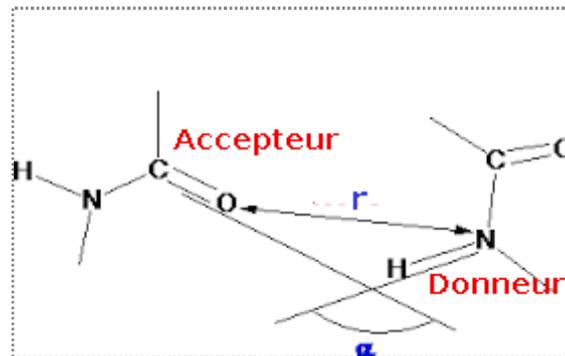


Figure 6 : Liaison hydrogène entre un donneur et un accepteur.

La valeur de  $r_{HB} = 0.35 \text{ nm}$  correspond au premier minimum de la RDF des molécules d'eau SPC. On définit une fonction de corrélation des liaisons H :  $C(t)$ <sup>[58,59]</sup>

$$C(t) = \frac{\langle h(0)h(t) \rangle}{\langle h \rangle} \quad (45)$$

Le critère configurationnel pour savoir si une paire particulière de molécules d'eau est liée par une liaison-H, nous permet de définir un opérateur de population des HB ;  $h(t)$ . Cet opérateur a la valeur 1, quand la paire particulière taguée, disons la molécule 1 et 2, sont liées, sinon zéro. Le nombre moyen des liaison-H dans un fluide de  $N$  molécules d'eau en équilibre est égale au nombre de toutes les paires, multiplié par la valeur moyenne de l'opérateur de population des liaison-H,  $\frac{1}{2} N(N-1) \langle h \rangle$ . Pour une durée de temps très longue,  $C(t)$  approche  $\langle h \rangle \sim 1/\langle N \rangle \sim 0$ . La fonction  $C(t)$  est la probabilité que la liaison-H est intacte au temps  $t$ , sachant qu'elle était intacte au temps zéro. Elle est calculée à partir de la trajectoire de simulation en enregistrant les occurrences conjointes de deux populations non-zéro séparée par un temps  $t$ . A l'équilibre, la probabilité qu'une paire spécifique est liée dans un système large est négligemment petite. Comme résultat,  $C(t)$  se relaxe à zéro. Notons bien que par construction,  $C(t)$  mesure les corrélations dans les séries de temps des liaisons indépendantes des événements de rupture de liaison possible. Cependant, la définition de la liaison-H ininterrompue pour l'analyse des distributions des durées de vie des liaisons-H devrait être considérée comme peu réaliste<sup>[60]</sup>. Luzar et Chandler<sup>[61,62]</sup> considèrent l'action de formation et de rupture de la liaison-H comme un processus cinétique :

$$K(t) = -\frac{dC(t)}{dt} = KC(t) - K'n(t) \quad (46)$$

Avec  $K(t)$  est la fonction de corrélation de la vitesse de réaction,  $n(t)$  est la probabilité que la liaison-H est rompue qui existait à  $t=0$  mais qu'elle reste dans la distance de 0.35 nm (la distance radiale critique de la liaison-H). Dans le cas d'une distance au delà de 0.35 nm, cette liaison-H ne se reformera plus. Selon l'équation (45), la constante de vitesse direct  $K$  qui correspond à la rupture de liaison-H, et la constante de vitesse inverse  $K'$  qui correspond à la formation de la liaison-H peuvent être déterminées à partir de la fonction de corrélation de la vitesse de réaction  $K(t)$ . La durée de vie de la liaison-H dans ce schéma est donnée par l'inverse de la constante de vitesse directe :

$$\tau_{HB} = \frac{1}{K} \quad (47)$$

## 10. Références bibliographiques

1. Karplus, M. & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* 9: 646–652.
2. Wang, W., Donini, O., Reyes, C. M., Kollman, P. A. (2001). Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30: 211–243.
3. Hansson, T., Oostenbrink, C., Van Gunsteren, W. (2002). Molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 190–196.
4. Kollman, P. A. (1985). Theory of Complex Molecular Interactions: Computer Graphics, Distance Geometry, Molecular Mechanics, and Quantum Mechanics. *Acc. Chem. Res.* 18: 105-111.
5. Kollman, P. A. (1987). Molecular Modeling. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 38: 303-316.
6. Kollman, P. A. (1993). Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chem. Rev.* 93: 2395-2417.
7. Van Gunsteren, W. F. (1988). The role of computer simulation techniques in protein engineering. *Prot. Eng.* 2: 5-13.
8. Van Gunsteren, W. F., Berendsen H. J. C. (1990). Computer Simulation of Molecular Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 992-1023.
9. McCammon, J. A., Gelin, B. R., Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature* 267: 585–590.
10. Levitt, M., Sharon, R. (1988). Accurate simulation of protein dynamics in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7557–7561.
11. Mackerell, A. D., Jr. (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *J. Comput. Chem.* 25: 1584–1604.
12. Maragakis, P., Spichty, M., Karplus, M. (2008). A differential fluctuation theorem. *J. Phys. Chem. B.* 112: 6168-6174.
13. Brandsdal, B. O., Heimstad, E. S., Sylte, I., Smalas A.O. (1999). Comparative molecular dynamics of mesophilic and psychrophilic protein homologues studied by 1.2 ns simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7: 385-389.
14. Caves, L. S., Evanseck, J. D., Karplus, M. (1998). Locally accessible conformations of proteins: multiple molecular dynamics simulations of crambin. *Protein Sci.* 7: 649-666.
15. Monticelli, L., Sorin, E. J., Tieleman, D. P., Pande, V. S., Colombo, G. (2008). Molecular simulation of multistate peptide dynamics: a comparison between microsecond timescale sampling and multiple shorter trajectories. *J. Comput. Chem.* 29: 1740-1752.
16. Papaleo, E., Mereghetti, P., Fantucci, P., Grandori, R., De Gioia, L. (2009). Free-energy landscape, principal component analysis, and structural clustering to identify representative conformations from molecular dynamics simulations: The myoglobin case. *J. Mol. Graph. Model.* 27: 889-899.

17. Olufsen, M., Smalas, A. O., Moe, E., Brandsdal, B. O. (2005). Increased flexibility as a strategy for cold adaptation - A comparative molecular dynamics study of cold- and warm-active uracil DNA GLYCOSYLASE. *The journal of biological chemistry* 280: 18042–18048.
18. Papaleo, E.; Riccardi, L.; Villa, C.; Fantucci, P.; De Gioia, L. (2006). Flexibility and enzymatic cold-adaptation: a comparative molecular dynamics investigation of the elastase family. *BBA- Proteins. Proteom.* 1764: 1397-1406.
19. Papaleo, E.; Pasi, M.; Riccardi, L.; Sambì, I.; Fantucci, P.; De Gioia, L. (2008). Protein flexibility in psychrophilic and mesophilic trypsins. Evidence of evolutionary conservation of protein dynamics in trypsin-like serine-proteases. *FEBS Lett.* 582: 1008-1018.
20. Pasi, M.; Riccardi, L.; Fantucci, P.; De Gioia, L.; Papaleo, E. (2009). Dynamic Properties of a Psychrophilic alpha-Amylase in Comparison with a Mesophilic Homologue. *J. Phys. Chem. B.* 113: 13585-13595.
21. Tiberti, M.; Papaleo, E. (2011). Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases. *J. Struct. Biol.* 174: 69-83.
22. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A.; Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 25: 247-260.
23. Wang, J., Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. (2004). Development and testing of a general AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry.* 25: 1157-1174.
24. MacKerell, Jr., A.D.; et al. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B.* 102: 3586-3616.
25. Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoseck, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus. (2009). CHARMM: The Biomolecular simulation Program. *J. Comp. Chem.* 30: 1545-1615.
26. Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P., Van Gunsteren, W. F. (1999). The GROMOS Biomolecular Simulation Package. *J. Phys. Chem. A.* 103: 3596-3607.
27. Schuler, L. D., Van Gunsteren, W. F. (2000). *Mol Sim.* 25: 301.
28. Lopes, P. E. M., Huang, J., Shim, J., Luo, Y., Li, H., Roux, B., MacKerell Jr, A. D. (2013). Polarizable Force Field for Peptides and Proteins Based on the Classical Drude Oscillator. *J. Chem. Theory Comput.* 9: 5430–5449.
29. Ewig, C. S., Berry, R., Dinur, U., Hill, J., Hwang, M., Li, H., Liang, C., Maple, J., Peng, Z., Stockfish, T. P., Thacher, T. S., Yan, L., Ni, X., Hagler, A. T. (2001). *J Comput Chem.* 15: 1782-1800.
30. Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J. (1988). *J. Am. Chem. Soc.* 6: 1657–1666.

31. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren W. F., Hermans, J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular Forces*. Pullman, B. ed. . D. Reidel Publishing Company Dordrecht 331–342.
32. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926–935.
33. Amrani, M., Bendeddouche, D., Bormann, D., Krallafa, A. (2008). Isothermal isobaric molecular dynamics simulation of water. *Journal of molecular structure, Theochem.* 867: 1-3.
34. Krallafa, A., Adda, A., Seddiki, A., Dauchez, M. (2012). Molecular Dynamics Simulation of Water in the Low Temperature Region. *AIP Conf. Proc.* 1456: 215-222.
35. Zhang, J., Tuguldur, B., Spoel, D. V. D. (2015). *J. Chem. Inf. Model.* 6: 1192–1201.
36. Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C., Hendrickson, T. (1990). Semi analytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 6127–6129.
37. Jayaram, B., Sprous, D., Beveridge, D. L. (1998). Solvation Free Energy of Biomacromolecules: Parameters for a Modified Generalized Born Model Consistent with the AMBER Force Field. *J. Phys. Chem. B.* 102: 9571-9576.
38. Hawkins, G. D., Cramer, C. J., Truhlar, D. G. (1996). Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. *J. Phys. Chem.* 100: 19824–19836.
39. Debye, P., Hückel, E. (1923). Zur Theorie der Elektrolyte. *Phys. Zeitschr.* 24: 185-206.
40. Madura, J. D., Davis, M. E., Gilson, M. K., Wade, R., Luty, B. A., McCammon, J. A. (1994). Biological applications of electrostatics calculations and Brownian dynamics simulations. *Rev. Comp. Chem.* 5: 229-267.
41. Zhu, T., He X., Zhang, J. Z. H. (2012). *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14: 7837–7845.
42. Fogolari, F., Esposito, G., Viglino, P., Molinari, H. (2001). Molecular mechanics and dynamics of biomolecules using a solvent continuum model. *J. Comput. Chem.* 22: 1830-1842.
43. Sharp, K. A., Honig, B., Harvey, S. C. (1990). Electrical potential of transfer RNAs: codon-anticodon recognition. *Biochemistry.* 29: 340-346.
44. Misra, V. K., Sharp, K. A., Friedman, R. A., Honig, B. (1994). Salt effects on ligand-DNA binding. Minor groove antibiotics. *J. Mol. Biol.* 238: 245-263.
45. Verlet, L. (1967). Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard–Jones Molecules. *Physical Review* 159: 98–103.
46. P. Deuffhard, J. Hermans, B. Leimkuhler, A. E. Mark, S. Reich, R. D. Skeel. *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas*. Proceeding of the 2nd International Symposium on Algorithms for Macromolecular Modelling, Berlin, May 21–24, 1997.
47. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal of Computational Physics* 23: 327–341.

48. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry* 18: 1463–1472.
49. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81: 3684–3690.
50. Ewald, P. P. (1921). Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* 64: 253–287.
51. Darden, T., York, D., Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98: 10089–10092.
52. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh ewald potential. *J. Chem. Phys.* 103: 8577–8592.
53. Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 4: 435–447.
54. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*. 26: 1701–1718.
55. Mackerell, J. A. D., Feig, M., Brooks, C. L., III, (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 25: 1400–1415.
56. Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N. P., Smalås, A. O., Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS Journal* 274: 252–263.
57. Šali, A., Blundel, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. 234: 779–815.
58. Luzar, A., D. Chandler, D. (1993). *J. Chem. Phys.* 98: 8160.
59. Luzar, A., D. Chandler, D. in *Hydrogen Bond Networks*, edited by M. C.
60. Van Der Spoel, D., Van Maaren, P. J., Larsson, P., Timneanu, N. (2006). *J. Phys. Chem. B*. 110: 4393.
61. Luzar, A. (2000). Resolving the hydrogen bond dynamics conundrum. *J. Chem. Phys.* 113: 10663–10675.
62. Luzar, A., D. Chandler, D. (1996). *Nature (London)* 397: 55–57.

**Chapitre IV :**  
**Dynamique Moléculaire de l'Effet de Sel**  
**sur L'Enzyme Psychrophile**  
*Vibrio Salmonicida Endonucléase I*  
**(VsEndA)**

## 1. Introduction

Il a longtemps été compris que les sels ont un impact significatif sur la stabilité et l'activité des protéines et des acides nucléiques, qui constituent un fondement sur lequel repose la fonction cellulaire. La concentration de sel intracellulaire et extracellulaire varie avec l'organisme et l'environnement, mais fluctue typiquement dans l'intervalle de 100-200 mmol/L pour des organismes vivant dans des conditions physiologiques consistantes avec les mésophiles. Les sels peuvent significativement influencer la stabilité des biomolécules par un écrantage des interactions électrostatiques. Par exemple, la répulsion entre les charges négatives sur le squelette de phosphate d'acides nucléiques subit un écrantage par le sel, contribuant ainsi à la stabilité des systèmes essentiels en biologie tels que l'ADN et l'ARN [1]. L'effet de sels sur les protéines a été démontré utilisant de nombreux systèmes incluant les complexes multimères qui se sont révélés se désintégrer en monomères séparés suite aux changements de la concentration en sel environnementale. Quelques protéines dans les organismes halophiles se sont même adaptées pour fonctionner spécifiquement dans des environnements de salinité élevée, et se déstabilisent dans des concentrations en sel physiologiques compatibles avec les environnements mésophiles [2, 3]. Le développement de modèles physiques précis qui décrivent l'impact thermodynamique de sels sur les macromolécules, pourrait mener à une plus large compréhension de la structure et la fonction biomoléculaire.

Dans un environnement cellulaire, les biomolécules sont solvatées dans un environnement aqueux contenant des ions de sel et de nombreux autres solutés. L'influence des ions sur les interactions au sein des biomolécules est induite par l'écrantage électrostatique, la fixation à un site spécifique, les effets hydrophobes ou les effets Hofmeister privilégiés\* [4].

---

\*Les séries d'Hofmeister est une classification des ions dans l'ordre de leur aptitude à dissoudre (salting in) ou à précipiter (salting out) les protéines. Hofmeister a découvert des séries de sels qui ont des effets consistants sur la solubilité des protéines, et sur la stabilité de leur structures secondaire et tertiaire. L'ordre est comme suit :

Anions: citrate<sup>3-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > acetate<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup>

Cations: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup>

Les premiers éléments de chaque série augmentent la tension superficielle du solvant et diminuent la solubilité des molécules non polaires (salting out). Par contre, les derniers éléments dans chaque série augmentent la solubilité des molécules non polaires (salting in).

Par opposition aux enzymes intracellulaires, les enzymes extracellulaires ou périplasmiques marines vivent dans la salinité totale de l'environnement. De nombreuses études concernant l'adaptation au froid ont été conduites sur des enzymes marines sécrétées; cependant, les caractéristiques de l'adaptation au froid peuvent être dans quelques cas mélangés avec l'adaptation au sel <sup>[5,6]</sup>.

Les interactions du type sel-protéine ont été étudiées tant expérimentalement que théoriquement. Les effets de sel sur la stabilité de la protéine sont connus depuis longtemps. Le rôle du sel NaCl dans la stabilité de la protéine a été examiné utilisant les simulations de DM pour la protéine lymphotactine humaine <sup>[7]</sup>, et pour les peptides courts à charge nette (+/- 6 e) à base d'alanine (AE)<sub>(6)</sub> et (AK)<sub>(6)</sub> <sup>[8]</sup>. Un travail ultérieur a été mené sur la protéine *Staphylococcus aureus* Hfq sous différentes concentrations ioniques de NaCl et des simulations de DM ont été introduites avec et sans l'ARN à fin d'étudier l'impact des concentrations élevées en sel ionique, sur l'agrégation de la protéine et sur l'interaction avec l'ARN <sup>[9]</sup>. Une autre étude sur la ribonucléase A a révélé que la meilleure conformation pour cette enzyme est obtenue pour la concentration naturelle en NaCl qui est autour de 0.1M (100 mM) à 37C° <sup>[10]</sup>. Les résultats de dynamique moléculaire de cette étude confirment aussi qu'une diminution de la concentration en sel en dessous de cette valeur optimale ; 100 mM, entraîne une structure de l'enzyme avec moins de dynamisme et de flexibilité que ceux nécessaires à l'activité optimale. Récemment des simulations d'ordinateur de Monte Carlo ont été effectuées pour étudier l'interaction de la protéine bovine Serum Albumin en présence de NaCl <sup>[11]</sup>.

Une théorie quantitative qui est capable de prévoir l'effet de concentration de petits solutés sur la structure et la dynamique des biomolécules n'est pas encore disponible. Donc, des simulations atomiques semblent être la seule voie pour atteindre des descriptions détaillées pour l'interaction entre les biomolécules et les petits solutés. Les aperçus fourniront des indices essentiels, quant au mécanisme moléculaire que les biomolécules utilisent pour répondre et s'adapter aux variations environnementales. Un exemple intéressant dans ce contexte est l'endonuclease I issue de la bactérie psychrophile et marine *Vibrio salmonicida* (VsEndA). Cette enzyme et son enzyme mésophile orthologue issue de la bactérie des eaux saumâtres *Vibrio cholerae* (VcEndA), ont été précédemment caractérisées biochimiquement <sup>[12]</sup>. La VsEndA montre des propriétés typiques de l'adaptation au froid comme la basse stabilité en température, une efficacité catalytique élevée, et une basse température optimale pour l'activité par rapport à son homologue mésophile. La VsEndA est plus dépendante en sel

(NaCl) que son homologue; la concentration optimale de NaCl pour l'activité est 425 mM <sup>[12]</sup>. L'effet net de NaCl sur l'activité catalytique de VsEndA est étroitement lié à l'affinité entre l'ADN substrat et l'enzyme. Par conséquent, l'activité optimale de l'enzyme doit impliquer un ajustement bien précis de la réduction du potentiel positif de l'enzyme et du potentiel négatif de l'ADN substrat.

## 2. Objectif du chapitre

A notre connaissance, aucun travail précédent ne s'est concentré sur la relation entre la position des ions et les caractéristiques structurales de l'enzyme VsEndA. Dans ce chapitre nous essayerons de réunir plus de réponses sur ces questions : Comment les ions de sel peuvent-ils affecter la structure moléculaire de l'enzyme? Et par conséquent, quel effet auront-ils sur l'activité, et quelles régions spécifiques de l'enzyme sont directement impliquées? A cette fin, nous étudierons le comportement de VsEndA sous différentes concentrations en sel NaCl (0, 50, 175, 425 et 650 mM) (tableau 1), par les simulations de dynamique moléculaire à T=300K.

Tableau1 : nombre d'ions Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> pour chaque simulation.

	VsEndA_0m M	VsEndA_50m M	VsEndA_175m M	VsEndA_425m M	VsEndA_650m M
Cl <sup>-</sup>	16	28	59	120	176
Na <sup>+</sup>	0	12	43	104	160

## 3. Résultats

### 3.1 Stabilité structurale

La figure 1 présente l'évolution temporelle des RMSDs (voir chapitre III) du squelette de l'enzyme VsEndA (N<sub>amide</sub>, C<sub>α</sub>, C<sub>carbonyl</sub>) pour les différentes valeurs de la concentration en NaCl. Il est clair que les trajectoires de dynamiques moléculaires obtenues sont assez stables, puisque les valeurs du RMSDs ne dépassent pas 1.8 Å (Fig. 1).

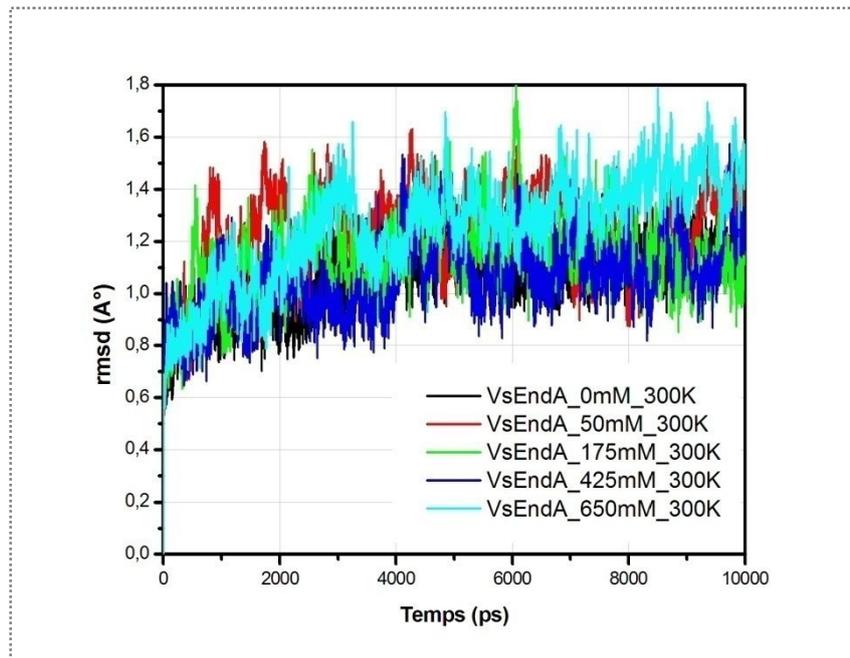


Figure 1 : RMSD de l'enzyme VsEndA sous différentes concentrations en NaCl.

### 3.2 Flexibilité structurale

Comme indiqué plus haut, la flexibilité accrue des protéines était souvent liée à l'adaptation froide <sup>[13-16]</sup>. Dans le but d'évaluer et de comparer la flexibilité de l'enzyme VsEndA à T=300K, sous différentes valeurs de concentrations en sel (NaCl), le RMSF (voir chapitre III) des atomes C $\alpha$  d'un résidu, calculé à partir de la structure moyenne, obtenue par la fusion des images de la simulation, est adopté comme un indice de flexibilité (Fig. 2).

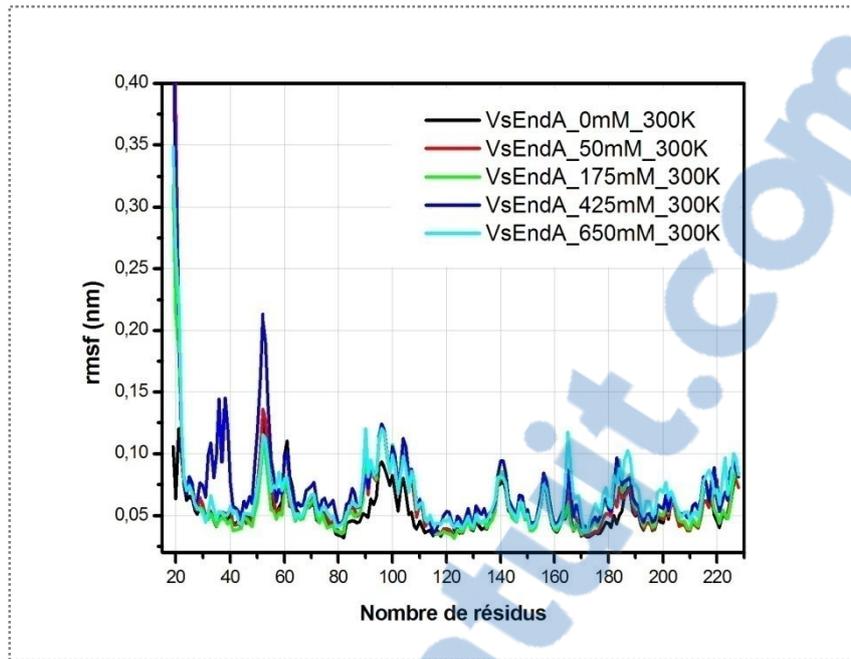


Figure 2 : rmsf de l'enzyme VsEndA sous différentes valeurs de la concentration en NaCl.

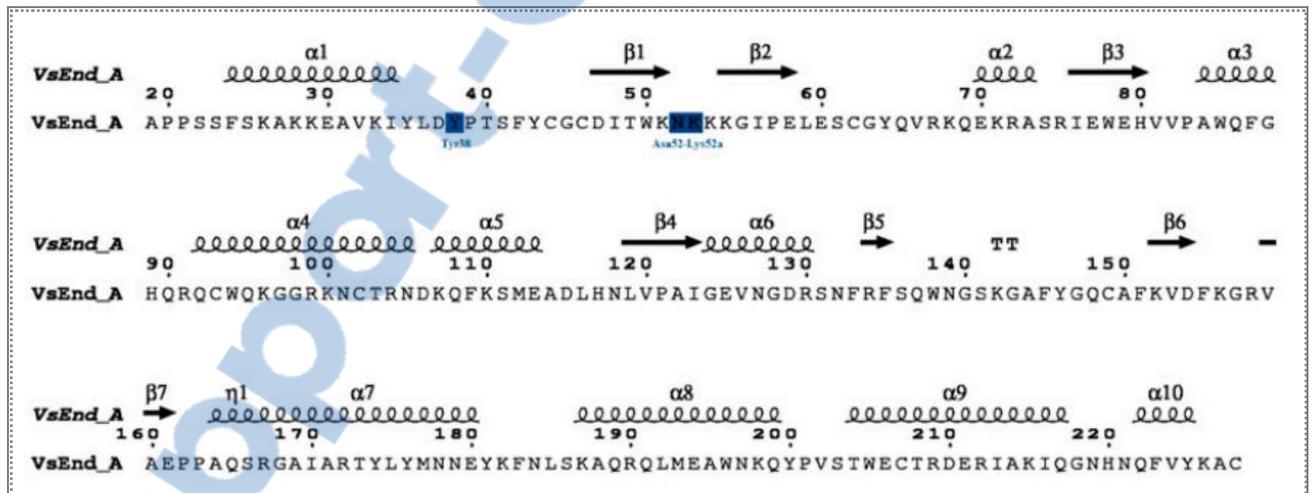


Figure 3 : Structure secondaire de VsEndA (code pdb ; 2PU3<sup>[12]</sup>), utilisant le programme ESPrict 3.0<sup>[17]</sup> les régions les plus flexibles sont marquées en bleu.

Le RMSF de l'enzyme présente la même tendance pour les différentes concentrations en sel ; cependant, il existe deux régions où la différence est frappante, seulement pour la concentration en sel égale à 425 mM, et elles correspondent aux résidus LEU36–ASP37–TYR38–PRO39, et LYS51–ASN52–LYS52a–LYS53, selon la séquence de l'enzyme montrée dans la figure 1.

Le RMSF de la première région est nettement plus élevé pour la concentration en sel de 425 mM, avec une valeur maximale du RMSF enregistrée pour le résidu polaire TYR38 (0.1451 nm). Sinon, on note une tendance similaire pour les autres valeurs de la concentration (0, 50, 175 et 650 mM). Il est important de signaler que dans cette région boucle de la protéine, le résidu polaire TYR38 est présent seulement dans la séquence de l'enzyme adaptée au froid (code pdb 2PU3) ; cependant, il est remplacé par HIS38 dans la séquence des autres homologues (codes pdb ; 2G7F et 1OUP, respectivement) <sup>[12]</sup>.

La deuxième région encore plus intéressante que la première, puisqu'elle affiche la plus grande flexibilité de la structure de l'enzyme ; c'est la région boucle 50-53, où on note la valeur la plus élevée du rmsf enregistré pour le résidu ASN52 (0.2133 nm), avec la concentration en sel égale à 425mM. Cette région est caractérisée par l'insertion d'une lysine ; LYS52a, après le résidu ASN52 dans la séquence de VsEndA (Fig. 3). Cette dernière est proche du site de fixation de l'ADN comme défini par la structure de Vvn (code pdb 1OUP <sup>[18]</sup>), et peut potentiellement affecter l'activité catalytique de l'enzyme. Ce graphe du RMSF (Fig. 1) est en bon accord avec les données expérimentales <sup>[12]</sup> de l'enzyme adaptée au froid, où la concentration optimale pour l'activité est égale à 425 mM. Il est important de noter que la méthode utilisée pour mesurer l'activité de cette enzyme en présence de son substrat, n'a fourni aucune information quant aux régions spécifiques de l'enzyme les plus actives. Une analyse de nos données indique une flexibilité structurale optimale pour la région boucle (résidus 52-52a) ; la région la plus active. À l'opposé à ce qu'on pouvait s'attendre, le RMSF de LYS52a (0.2077 nm) est considérablement plus bas que celui du résidu ASN52. Bien que ce résultat n'est pas consistant avec ce qui est cité dans la littérature <sup>[19]</sup>, où le résidu LYS a un niveau de flexibilité de la chaîne latérale plus élevé que le résidu asparagine ASN, dans les poches de fixation, mesuré par le biais des facteurs de température B (B\_factors). L'analyse du RMSF du résidu ASN nous laisse penser que l'effet des ions à proximité d'un tel résidu polaire, peut affecter potentiellement sa conformation structurale et par conséquent sa mobilité (Fig. 2).

### 3.3 Fonctions de distribution radiales

Comme discuté dans plusieurs travaux antérieurs [20-22], l'importance des ions de sel explicites pour la stabilité structurale de la protéine peut s'étendre d'être non spécifique, comme dans l'écrantage des interactions électrostatiques entre les résidus, à être particulièrement spécifique, où l'interaction ion-site affecte considérablement les caractéristiques structurales locales de la protéine. Afin de nous éclairer davantage sur l'effet de concentration de sel ionique sur la flexibilité structurale de l'enzyme VsEndA, les fonctions de distribution radiales des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  relatives aux régions de la protéine caractérisées par une large valeur du RMSF (Fig. 3) sont calculées pour les différentes concentrations de NaCl. Nous avons calculé la distribution des ions autour des résidus TYR38, ASN52 et LYS52a pour chaque concentration de NaCl, pour les parties squelette et chaîne latérale des résidus correspondants (Fig. 4-6).

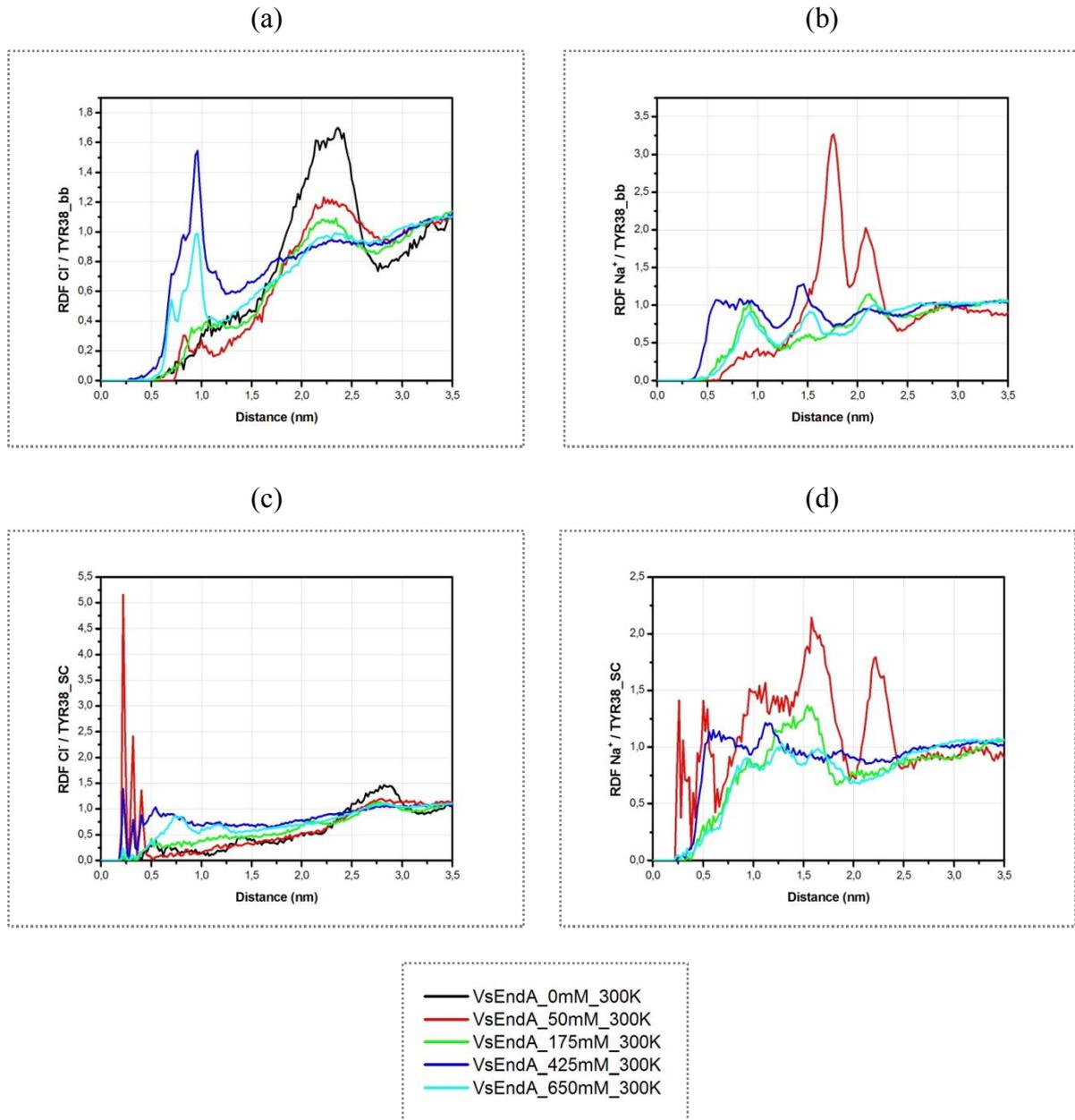


Figure 4 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de TYR38 en fonction de la concentration

On peut clairement distinguer à partir des graphes de la distribution des ions pour le résidu TYR38 l'accumulation des ions chlorure autour du squelette de TYR38 à la concentration en sel de 425 mM (Fig. 4a). Une observation similaire peut être faite pour les ions sodium, qui sont clairement associés avec la partie squelette du même résidu (Fig. 4b). De plus, si nous comparons les positions des premiers pics des fonctions de distribution radiales des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  autour de TYR38\_bb pour la concentration en sel de 425 mM ; 0.958 et 0.579 nm respectivement, nous pouvons clairement percevoir une affinité plus élevée des ions sodium pour le squelette de TYR38. Cependant, concernant la partie chaîne latérale du même résidu,

nous notons une valeur maximale de la fonction de distribution radiale des deux ions ;  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , à la concentration en sel de 50 mM (Fig. 4c, 4d).

Pour le résidu ASN52, un comportement différent de la distribution des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  est observé. Quoique la valeur maximale de la fonction de distribution radiale des  $\text{Cl}^-$  autour du squelette de ASN52 est notée pour la concentration de 0 mM (Fig. 5a), aucune différence n'est perçue dans le premier pic de la distribution des  $\text{Cl}^-$  autour de la chaîne latérale du même résidu, pour les différentes valeurs de la concentration en sel (Fig. 5c).

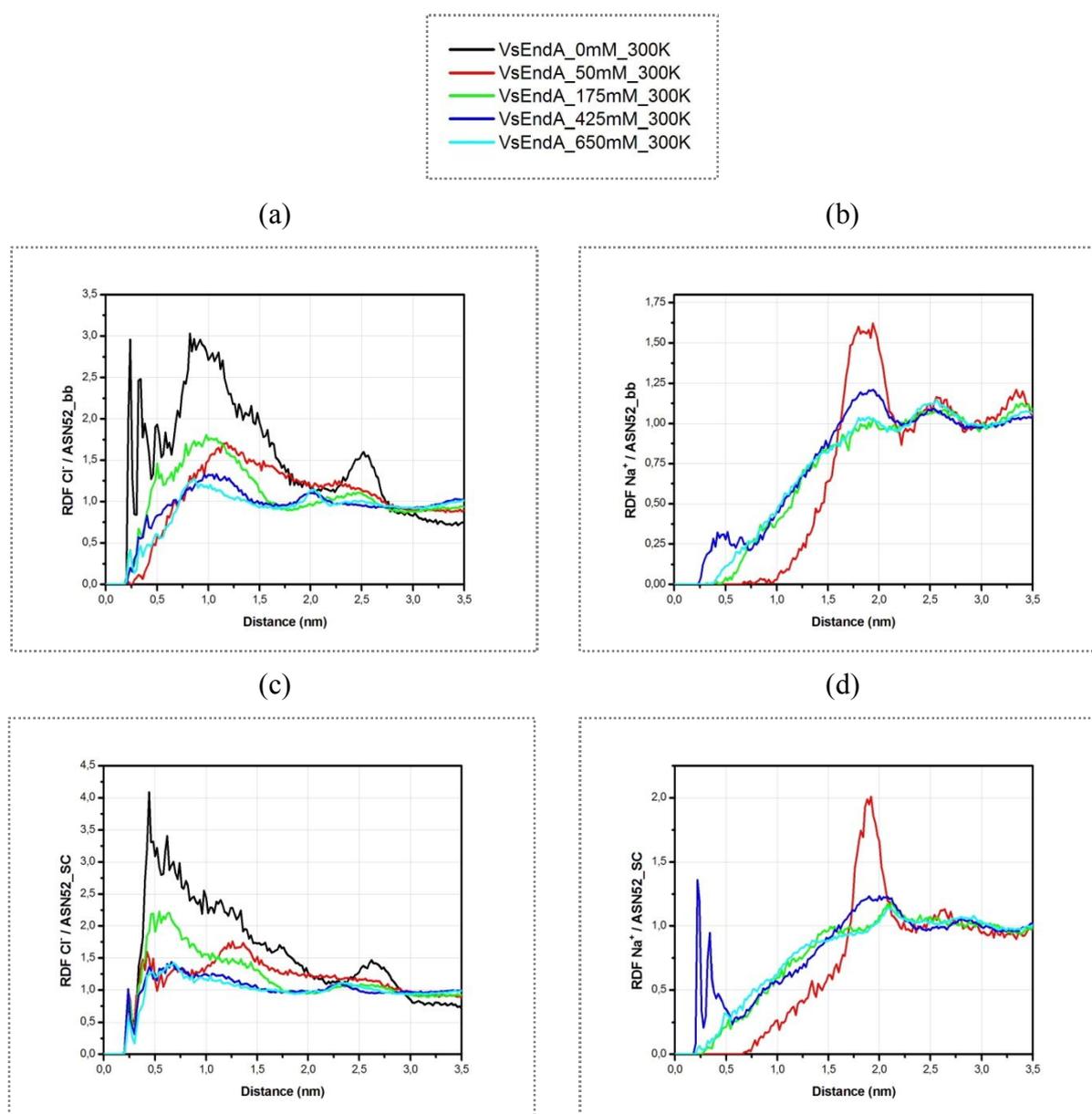


Figure 5 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de ASN52 en fonction de la concentration.

Cependant, l'association des ions sodium est remarquablement plus élevée autour de la chaîne latérale du résidu polaire ASN52 pour la concentration en sel de 425 mM (Fig. 5d). De plus, la fonction de distribution radiale présente deux pics bien définis ; le premier se situe à 0.2139 nm, et le deuxième à 0.3449 nm. On doit ajouter également que l'accumulation des ions sodium est visiblement bien distincte autour du squelette du même résidu pour la concentration en sel de 425 mM (Fig. 5b).

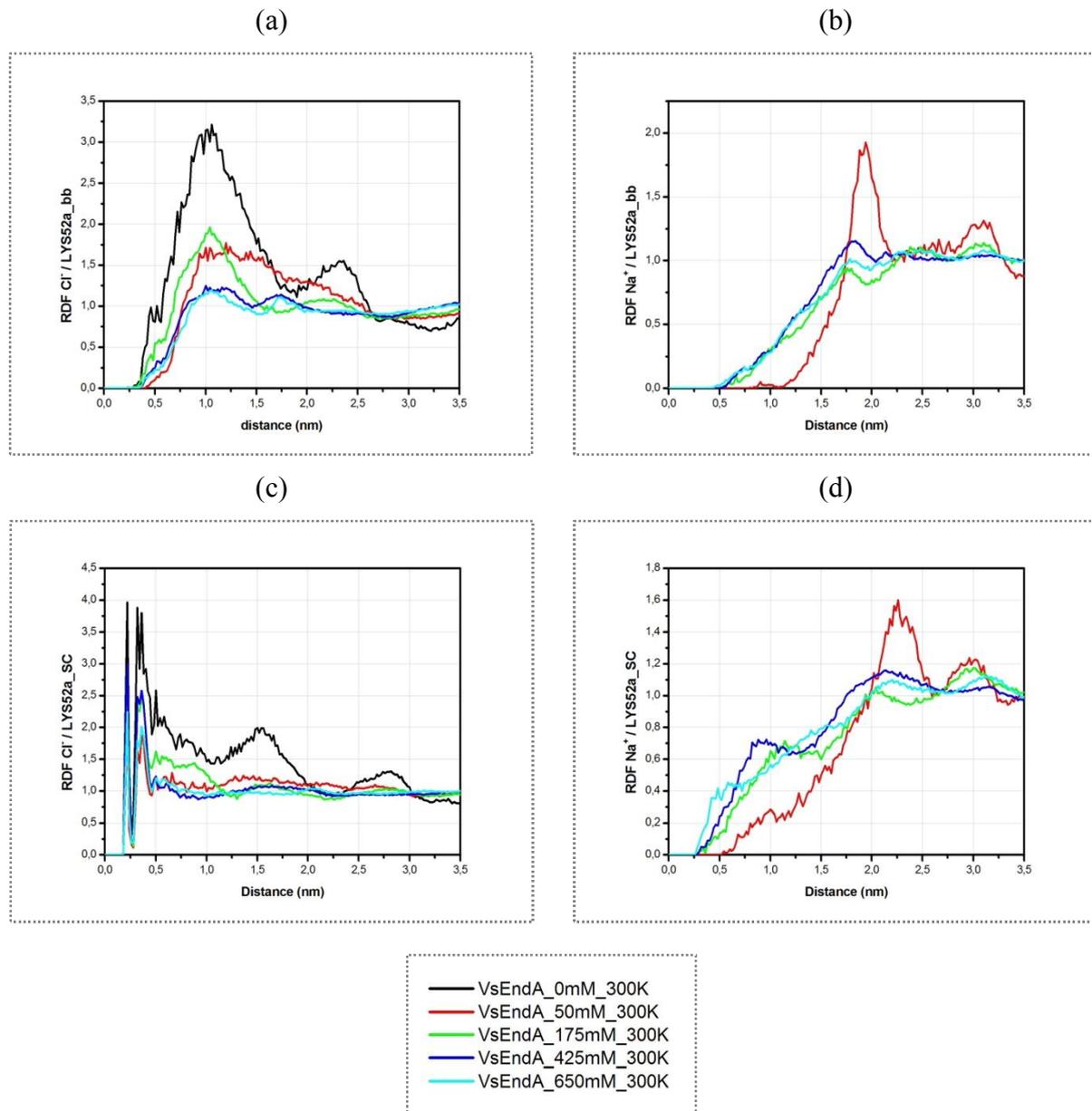


Figure 6 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de LYS52a en fonction de la concentration.

Contre toute attente, les fonctions de distribution radiales des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  autour du résidu LYS52a ne présentent aucune valeur importante pour la concentration en sel de 425 mM, ni pour la partie squelette, ni pour la chaîne latérale, du même résidu (Fig. 6a–d).

Ces résultats des fonctions de distribution radiales des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont en bon accord avec le comportement du RMSF de la protéine (Fig. 2), où les régions boucles, et spécialement les résidus TYR38, ASN52, et LYS52a sont les plus touchés par la valeur en sel optimale de 425 mM. On doit souligner une fluctuation considérable de la lysine (LYS52a) durant la simulation de DM à 425 mM en sel, et ceci n'est apparemment pas la conséquence de l'augmentation de la densité des ions chlorure et/ou sodium autour d'elle, tel que prévu, mais en réalité, la flexibilité remarquable notée pour le résidu polaire ASN52, dû en grande partie à l'accumulation des ions sodium, influence significativement la flexibilité structurale de son résidu adjacent ; LYS52a.

### 3.4 Nombre des contacts

Nous rapportons dans la figure 7 le nombre de contacts entre les ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  et les résidus TYR38, ASN52 et LYS52a, respectivement, dans une distance de 0.35 nm. Comme observé, il existe plus de contacts des ions  $\text{Cl}^-$  que  $\text{Na}^+$ , avec les différents résidus sous étude. Les ions chlorures s'associent plus fortement avec les résidus de la protéine que les ions sodium. Cette tendance est aussi observée dans des simulations antérieures de petits peptides <sup>[21, 23, 24]</sup>. En revanche, les ions sodium s'associent plus fortement plutôt avec l'eau qu'avec la protéine, et par conséquent, ils affichent une exclusion préférentielle par rapport à la surface de la protéine, comparés aux ions chlorures <sup>[4]</sup>. Comme montrés dans les figures 7a et 7b, l'interaction des ions  $\text{Cl}^-$  avec le résidu TYR38 est considérablement plus élevée pour la concentration en sel optimale 425 mM, ceci est valable pour la partie squelette, et la partie chaîne latérale pour le résidu considéré. Cependant, les ions  $\text{Na}^+$  montrent une préférence significative seulement pour le squelette à la concentration de sel de 425 mM, et ce schéma n'est pas observé pour la partie chaîne latérale, où nous avons noté une valeur maximale du nombre des contacts pour la concentration de 650 mM (Fig. 7b).

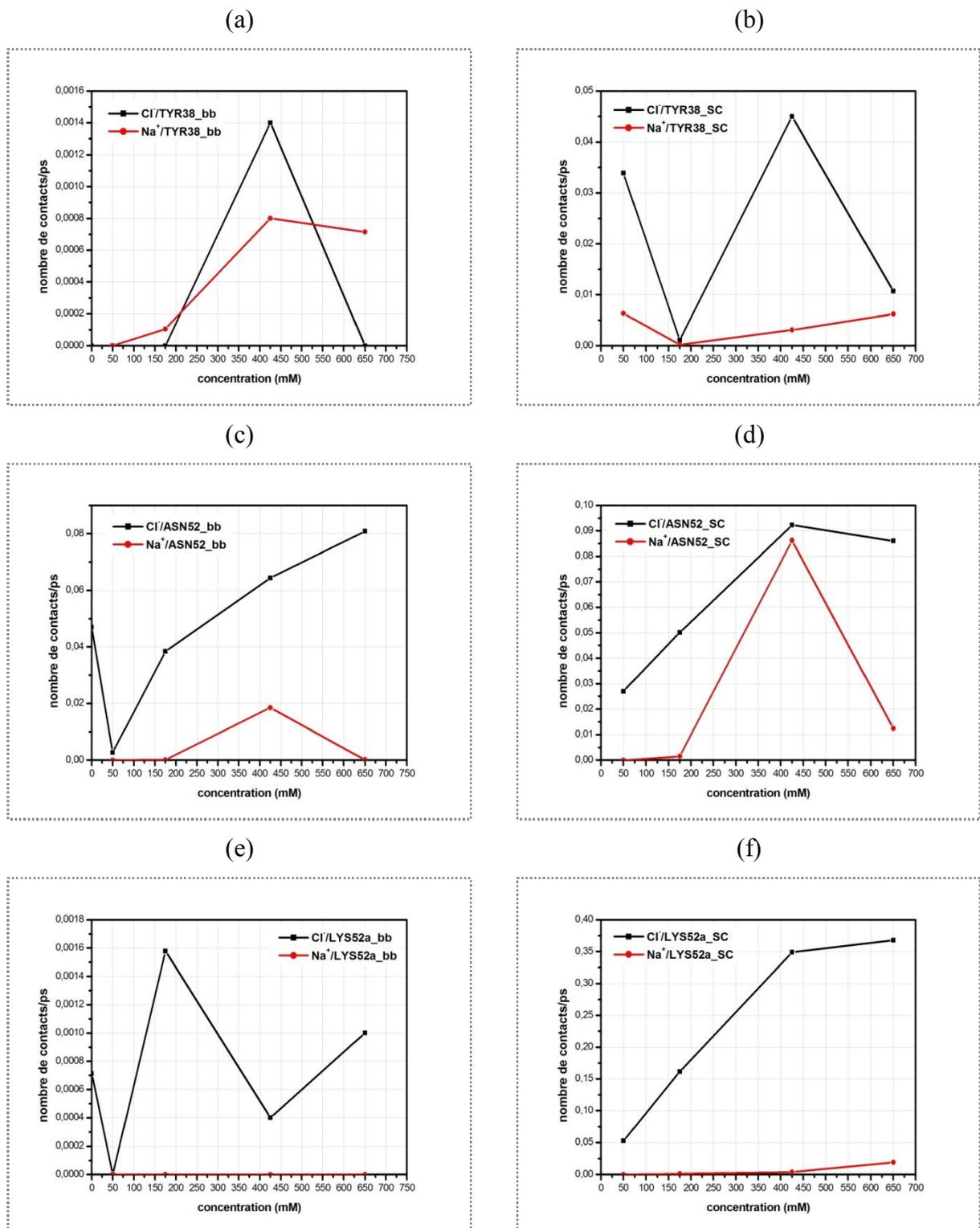


Figure 7 : Nombre des contacts entre les ions Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> et les résidus les plus flexibles de VsEndA.

Concernant le résidu ASN52, nous notons une augmentation globale du nombre des contacts avec les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , comparé au résidu TYR38, pour les deux parties ; squelette et chaîne latérale du résidu correspondant (Fig. 7c et 7d). Comme le montre la figure 7c,  $\text{Na}^+$  interagit plus fortement avec la partie squelette d'ASN52 à la concentration en sel optimale (425 mM), que pour les autres concentrations. Cependant, ce n'est pas le cas des ions  $\text{Cl}^-$ , où nous avons noté une forte association de ces derniers autour du squelette d'ASN52 pour la concentration de 650 mM. L'observation saisissante est présentée dans la figure 7d, où une association plus prononcée est notée pour les deux ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , avec la chaîne latérale, pour la concentration de 425 mM. Nous devons également souligner ce résultat intéressant, que les deux ions montrent presque la même préférence pour la chaîne latérale polaire mais neutre du résidu asparagine, pour la concentration en sel optimale ; 425 mM, et ceci a probablement un effet direct sur la flexibilité structurale du résidu considéré.

Tout comme les résultats des fonctions de distribution radiales de la lysine (LYS52a), où nous n'avons noté aucune corrélation entre l'accumulation des ions et le profil de la flexibilité du résidu considéré, des résultats similaires sont notés pour le nombre des contacts. Les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  s'associent plus fortement avec le résidu LYS52a à la concentration en sel de 650 mM plutôt qu'à 425 mM, pour la partie chaîne latérale (Fig. 7f). Tandis que la partie squelette du même résidu est marquée par une importante accumulation des ions  $\text{Cl}^-$  à 175 mM (Fig. 7e). Il semblerait que l'association des ions chlorure n'a aucun effet sur la mobilité de la lysine, puisque cette dernière se voit entraîner par la mobilité élevée de son résidu adjacent ; ASN52.

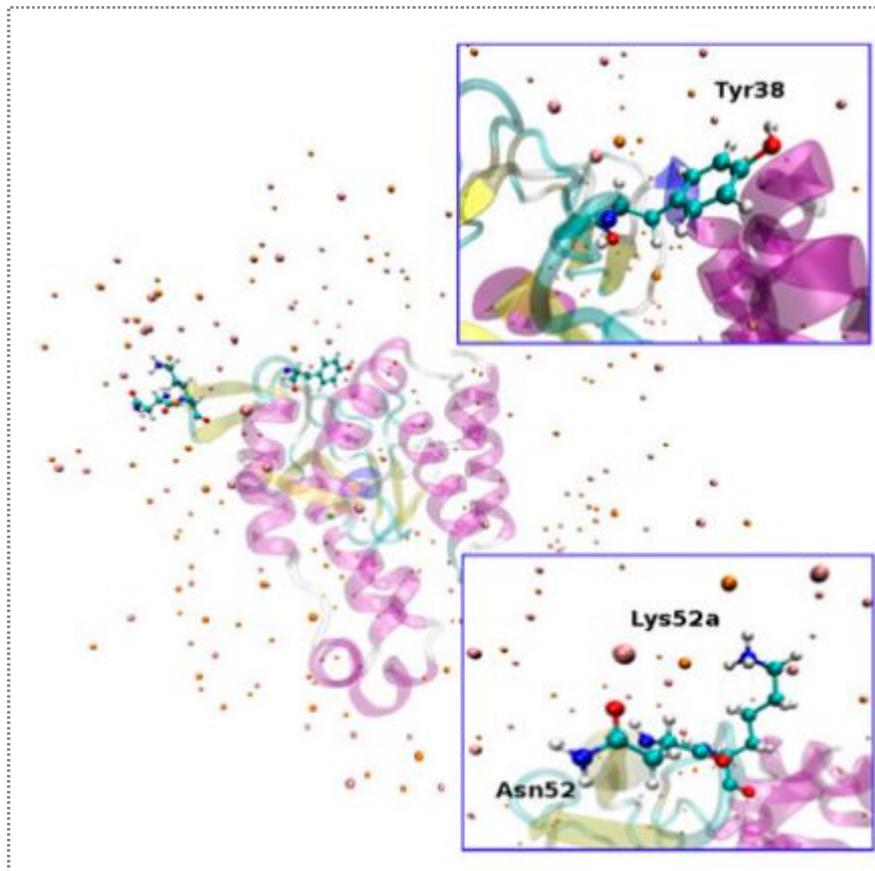


Figure 8 : Aperçu de la simulation de DM de VsEndA\_425mM\_300K, présentant la protéine en style *Cartoon*, et les résidus les plus flexibles de la structure (TYR38, ASN52 et LYS52a) en style *CPK*. Les ions magnésium, Chlorure et sodium sont colorés en vert, orange et rose, respectivement. Pour plus de clarté dans l'image, nous avons omis les molécules d'eau. Cette image est faite avec VMD 1.8.7 <sup>[25]</sup>.

### 3.5 Durée de vie des liaisons hydrogènes

Comme illustré dans le tableau 2, nous avons calculé les durées de vie des liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires pour les résidus correspondants : TYR38, ASN52 et LYS52a, à différentes valeurs de la concentration en sel NaCl.

Tableau 2 : Durées de vie en pico-secondes des liaisons hydrogènes.

Residue	2PU3_0mM	2PU3_50mM	2PU3_175mM	2PU3_425mM	2PU3_650mM
<b>38_bb_Wat</b>	10.870	8.030	11.612	<b>4.664</b>	9.461
<b>38_bb_P</b>	113.089	30.762	52.107	357.496	39.421
<b>38_SC_Wat</b>	2.754	2.718	1.940	4.480	2.604
<b>38_SC_P</b>	-1730.129	13.496	18.993	38.040	31.979
<b>52_bb_Wat</b>	10.523	9.106	9.629	<b>2.636</b>	11.901
<b>52_bb_P</b>	26.319	82.849	343.599	97.119	15.944
<b>52_SC_Wat</b>	1.491	1.552	1.561	1.832	2.015
<b>52_SC_P</b>	33.013	43.017	46.052	130.661	1121.187
<b>52a_bb_Wat</b>	6.352	-13.173	-15.417	13.987	5.239
<b>52a_bb_P</b>	62.116	35.594	65.308	70.906	59.981
<b>52a_SC_Wat</b>	2.534	2.799	2.316	2.616	2.343
<b>52a_SC_P</b>	aucune	aucune	aucune	aucune	aucune

Nous observons que les liaisons hydrogène intramoléculaires formées entre les différents résidus et le reste de la protéine ont des durées de vie plus importantes que les liaisons hydrogène intermoléculaires, formées entre les différents résidus correspondants et les molécules d'eau. Ceci peut être expliqué par la grande diffusion des molécules d'eau autour de la surface de la protéine, qui a un effet direct sur la flexibilité structurale de la région boucle, en raison de la réduction des durées de vie des liaisons hydrogène formées avec les molécules d'eau environnantes.

Comme montré dans le tableau 2, les résultats des durées de vie des liaisons hydrogène calculées entre les molécules d'eau et la partie squelette des résidus TYR38 et ASN52 sont en

moyenne 4.664 et 2.636 ps respectivement. Ces valeurs sont les plus basses pour la concentration en sel de 425 mM, qui est en parfait accord avec la flexibilité structurale des résidus considérés, où nous avons observé une valeur maximale du RMSF pour ces deux résidus avec la concentration en sel optimale de 425 mM (Fig.2). De plus, les durées de vie des liaisons hydrogènes entre le squelette du résidu ASN52 et l'eau sont significativement plus courtes que celles entre le squelette du résidu TYR38 et l'eau, qui est également en concordance avec le graphe du RMSF de la protéine (Fig. 2).

Une fois de plus, nous trouvons aucune corrélation entre la flexibilité structurale de la lysine LYS52a et la durée de vie des liaisons hydrogène inter et/ou intramoléculaires calculées, ni pour le squelette, ni pour la chaîne latérale du résidu considéré.

#### 4. Conclusion

Les protéines doivent avoir une dynamique appropriée et une flexibilité suffisante pour accomplir leur fonction biologique. La dynamique des protéines peut être sensiblement perturbée par des changements plutôt subtils dans les conditions environnementales, comme la température et la concentration des petits solutés. L'Endonucléase I issue de la bactérie psychrophile VsEndA offre un remarquable exemple dans ce contexte, en plus de ces caractéristiques adaptées au froid, comme la basse stabilité thermique, la basse température optimale, et l'efficacité catalytique élevée, comparées à ses homologues <sup>[12]</sup>.

Constamment exposée à l'environnement externe de la bactérie, à cause de sa localisation péri plasmique ou extracellulaire, l'enzyme Endonucléase I semble s'adapter aux concentrations élevées en sel NaCl par l'augmentation du nombre des résidus positivement chargés dans la surface de l'enzyme <sup>[26]</sup>. Dans ce chapitre, nous avons reporté les résultats des simulations de dynamique moléculaire de l'enzyme Endonucléase I à cinq valeurs différentes de concentrations en sel NaCl. L'analyse des trajectoires en terme de RMSF, fonctions de distribution radiales, nombre de contacts et durée de vie des liaisons hydrogène, indiquent des différences distinctes lorsqu'on change la concentration de NaCl.

La facilité à changer les conditions de simulation dans les calculs de DM nous a permis d'étudier, au niveau microscopique, l'effet des petits ions tel que Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup>, sur la flexibilité structurale de VsEndA. Nos résultats sont compatibles avec les données expérimentales, où on a noté une concentration de sel optimale pour l'activité catalytique égale à 425 mM <sup>[12]</sup>.

Sous cette concentration, la VsEndA présente deux régions boucles plus flexibles, comparées aux autres valeurs de concentrations ; les résidus 36–39 et 51–53.

Lors de l'analyse des RMSFs de ces deux régions spécifiques, trois résidus sont sélectionnés pour leur mobilité plus élevée ; TYR38 (0.1451 nm), LYS52a (0.2077 nm), et ASN52 (0.2133 nm). En plus, la flexibilité des résidus formant le site actif (HIS80 et ARG99)<sup>[12]</sup> est comparable avec les différentes concentrations de sel, et donc ne montre aucune sensibilité au sel.

Nous avons pu trouver une corrélation entre les propriétés structurales étudiées ici, tel que la fonction de distribution radiale, le nombre de contacts, la durée de vie des liaisons hydrogène, et la flexibilité structurale de seulement deux résidus polaires ; TYR38 et ASN52. Cependant, le résidu chargé ; LYS52a n'a montré aucune corrélation dans ce contexte. Les ions chlorures aussi bien que les ions sodiums s'accumulent plus autour du squelette du résidu TYR38, ce qui est à la cause de sa grande mobilité à la concentration de sel de 425 mM. Cependant, la singularité particulière de ASN52 en terme de flexibilité structurale sous la même concentration en sel, semble être principalement la conséquence de l'accumulation des ions sodiums autour de la chaîne latérale polaire du résidu considéré.

Finalement, à la lumière des présents résultats, la base moléculaire de l'adaptation au sel de l'enzyme VsEndA a été explorée par le moyen d'un traitement explicite de solvant et de sel. Nos résultats révèlent que la modulation des interactions des ions chlorures/sodiums avec certaines régions boucles spécifiques de la protéine, est la stratégie suivie par ce type d'enzyme psychrophile pour améliorer l'activité catalytique aux conditions physiologiques.

## 5. Références bibliographiques

1. Schildkraut, C., Lifson, S. (1965). Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers* 3: 195-208.
2. Zaccai, G., Eisenberg, H. (1990). Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. *Trends in Biochemical Sciences* 15: 333-337.
3. Rao, J. K. M, Argos, P. (1981). Structural stability of halophilic proteins, *Biochemistry* 20: 6536-6543.
4. Hofmeister, F. (1888). Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24, 247–260.
5. Siddiqui, K. S., Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75: 403–433.
6. Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., Willassen, N. P. (2000). Cold adapted enzymes. *Biotechnology Annual Review* 6: 1–57.
7. Liang, M., Qiang, C. (2006). Temperature dependence of salt-protein association is sequence specific. *Biochemistry* 45: 14466–14472.
8. Dzubielia, J. (2009). Salt-specific stability of short and charged alanine-based  $\alpha$ -helices. *The Journal of Physical Chemistry B* 113: 16689–16694.
9. Lazar, P., Lee, Y., Kim, S., Chandrasekaran, M., Lee, K. W. (2010). Molecular dynamics simulation study for ionic strength dependence of RNA-host factor interaction in staphylococcus aureus Hfq. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31: 1519–1526.
10. Dayer, M. R., Ghayour, O., Dayer, M. S. (2012). Mechanism of the bell-shaped profile of ribonuclease a activity: molecular dynamic approach. *Protein J.* 31: 573-579.
11. Pellicane, G., Cavero, M. (2013). Theoretical study of interactions of BSA protein in a NaCl aqueous solution. *The Journal of Chemical Physics* 138: 115103.
12. Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N. P., Smalås, A. O., Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS Journal* 274: 252–263.
13. Georgette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Gerday, C. (2004). Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 25–42.
14. Hansson, T., Oostenbrink, C., Van Gunsteren, W. (2002). Molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 190–196.
15. Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N., Arnold, F. H. (2000). Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *Journal of Molecular Biology*. 297: 1015–1026.

16. Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., Willassen, N. P. (2000). Cold adapted enzymes. *Biotechnology Annual Review* 6: 1–57.
17. Robert, X., Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*. 42: 320–324.
18. Li, C. L., Hor, L. I., Chang, Z. F., Tsai, L. C., Yang, W. Z., Yuan, H. S. (2003). DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: A novel structure with a known active site. *The EMBO Journal* 22: 4014–4025.
19. Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V., Edelman, M. (2000). Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 39: 261–268.
20. Record, J. M. T., Zhang, W., Anderson, C. F. (1998). Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: A practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Advances in Protein Chemistry* 51: 281.
21. Smith, P. E., Pettitt, B. M. (1991). Effects of salt on the structure and dynamics of the bis (penicillamine) enkephalin zwitterion : A simulation study. *Journal of the American Chemical Society* 113: 6029–6037.
22. Timasheff, S. N. (1998). Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: The simplicity of the complicated. *Protein Chemistry* 51: 355–432.
23. Formanek, M. S., Ma, L., Cui, Q. (2006). Effects of temperature and salt concentration on the structural stability of human Lymphotoxin: Insights from molecular simulations. *Journal of the American Chemical Society* 128: 9506–9517.
24. Smith, P. E., Marlow, G. E., Pettitt, M. (1993). Peptide in ionic-solution. A simulation study of a bis(penicillamine) enkephalin in sodium acetate solution. *Journal of the American Chemical Society* 115: 7493–7498.
25. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphic* 14, 33–38.
26. Altermark, B., Helland, R., Moe, E., Willasena, N. P., Smalasa, A. O., (2008). Environmental adaptation of endonuclease I from *Vibrio salmonicida*. *Acta Crystallographica*, D64, 368-376.

**Chapitre V :**  
**Dynamique Moléculaire de l'Effet de Sel sur**  
**L'Enzyme Mésophile *Vibrio Cholerae***  
***Endonucléase I (VcEndA)***

## 1. Introduction

La bactérie gram-négative *Vibrio cholerae*, a toujours été à travers l'histoire, un micro organisme très redoutable, en raison de ses propriétés pathogènes et contagieuses qui ont causé des pandémies de choléra affectant tous les continents dans le monde <sup>[1]</sup>. Son identification comme une menace sévère à la santé publique pendant au moins deux siècles, a entraîné une extensive caractérisation de cette bactérie. La virulence de *Vibrio cholerae* est principalement causée par la protéine sécrétée choléra entérotoxine, mentionnée aussi comme CT ou ctxA, mais aussi d'autres facteurs qui augmentent le taux d'infection ont été identifiés <sup>[1,2]</sup>.

*Vibrio cholerae* est aussi un habitant bactérien naturel d'environnements aquatiques et il est associé aux crustacés copépodes et aux plantes aquatiques <sup>[2]</sup>. Les bactéries isolées de la majorité des échantillons environnementaux exposent des propriétés non-pathogènes en raison du manque de gène pour le choléra entérotoxine <sup>[2]</sup>. Comme la bactérie *Vibrio cholerae* est liée à l'eau, et les pandémies avec peu d'exceptions ont leur origine du sous-continent indien et le delta du Gange dans le Bengale, il est suggéré que l'eau agit comme un réservoir pour la bactérie <sup>[1]</sup>.

La caractérisation et le clonage de VcEndA ont été d'abord décrits par Focareta et d'autres. <sup>[3]</sup>, mais la détermination structurale du nucléase a été effectuée vingt ans plus tard par Altermark et d'autres <sup>[4]</sup>. Il y a deux structures de VcEndA déposées dans la banque de données des protéines, les deux sont résolues par la cristallographie radiographique (X-ray).

La structure de plus basse résolution (entrée PDB 2g7e), avec une résolution de 1.6 Å, est cristallisée au pH bas, et la deuxième structure déposée avec la plus grande résolution de 1.95 Å (PDB entrée 2g7f), est cristallisée à pH neutre. La différence majeure entre ces deux structures est l'absence de l'ion catalytique Mg<sup>+2</sup> dans le site actif de la forme du pH bas, tandis qu'il est présent dans forme du pH neutre. Un ion de chlorure enterré à environ 7 Å de la molécule de solvant la plus proche est identifiée dans la structure de VcEndA <sup>[4]</sup>. Ce chlorure est considéré comme un ion structural ou stabilisant, et n'est pas une partie catalytique de la structure. Dans la caractérisation de VcEndA, les conditions optimales pour l'activité catalytique s'avèrent être une concentration en NaCl égale à 175 mM au pH 7.5-8.0, et une température de 50°C <sup>[5]</sup>. La masse moléculaire calculée sans le signal de N-terminal est 24.7 kDa et est vérifiée par SDS/PAGE.

Altermark et d'autres <sup>[5]</sup> ont testé aussi la spécificité du substrat et ont constaté que VcEndA a une activité RNase très basse comparée à l'activité DNase aux conditions optimales rapportées, mais était capable de cliver efficacement l'ADN plasmidique, l'ADN simple et double brin. Ils ont conclu sur la base de ces résultats que l'ADN est le substrat naturel, et que VcEndA est donc une

DNASE à ses conditions physiologiques. Le produit du clivage catalytique est un groupe 5'-phosphate et un 3'-oxygène groupe partant.

## 2. Objectif du chapitre

Un facteur important à l'activité et à la stabilité de chaque enzyme est son environnement physiologique. L'étude antérieure sur l'enzyme sécrétée mésophile Endonucléase I (VcEndA), a montré que son activité était fortement dépendante non seulement de la température, mais aussi de la concentration de NaCl <sup>[5]</sup>. Parmi les Orthologues de l'Endonucléase I de plusieurs espèces de bactéries qui sont décrites dans la littérature <sup>[5,8-9]</sup>, nous nous sommes intéressé à l'étude de la VcEndA car la caractérisation biochimique de cette enzyme a déjà été reportée, et comparée à celle de son homologue la VsEndA <sup>[5]</sup>. Nous étudierons dans ce chapitre, par la simulation de dynamique moléculaire à T=300K, l'effet de différentes valeurs de concentrations de NaCl (tableau1) sur la flexibilité structurale de l'enzyme VcEndA. Nous essayerons finalement d'apporter plus d'information sur la modification adaptative de la molécule homologue VcEndA, par rapport à VsEndA, parce que ces modifications sont d'un grand intérêt en recherche fondamentale aussi bien qu'en biotechnologie.

Tableau1 : nombre d'ions Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> pour chaque simulation

	VcEndA_0mM	VcEndA_50mM	VcEndA_175mM	VcEndA_425mM	VcEndA_650mM
Cl <sup>-</sup>	6	15	37	76	122
Na <sup>+</sup>	0	9	31	82	116

## 3. Résultats

### 3.1 Stabilité du modèle

La figure 1 montre l'évolution temporelle des RMSDs du squelette de l'enzyme VcEndA, pour les différentes simulations dans lesquelles nous avons varié la valeur de la concentration de NaCl. Selon la figure, les RMSDs reflètent des trajectoires de DM assez stables avec des valeurs moyennes qui ne dépassent pas 1.6 Å°.

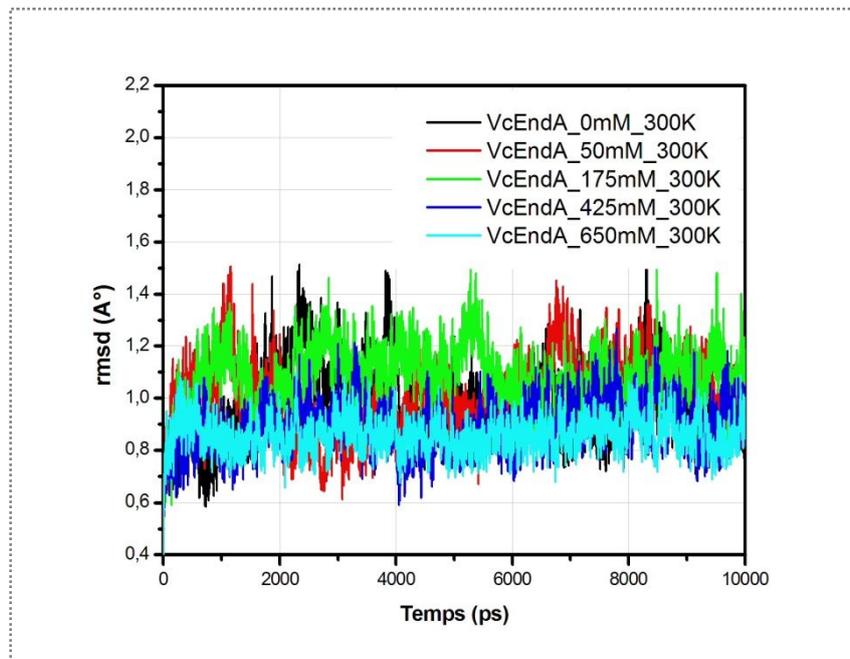


Figure 1 : rmsd de l'enzyme VcEndA sous différentes valeurs de la concentration en NaCl.

### 3.2 Flexibilité structurale

Pour évaluer la mobilité relative des régions de la protéine au cours des simulations de DM, le (RMSF) root mean square fluctuation des atomes  $C_{\alpha}$  dans un résidu, de la structure moyenne obtenue à partir des images fusionnées des trajectoires de DM, est calculé pour l'enzyme VcEndA en fonction du nombre des résidus, à différentes concentration en sel NaCl (Fig. 2).

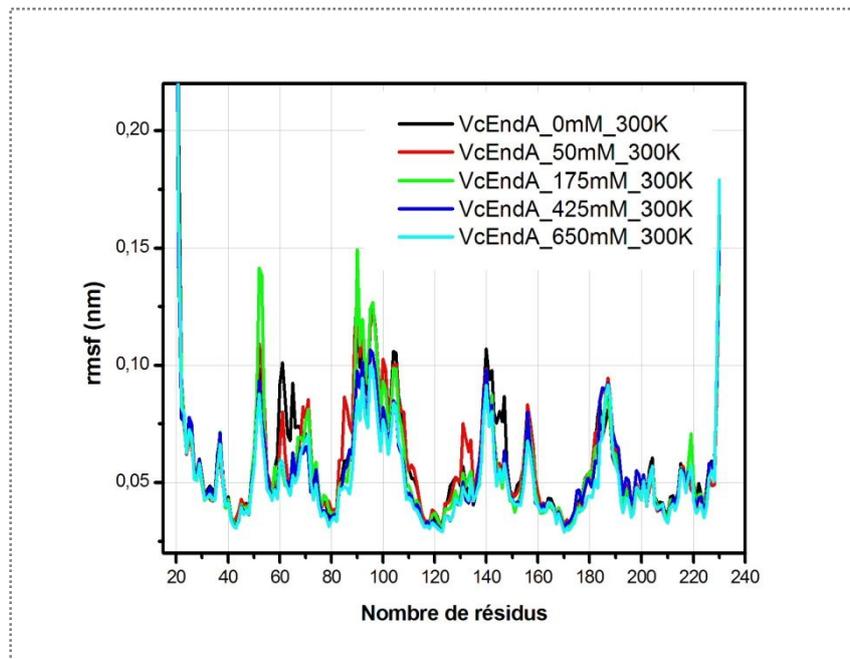


Figure 2 : rmsf de l'enzyme VcEndA sous différentes valeurs de la concentration en NaCl.

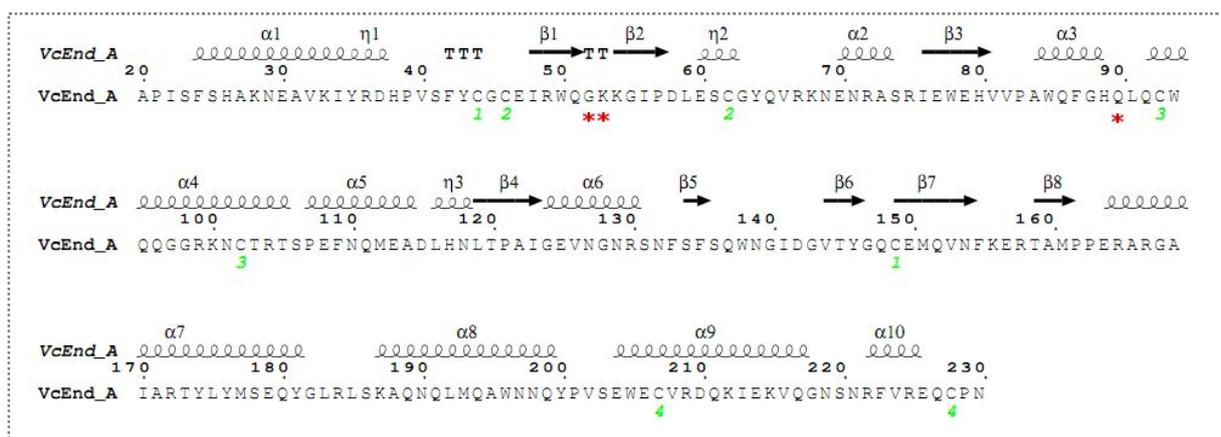


Figure 3 : Structure secondaire de VcEndA (code pdb ; 2G7F<sup>[5]</sup>), utilisant le programme ESPript 3.0<sup>[10]</sup>. les étoiles rouges indiquent les résidus les plus flexibles. Les nombres indiquent les cystéines impliquées dans les ponts disulfures.

Le profile du rmsf pour l'enzyme mésophile, sous différentes concentration en sel, est presque le même, à l'exception de deux régions, où la flexibilité de l'enzyme est élevée à C=175mM comparée aux autres valeurs de la concentration ; la région (GLY52-LYS53) et le résidu GLN90.

Situé dans la région boucle, entre deux feuillets  $\beta$  ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ , Fig. 3), le résidu GLY52 présente la valeur la plus haute du rmsf de l'enzyme mésophile ; 0.1415nm, et le résidu qui lui succède dans la structure primaire de l'enzyme ; LYS53 ; 0.1385nm, pour la concentration en sel égale à 175mM.

La glycine est parfois groupée avec les acides aminés hydrophobes, cependant elle est unique dans le fait de n'avoir aucune chaîne latérale. Cette absence de chaîne latérale permet à la glycine des angles de liaisons (dans les coudes du squelette) qui sont bien plus extrêmes que les autres acides aminés. Elle joue donc un rôle primordial en permettant un grand nombre de conformations dans les protéines sans déformation excessive. Notant également, que le résidu GLY52 est substitué par le résidu polaire ASN52 dans la structure primaire de VsEndA, et que la fluctuation la plus importante enregistrée concernant la flexibilité structurale de l'enzyme adaptée au froid, était pour ce résidu polaire où le rmsf a atteints la valeur maximale de 0.2133nm, sous la concentration en sel de 425 mM<sup>[11]</sup>. Donc, par homologie à l'enzyme adaptée au froid, l'enzyme mésophile est elle aussi caractérisée par une plus grande flexibilité structurale de la région boucle (52-53) sous la concentration en sel optimale pour l'activité catalytique ; 175 mM<sup>[5]</sup>.

L'autre région tout aussi bien importante dans le profile du rmsf de VcEndA est le résidu GLN90. Situé à proximité du site actif ARG99, dans une région boucle entre deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha_3$  et  $\alpha_4$ , Fig. 3), ce résidu polaire présente la plus haute valeur du profile du rmsf de cette enzyme mésophile pour la concentration en sel de 175mM ; 0.1493nm. Nos résultats de la flexibilité structurale coïncident bien avec les travaux ultérieurs sur la paire d'enzyme Endonucléase I, où l'enzyme mésophile VcEndA issue d'eau saumâtre de basse salinité, avait une concentration en sel optimale pour l'activité plus basse que celle de son homologue psychrophile VsEndA<sup>[5]</sup>.

### 3.3 Les fonctions de distribution radiales

Afin de caractériser la distribution des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  autour des régions les plus flexibles de la protéine, la fonction de distribution radiale des ions autour des résidus GLY52, LYS53 et GLN90, est calculée pour les différentes valeurs de la concentration en NaCl (Fig. 4-6).

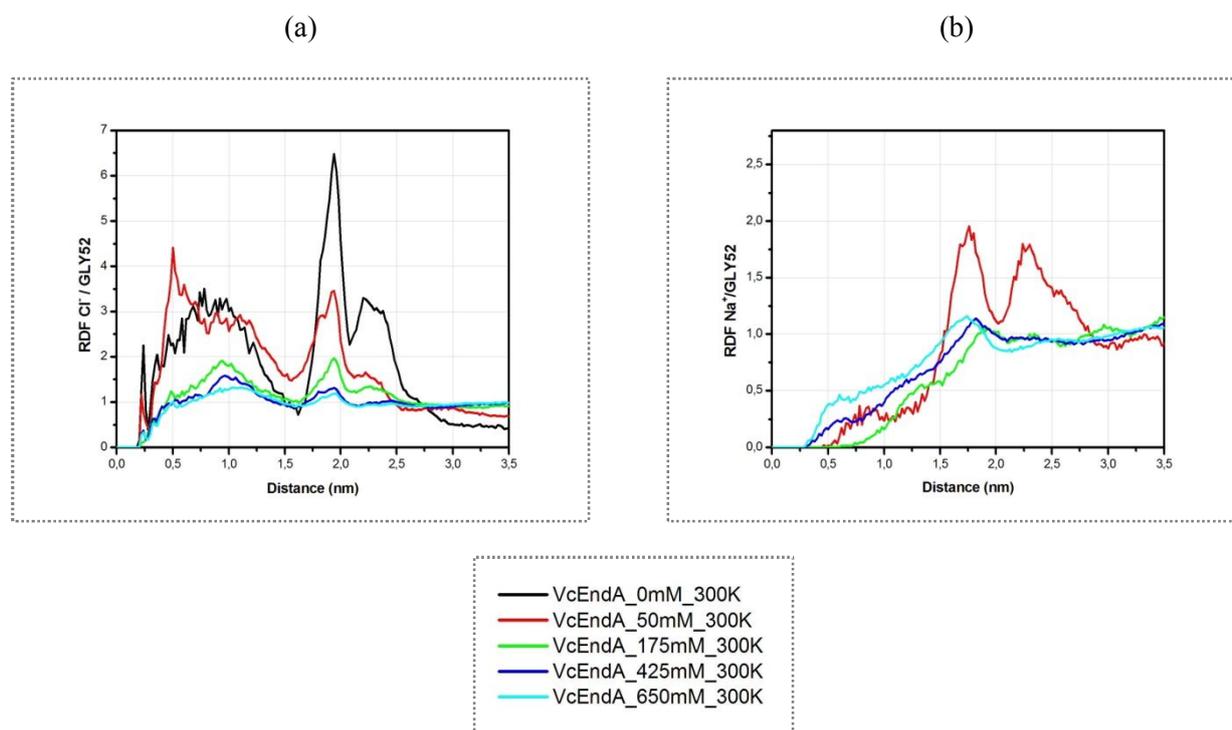


Figure 4 : RDF des ions Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> autour de GLY52 en fonction de la concentration.

La figure 4a montre une claire accumulation des ions Cl<sup>-</sup> autour du résidu hydrophobe GLY52 pour la concentration en sel égale à 0 mM, avec un pic situé à 0.24 nm, cependant, on n'a pas noté une importante accumulation des ions Na<sup>+</sup> autour du même résidu, pour toutes les concentrations étudiées (Fig. 4b).

Les faibles concentrations en sel (0 et 50 mM) dominent clairement les RDF de l'ion Cl<sup>-</sup> autour de la LYS53, et spécialement autour de la chaîne latérale (SC) (Fig. 5c), où on note une forte interaction des ions Cl<sup>-</sup> pour la concentration C=50mM ; le premier pic se situe à 0.215nm, et le second à 0.37nm.

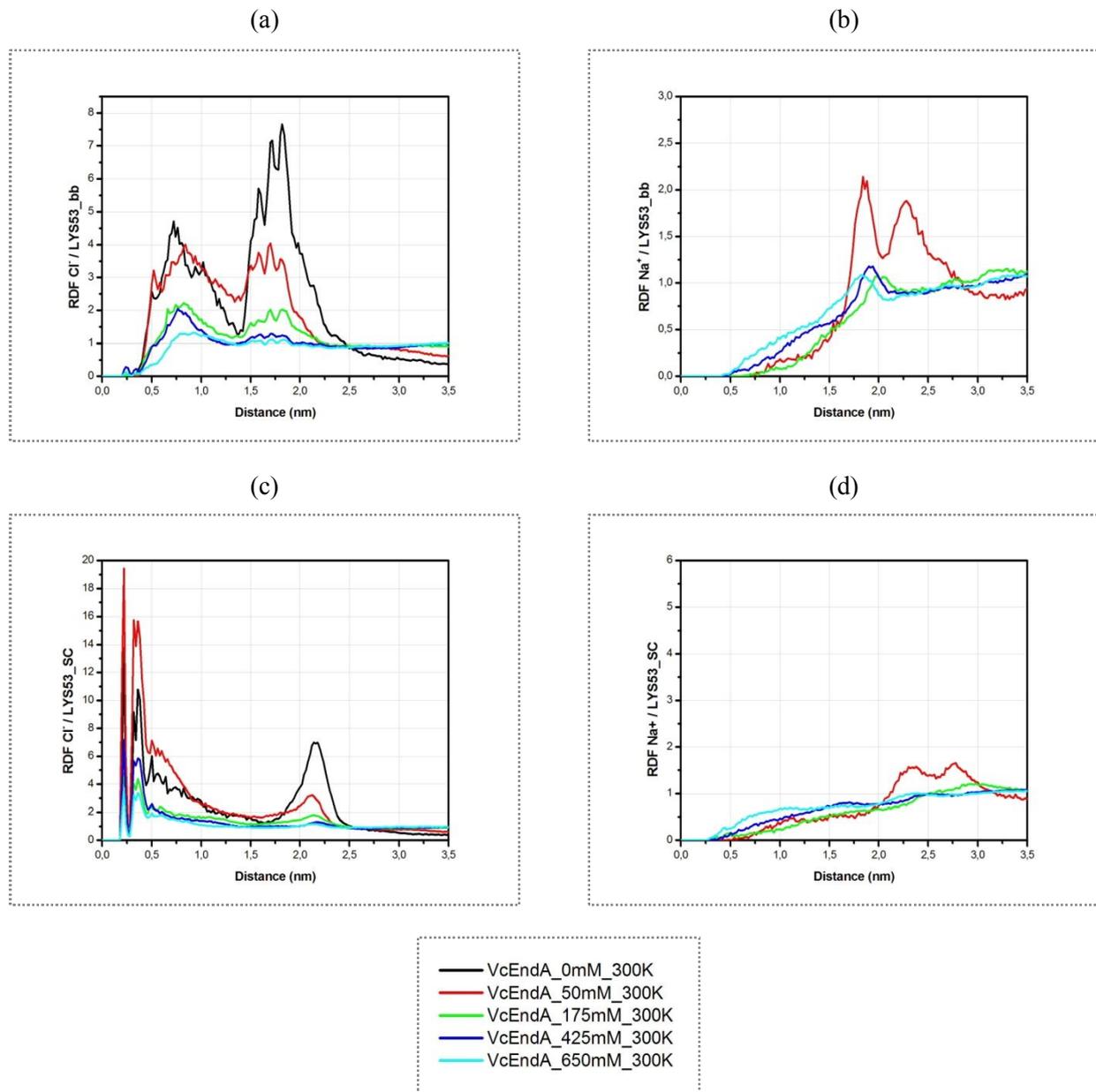


Figure 5 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de LYS53 en fonction de la concentration.

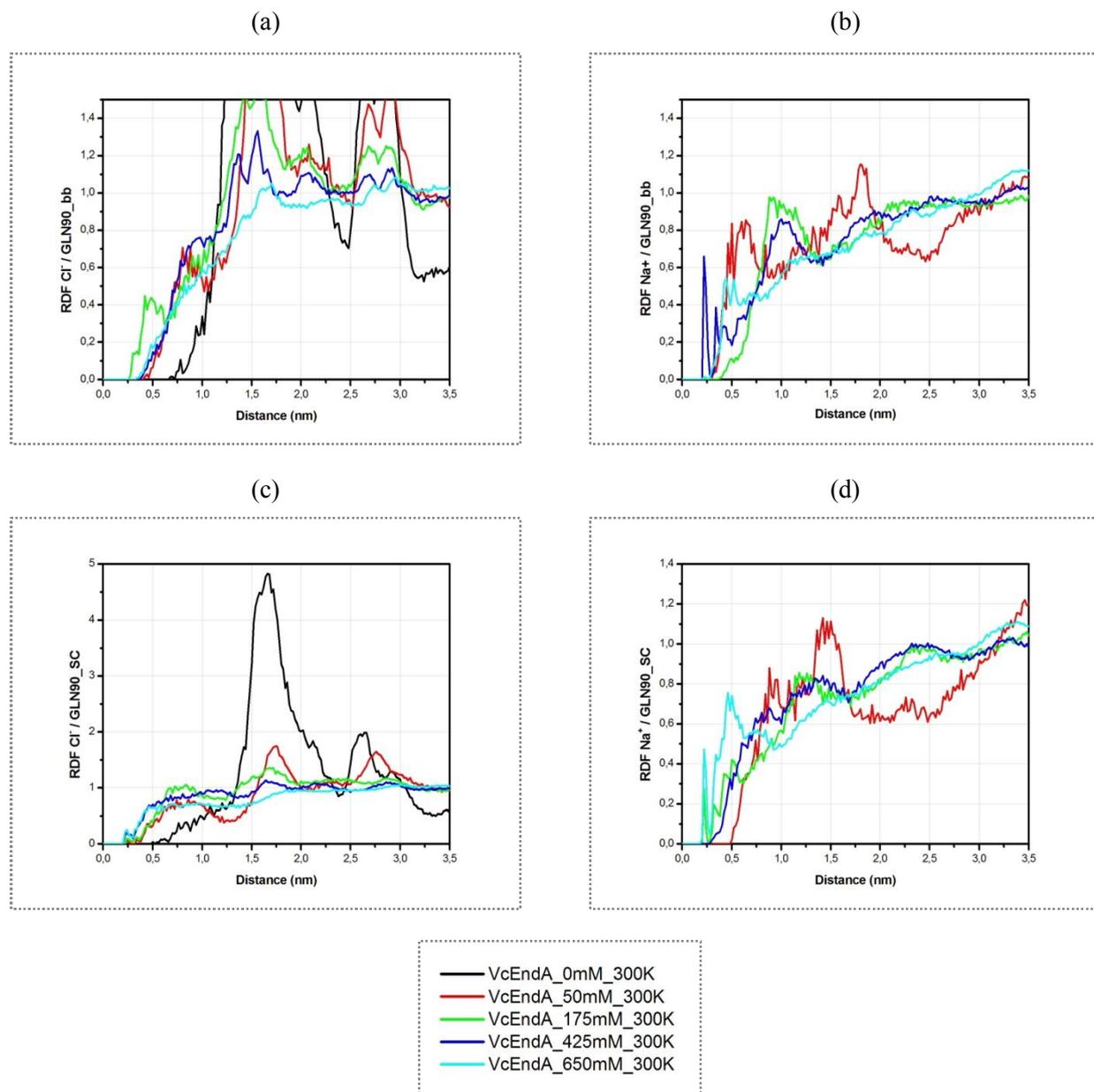


Figure 6 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de GLN90 en fonction de la concentration.

Quoiqu'elle est faible, on doit noter l'interaction des ions  $\text{Cl}^-$  avec le squelette (bb) du résidu polaire GLN90 à  $C=175$  mM (Fig. 6a). Les ions  $\text{Na}^+$  s'accablent eux aussi autour du bb du même résidu mais à la concentration en sel de 425 mM, avec un premier pic à 0.215 nm montrant ainsi un contact direct entre ces ions et le bb de GLN90 (Fig. 6b).

La partie SC du même résidu est elle aussi en interaction avec les ions  $\text{Na}^+$ , surtout pour la concentration en sel  $C=650$  mM, où le premier de la RDF se situe également à 0.215 nm (Fig. 6d).

Nous avons aussi calculés la fonction de distribution radiales des molécules d'eau autour des résidus concernés ; GLY52, LYS53 et GLN90 en fonction des différentes concentrations en sel

(Fig. 7). L'accumulation des molécules d'eau est plus importante pour la valeur de la concentration de 175 mM, comparé aux autres valeurs, pour les deux résidus ; GLY52 et LYS53 (Fig. 7a et 7b), cependant le résidu polaire s'entoure de plus de molécules d'eau à la concentration en sel de 650 mM (Fig. 7c).

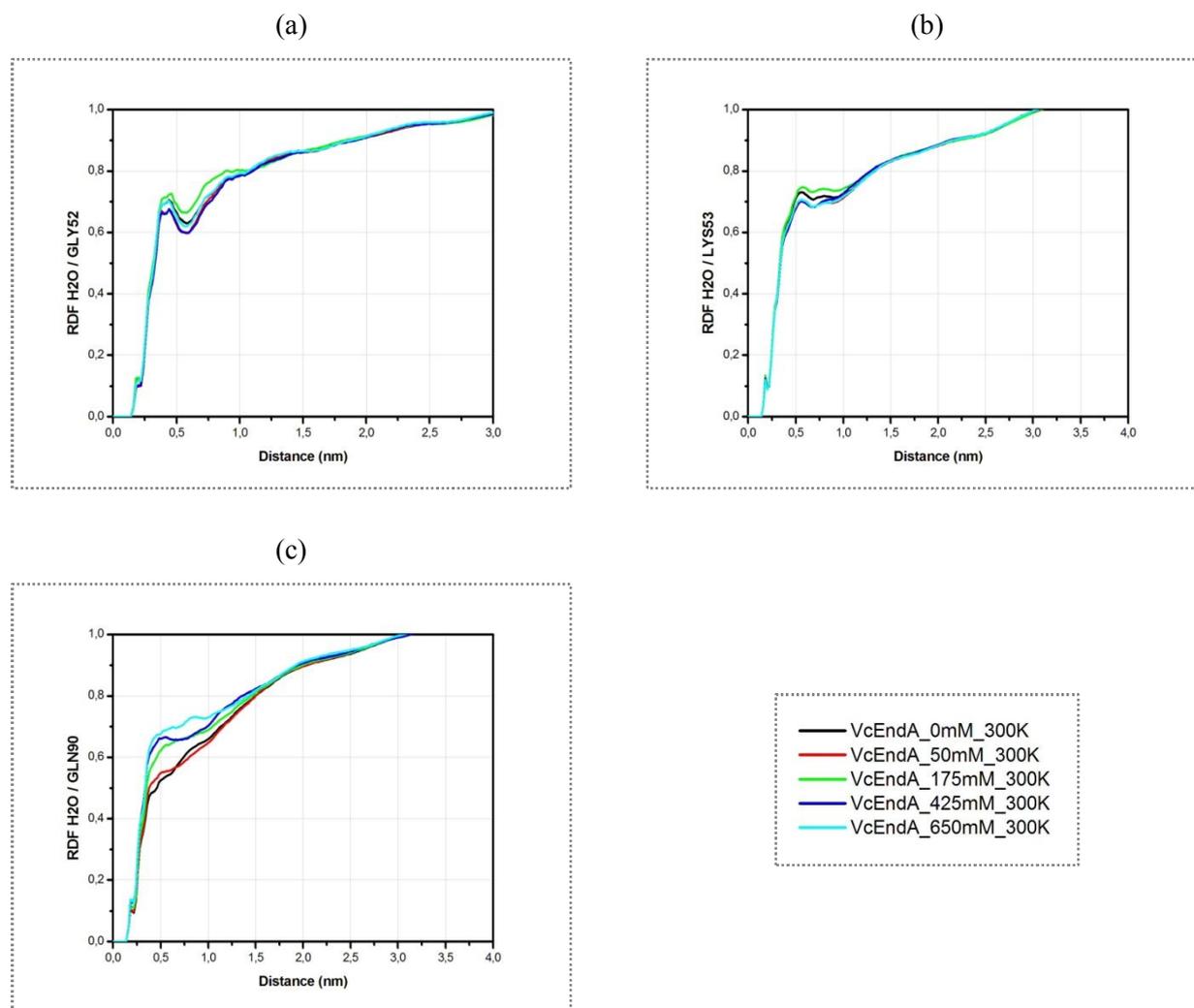


Figure 7 : RDF des molécules d'eau autour des résidus les plus flexibles de VcEndA.

### 3.4 Nombre de contacts

Dans le but de confirmer l'accumulation des ions  $\text{Cl}^-$  autour du squelette du résidu GLN90 pour la concentration en sel de 175 mM, nous avons calculé le nombre de contacts de ces ions autour de cette partie du résidu, pour chaque valeur de la concentration. Selon le tableau 2, quoique la valeur enregistré des contacts, pour la concentration de 175 mM est assez faible ( $44.4 \cdot 10^{-4}$  contact/ps), mais elle reste la plus élevée comparée aux autres valeurs de la concentration.

Tableau 2 : nombre de contact par ps des ions Cl<sup>-</sup> avec le squelette de GLN90.

	VcEndA_0mM	VcEndA_50mM	VcEndA_175mM	VcEndA_425mM	VcEndA_650mM
<b>Cl_GLN90_bb</b>	0	0	44.4 10 <sup>-4</sup>	0	3.16 10 <sup>-4</sup>

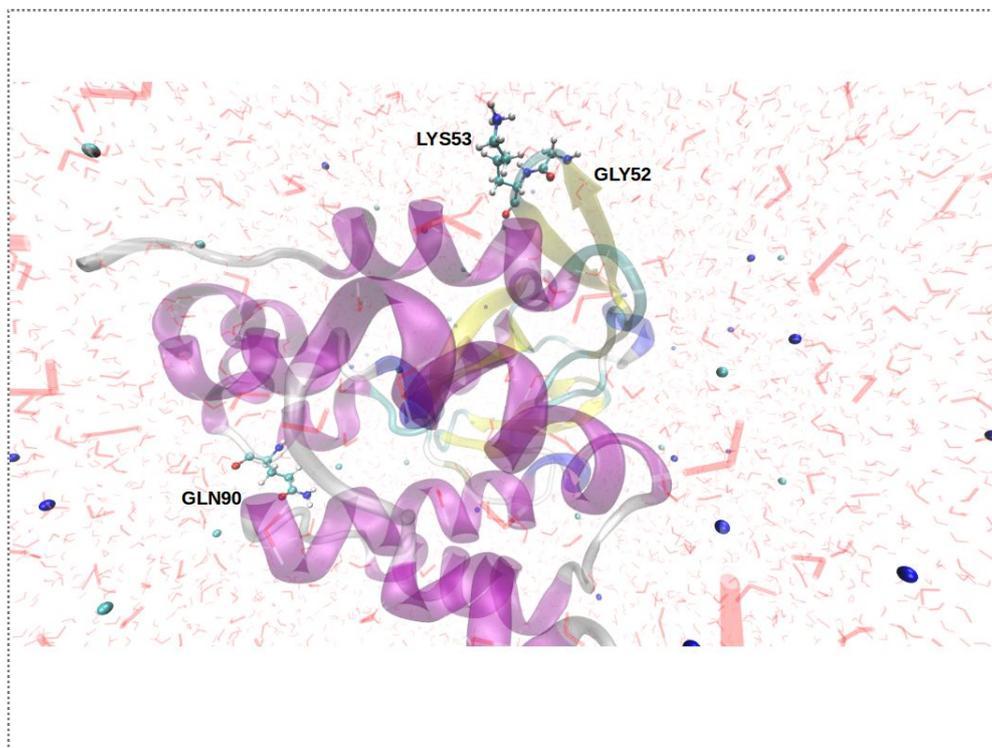


Figure 8 : Aperçu de la simulation de DM de VcEndA\_175mM\_300K, présentant la protéine en style *Cartoon*, et les résidus les plus flexibles de la structure (GYL52, LYS53 et GLN90) en style *CPK*. Les ions Chlorure et sodium sont colorés en cyan et bleu, respectivement. Les molécules d'eau sont représentées en style *line transparent*. Cette image est faite avec VMD 1.8.7 <sup>[12]</sup>.

### 3.5 Durée de vie des liaisons hydrogène

Les valeurs des durées de vie des liaisons hydrogènes formées entre les résidus les plus flexibles de l'enzyme VcEndA (GLY52, LYS53 et GLN90), d'une part, et d'autre part par les molécules d'eau environnantes, ou bien avec le reste de la protéine, sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Durées de vie en pico-seconde des liaisons hydrogènes.

	Vc_0mM_300	Vc_50mM_300	Vc_175mM_300	Vc_425mM_300	Vc_650mM_300
<b>HB_52_Wat</b>	2.294	3.501	2.672	8.042	5.639
<b>HB_52_P</b>	26.036	36.079	23.301	32.706	16.276
<b>HB_53bb_Wat</b>	12.191	10.250	16.241	6.217	13.494
<b>HB_53SC_Wat</b>	3.327	3.572	3.471	3.698	3.545
<b>HB_53_P</b>	125.169	75.951	100.560	132.536	106.784
<b>HB_90bb_Wat</b>	6.118	2.345	-19.905	-16.527	-179.991
<b>HB_90_Wat</b>	-45.419	2.990	2.882	2.32	-90.772
<b>HB_90SC_Wat</b>	-40.489	17.844	1.587	1.509	1.836
<b>HB_90_P</b>	-2395.49	96.291	132	285.17	50.329

Les durées de vie des liaisons hydrogène (intermoléculaires) formées entre la glycine GLY52 et l'eau, sont faibles à basse concentration en sel ; 0, 50 et 175 mM, comparé aux autres valeurs élevées de la concentration. La plus petite valeur enregistrée ; 2.294 ps pour la concentration de 0 mM, est la conséquence directe de la plus forte accumulation des ions Cl<sup>-</sup> autour du résidu considéré, pour la même concentration, révélée par la RDF (Fig. 4a). Effectivement, les ions chlorures interrompent les liaisons hydrogènes susceptibles de se former, d'où une diminution de la durée de vie. On doit aussi noter que la durée de vie avec les molécules d'eau enregistrée à 175 mM pour ce même résidu ; 2.672 ps, révèle également une structure assez flexible, à cette valeur de la concentration, puisque cette valeur, quoiqu'elle n'est pas la plus basse enregistrée, mais elle reste comparable à cette dernière, dans le cadre de cette approximation.

De même que les liaisons hydrogènes intermoléculaires, les liaisons hydrogènes intramoléculaires de la glycine GLY52 sont influencées par l'accumulation des ions, puisque la plus basse durée de vie enregistrée; 16.276 ps à 650 mM en sel, est due selon la RDF du même résidu (Fig. 4b) à la présence de plus d'ion  $\text{Na}^+$  autour de GLY52 pour la concentration en sel considérée, comparée aux autres valeurs de la concentration.

Les durées de vie des liaisons hydrogènes intermoléculaires pour la lysine LYS53 sont les plus basses pour la chaîne latérale de ce même résidu, avec des valeurs assez proches les unes aux autres ( $\approx 3.5$  ps), pour les différentes concentrations en sel. Cependant, les durées de vie enregistrées pour les liaisons hydrogène intramoléculaires sont beaucoup plus longues, avec les valeurs les plus basses; 75.951 et 100.560 ps, pour les concentrations de 50 et 175 mM, respectivement.

Les plus petites valeurs notées dans le tableau 3 sont celles relatives aux liaisons hydrogène formées entre la chaîne latérale du résidu polaire GLN90 et les molécules d'eau, avec les plus basses durées de vie; 1.509 et 1.587 ps, pour les concentrations de 425 et 175 mM, respectivement. Les valeurs des durées de vie calculées pour la partie squelette du même résidu, sont insignifiantes (valeurs négatives), et ne nous permettent pas de faire une comparaison.

#### 4. Conclusion

On croit généralement que les protéines et particulièrement les enzymes sont des structures vulnérables et sensibles aux changements environnementaux. La raison pour laquelle elles sont si sensibles aux changements dans le sel et la température est qu'un tel changement peut affecter les interactions qui maintiennent en position la chaîne de la protéine en place.

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de l'effet de NaCl sur la dynamique de l'enzyme mésophile *Vibrio cholera*. L'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire révèle que l'enzyme est peu tolérante et sensible au sel, puisque le profil du rmsf en fonction des différentes concentrations ne montre pas une grande différence de la mobilité de l'enzyme pour les valeurs élevées de la concentration en NaCl (450 et 650 mM). Cependant, les régions les plus flexibles de l'enzyme sont enregistrées sous la concentration de 175 mM en sel, ce qui coïncide bien avec le travail expérimental antérieur <sup>[5]</sup>. Tout comme son homologue psychrophile VsEndA, l'enzyme mésophile est caractérisée par une flexibilité importante de la région boucle (52-53) sous la concentration optimale de 175 mM, qui est due essentiellement au résidu GLY52. Cependant, on n'a pas trouvé de corrélation entre la flexibilité et la position des ions  $\text{Cl}^-$  et/ou  $\text{Na}^+$  autour de ce dernier, puisque la fonction de distribution radiale révèle plutôt une accumulation élevée des molécules d'eau et non pas des ions autour de la glycine GLY52, pour la concentration en sel de 175

mM. Donc, la forte interaction avec le solvant est responsable de la flexibilité accrue de la région boucle (52-53).

On ne peut pas dire autant du résidu polaire GLN90, qui est considéré, selon le profil du rmsf, comme le résidu le plus flexible de la structure de VcEndA sous la concentration en sel optimale, puisque son squelette s'entoure de plus d'ions Cl<sup>-</sup>, et ce qu'il lui confère plus de flexibilité sous la concentration considérée.

## 5. Références bibliographiques

1. Kaper, J. B., Morris Jr., J. G., Levine, M. L. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 48-86.
2. Singh, D. V., Matte, M. H., Matte, G.R., Jiang, S., Sabeena, F., Shukla, B.N., Sanyal, S.C., Huq, A., Colwell, R.R. (2001). Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non O139 strains: Clonal Relationships between clinical and environmental isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 910-921.
3. Focareta, T., Manning, P. A. (1987). Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of the deoxyribonuclease (DNase) together with its periplasmic localization on *Escherichia coli* K-12. *Gene*, 53, 31-40.
4. Altermark, B., Smalås, A.O, Willassen, N.P., Helland, R. (2006). The structure of *Vibrio cholerae* extracellular endonuclease I reveals the presence of a buried chloride ion. *Acta Crystallography D Biological Crystallography* 62, 1387-1391.
5. Altermark, B., Willassen, N.P., Smalås, A.O, Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold-adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS Journal*, 274, 252-263.
6. Chang, M. C., Chang, S. Y., Chen, S. L., Chuang, S. M. (1992). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 122: 175–180.
7. Wu, S. I., Lo, S. K., Shao, C. P., Tsai, H. W., Hor, L. I. (2001). Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. *Appl Environ Microbiol* 67: 82–88.
8. Salikhova, Z. Z., Sokolova, R. B., Ponomareva, A. Z., Iusupova, D. V. (2001). Endonuclease from *Proteus mirabilis*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 37: 43–47.
9. Altermark, B., Helland, R., Moe, E., Willassen, N. P., Smalås, A.O. (2008). Structural adaptation of endonuclease I from the cold-adapted and halophilic bacterium *Vibrio salmonicida*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64: 368-76.
10. Robert, X., Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research.* 42: 320–324.
11. Benrezkallah, D., Dauchez, M., Krallafa, A. M. (2015). Molecular dynamics of the salt dependence of a cold adapted enzyme: Endonuclease I. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33: 2511-21.
12. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphic* 14, 33–38.

**Dynamique Moléculaire de l'Effet de la  
Température Sur la Paire d'Enzyme  
VsEndA et VcEndA**

Rapport-Gratuit.com

## 1. Introduction

La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants pour la vie, et la clarification des mécanismes d'adaptation à différentes conditions de température sont d'importance cruciale à la fois pour la recherche fondamentale <sup>[1-4]</sup>, ainsi que pour les applications industrielles qui visent à développer de nouveaux biocatalyseurs, actifs dans différentes gammes de températures <sup>[5, 6]</sup>.

La température affecte l'énergie cinétique des molécules, y compris celle des biomolécules tels que les protéines, leurs taux de collision et de réaction, la force des interactions moléculaires, et d'autres propriétés physico-chimiques. Les relations entre la température de croissance des organismes et les propriétés biophysiques de leurs protéines ont été intensivement explorées <sup>[7]</sup>.

L'effet le plus dominant de la température est sur la stabilité des protéines : les protéines se déplient (perdent leurs structures 3D distinctes) au-delà d'une certaine température (la température de fusion,  $T_m$ ). L'adaptation environnementale à des températures extrêmes a abouti à des enzymes avec des températures de fusion appropriées (par exemple, une grande stabilité configurationnelle globale). Cependant, par le paradigme en vigueur, l'adaptation de la température entraîne également de distincts profils vitesse-température de sorte que les enzymes présentent des vitesses maximales à la température de croissance d'organisme. Les enzymes thermophiles comprennent l'exemple le plus étudié. Elles sont fortement thermostables et exposent des vitesses maximales à des températures  $\geq 60^\circ\text{C}$  <sup>[8]</sup>. En accord avec leur haute stabilité configurationnelle, les enzymes thermophiles exposent un plus haut niveau d'emballage structurel <sup>[9, 10, 11]</sup> et une plus basse flexibilité configurationnelle par rapport aux enzymes mésophiles; enzymes d'organismes vivant à des températures modérées ( $20\text{-}45^\circ\text{C}$ ) <sup>[8-11]</sup>. Les enzymes psychrophiles, isolées à partir d'organismes adaptés à des environnements froids, comprennent l'autre extrême. Elles sont considérées comme très labiles en termes de stabilité configurationnelle et sont suffisamment flexibles près de  $0^\circ\text{C}$  <sup>[12-15]</sup>.

À leur température de fonctionnement respectives, les efficacités catalytiques (valeurs de  $k_{cat} / k_m$ ) des enzymes thermophiles, mésophiles, et des enzymes psychrophiles semblent similaires <sup>[16]</sup>. Ainsi, d'un point de vue évolutionnaire, chacune des trois classes des enzymes est tout autant compétente sur le plan métabolique, dans sa propre température physiologique opérationnelle.

La caractérisation fonctionnelle des protéines extrémophiles s'est jusqu'ici concentrée sur ce qui est évident, c'est-à-dire les effets de température sur les protéines thermophiles et les psychrophiles, et la salinité sur les protéines halophiles. Cependant, beaucoup d'environnements dans lesquels

prospèrent les extrêmophiles sont extrêmes à l'égard de plus qu'un seul paramètre. Par exemple, dans le domaine de la recherche des psychrophiles, la majorité d'enzymes étudiées jusqu'ici ont été extracellulaires et d'origine marine <sup>[17]</sup>, ce qui pose un problème quand aux conclusions qui doivent être tirées des mécanismes d'adaptation froide. Les ajustements observés sont-ils un résultat d'une vraie adaptation à la température basse, ou une combinaison d'une adaptation au sel et au froid?

Le choix des psychrophiles non-marins (d'eau douce) comme objectif d'étude est proposé comme solution <sup>[17]</sup>. L'interaction entre les deux types d'adaptation est, cependant, intéressante en soi, et il est possible de concevoir des expériences d'une manière qui facilite la séparation des deux effets. Les premiers pas vers cette approche ont été pris. Dans une étude comparative de l'Endonuclease I psychrophile marine et mésophile estuarienne (VsEndA et VcEndA, respectivement) <sup>[18]</sup>, les optimums différents de sel des deux enzymes ont été pris en considération quand les propriétés enzymatiques dépendantes de la température ont été caractérisées. Dans la discussion, les auteurs ont souligné l'importance des mesures effectuées dans les solutions tampons qui étaient aussi physiologiques que possibles.

La simulation de dynamique moléculaire est un outil approprié pour évaluer la base comparative de la thermostabilité des protéines homologues; psychrophiles et mésophiles. Cependant, seulement quelques études comparatives de dynamique moléculaire ont visé à évaluer la dépendance de la dynamique des protéines psychrophiles et mésophiles, vis-à-vis de la température, ont été entrepris <sup>[19, 20, 21]</sup>. En fait, à notre connaissance, aucune étude de dynamique moléculaire comparative traitant l'effet de température et sa combinaison avec l'effet de sel n'a été rapportée jusqu'à présent.

## 2. Objectif du chapitre

Pour assurer leur rôle et fonctionner correctement, les protéines exigent tant de flexibilité que de rigidité. La prédiction donc rapide et précise de la rigidité/flexibilité de la protéine est un des problèmes importants de la science des protéines.

Dans ce chapitre, et pour la première fois, nous avons entrepris des simulations de dynamique moléculaire de l'enzyme psychrophile VsEndA, et de son homologue mésophile VcEndA, dans lesquelles l'effet de température est combiné à l'effet de sel. Nos simulations sont menées à différentes valeurs de température, à savoir 276K, 300K, 318K et 326K. Dans le but de reproduire et de vérifier les résultats expérimentaux, chaque simulation est effectuée avec une concentration en sel (NaCl) optimale à l'activité de chaque enzyme ; 425mM pour VsEndA, et 175mM pour VcEndA, respectivement <sup>[18]</sup>.

### 3. Résultats

#### 3.1 Stabilité structurale globale

La figure 1.a et 1.b montre le rmsd calculé pour la partie squelette de l'enzyme psychrophile VsEndA et celui de l'enzyme mésophile VcEndA, par rapport aux structures initiales de simulation correspondantes, en fonction du temps et pour différentes valeurs de la température.

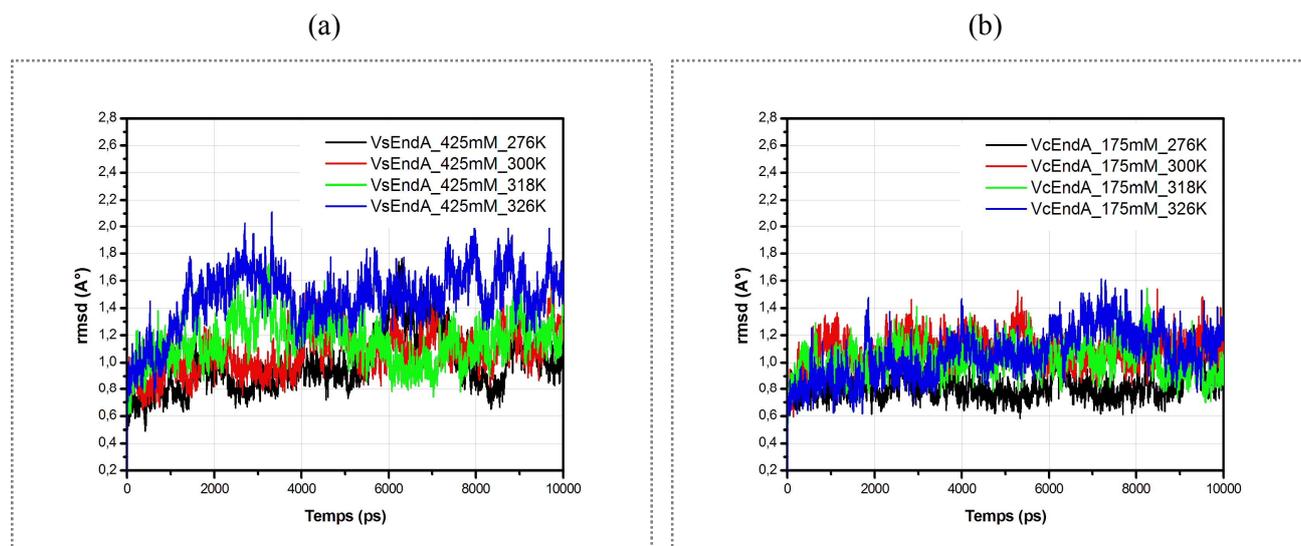


Figure1 : RMSD en fonction de la température, (a) VsEndA, (b) VcEndA.

D'une manière générale, on remarque que les valeurs du rmsd pour les deux protéines ne dépassent pas  $2.5 \text{ \AA}$ , traduisant ainsi des trajectoires de dynamique moléculaire assez stables. L'augmentation de la température n'influe pas vraiment le rmsd de l'enzyme mésophile (VcEndA) comme le montre a figure 1.b, surtout pour les valeurs de la température allant de 300 à 326K, avec des valeurs moyennes du rmsd assez proches :  $1.09$ ,  $1.02$  et  $1.06 \text{ \AA}$  pour les températures de 300, 318 et 326K, respectivement. Cependant, la courbe du rmsd la plus basse enregistrée correspond à la température 276K, elle fluctue autour d'une moyenne de  $0.82 \text{ \AA}$ . Les courbes du rmsd de VcEndA atteignent l'équilibre plus rapidement que celles de VsEndA, qui est au alentours de 2ns (Fig. 1a). L'enzyme VsEndA présente des valeurs du rmsd plus importantes que son homologue (VcEndA); notamment pour la température de 276, 318K et 326K ; où on a noté des valeurs moyennes de  $0.99$  et  $1.15$  et  $1.47 \text{ \AA}$ , respectivement. Cependant, pour la température de 300K, la valeur moyenne de VsEndA est inférieure à celle enregistrée pour VcEndA, et elle est de  $1.06 \text{ \AA}$ . En comparaison avec l'enzyme mésophile, les courbes du rmsd de l'enzyme psychrophile sont plus distinctes les unes aux autres, et le rmsd augmente avec la température pour atteindre une valeur moyenne maximale de  $1.47 \text{ \AA}$  pour la trajectoire de 326K.

Un autre paramètre reflétant les changements structuraux est le rayon de giration ( $R_g$ ) de la protéine, qui est une mesure de la compacité de la structure de la protéine. Les figures 2.a et 2.b montrent les rayons de girations des deux enzymes VsEndA et VcEndA, respectivement.

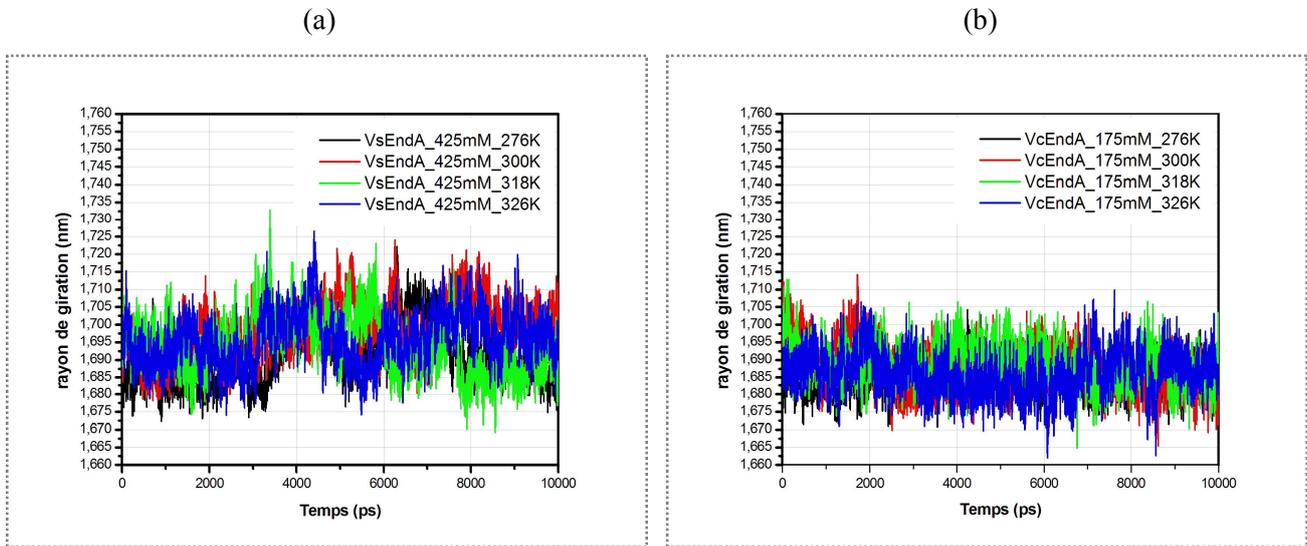


Figure 2 : rayon de giration en fonction de la température, (a) VsEndA, (b) VcEndA.

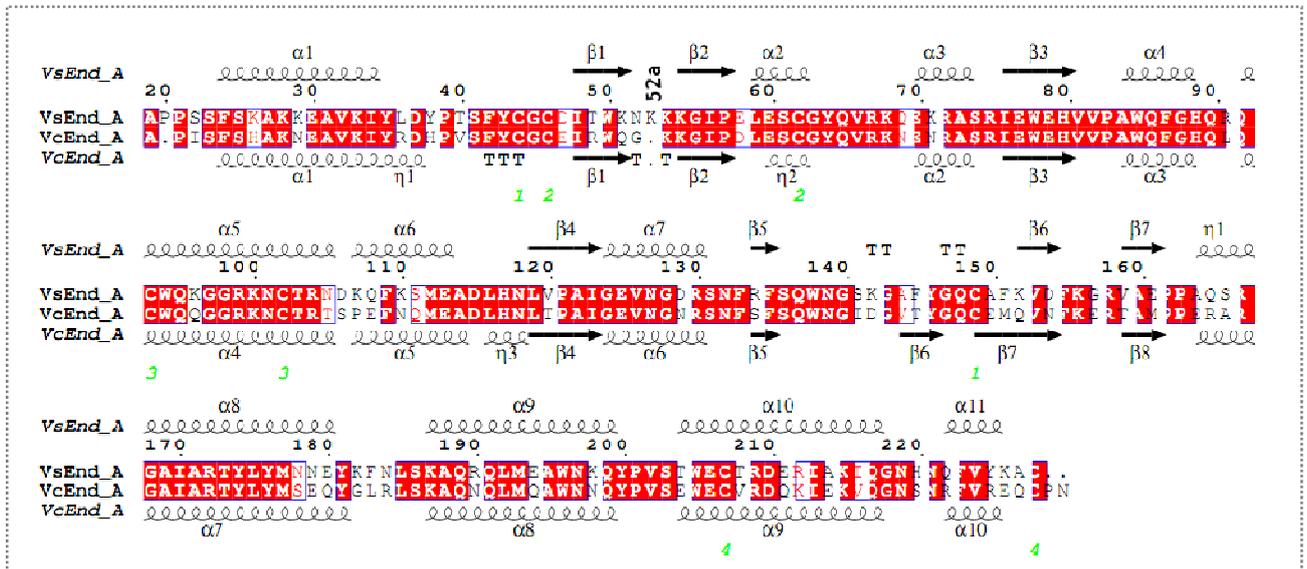


Figure 3 : Alignement des structures des enzymes VsEndA et VcEndA, utilisant le programme ESPrict 3.0<sup>[22]</sup>. Les nombres indiquent les cystéines impliquées dans les ponts disulfures.

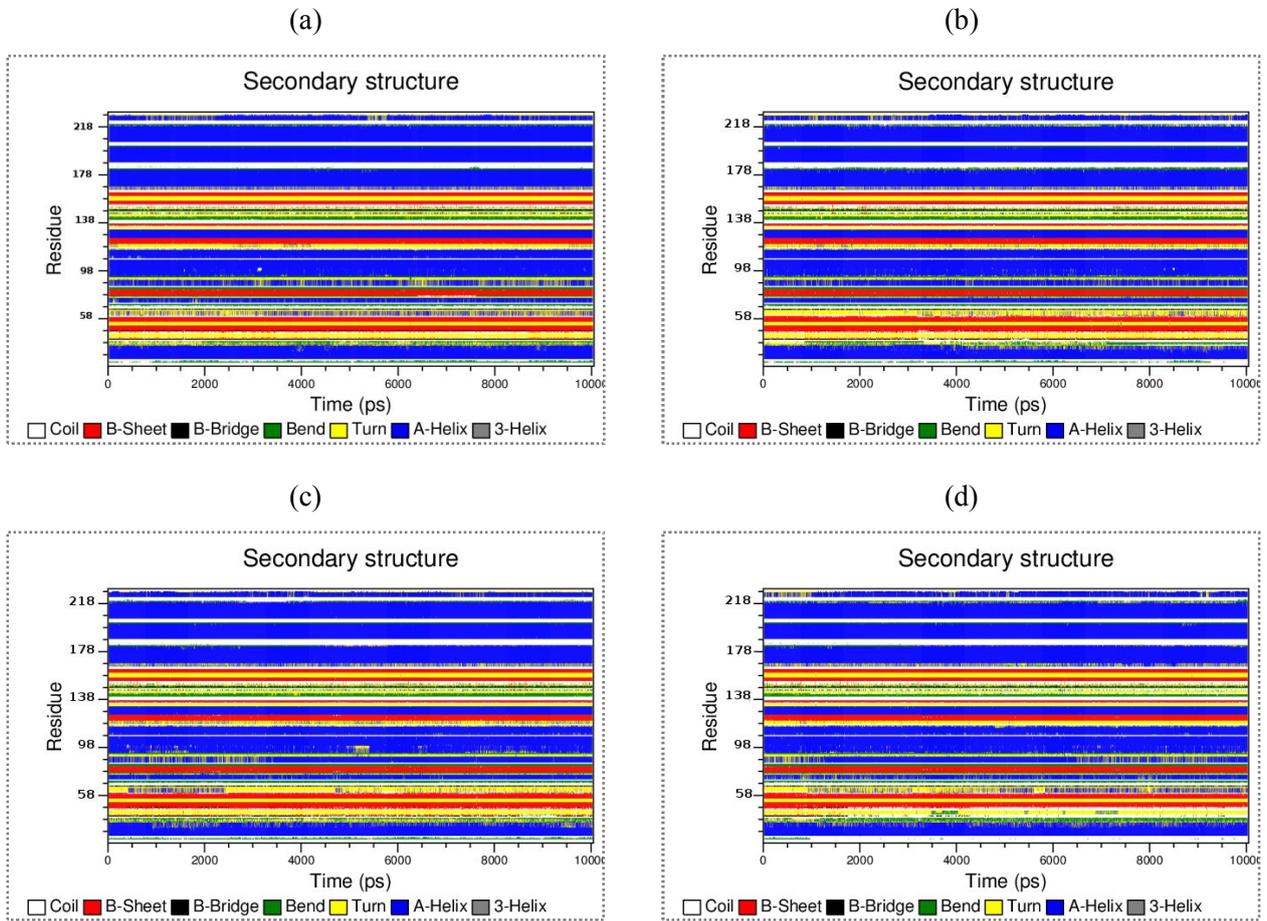


Figure 4 : Structure secondaire de VsEndA en fonction de la température ; a) 276K, b) 300K, c) 318K, d) 326K.

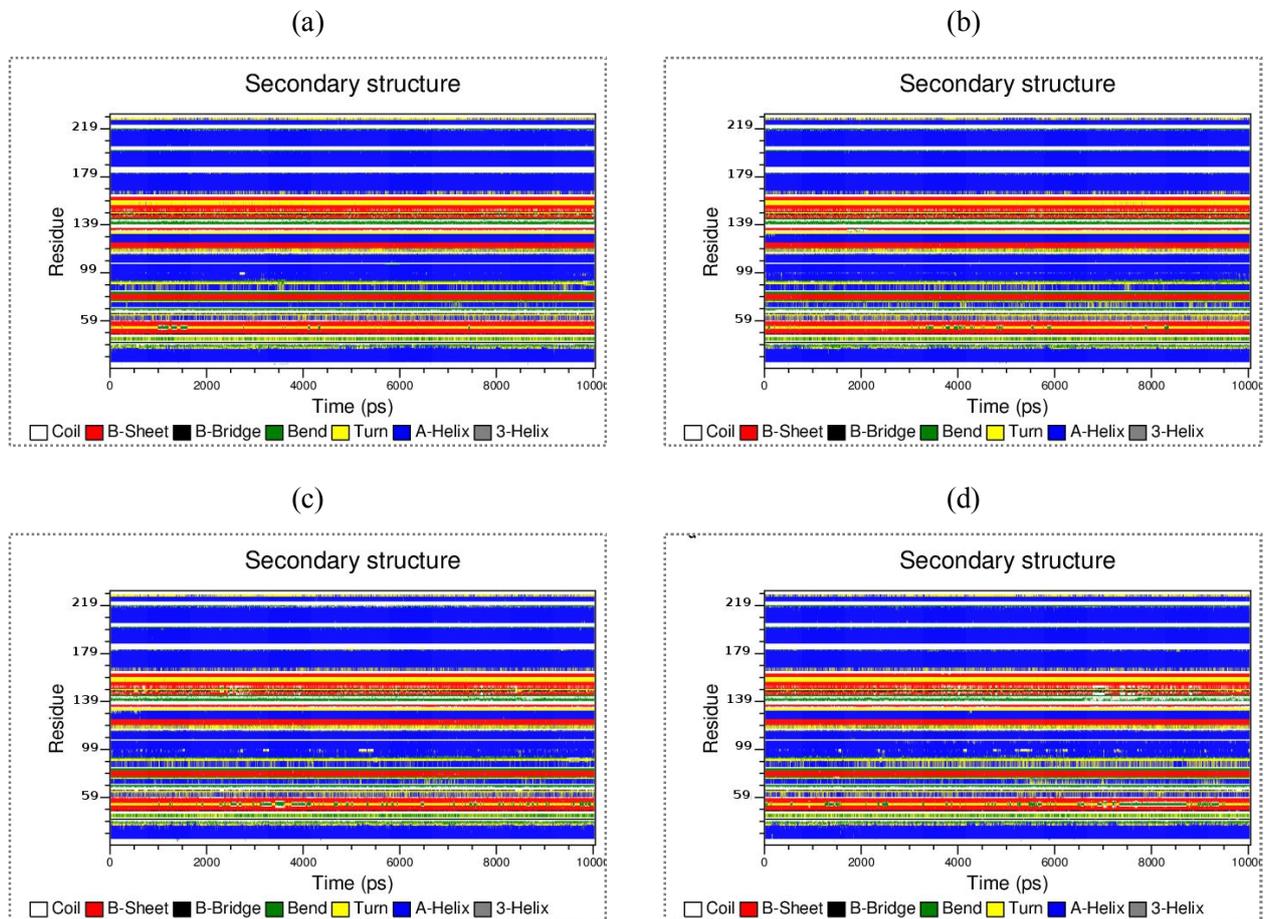


Figure 5 : Structure secondaire de VcEndA en fonction de la température ; a) 276K, b) 300K, c) 318K, d) 326K.

### 3.2 Flexibilité structurale

Une image plus détaillée de la différence de mobilité des résidus, aussi bien au sein de la même simulation, qu'entre deux enzymes homologues, peut être obtenue grâce au graphique du RMSF des atomes  $C_{\alpha}$  relatives à la structure moyenne de l'ensemble. De telles fluctuations ont été calculées pour les différentes valeurs de la température.

La figure 6 compare le rmsf des atomes  $C_{\alpha}$  dans un résidu, des deux enzymes ; psychrophile (VsEndA) et mésophile (VcEndA). Les régions de la protéine caractérisées par de larges valeurs du rmsf, sont généralement situées à des positions correspondantes dans VsEndA et VcEndA, quoique l'intensité des fluctuations soit souvent différente

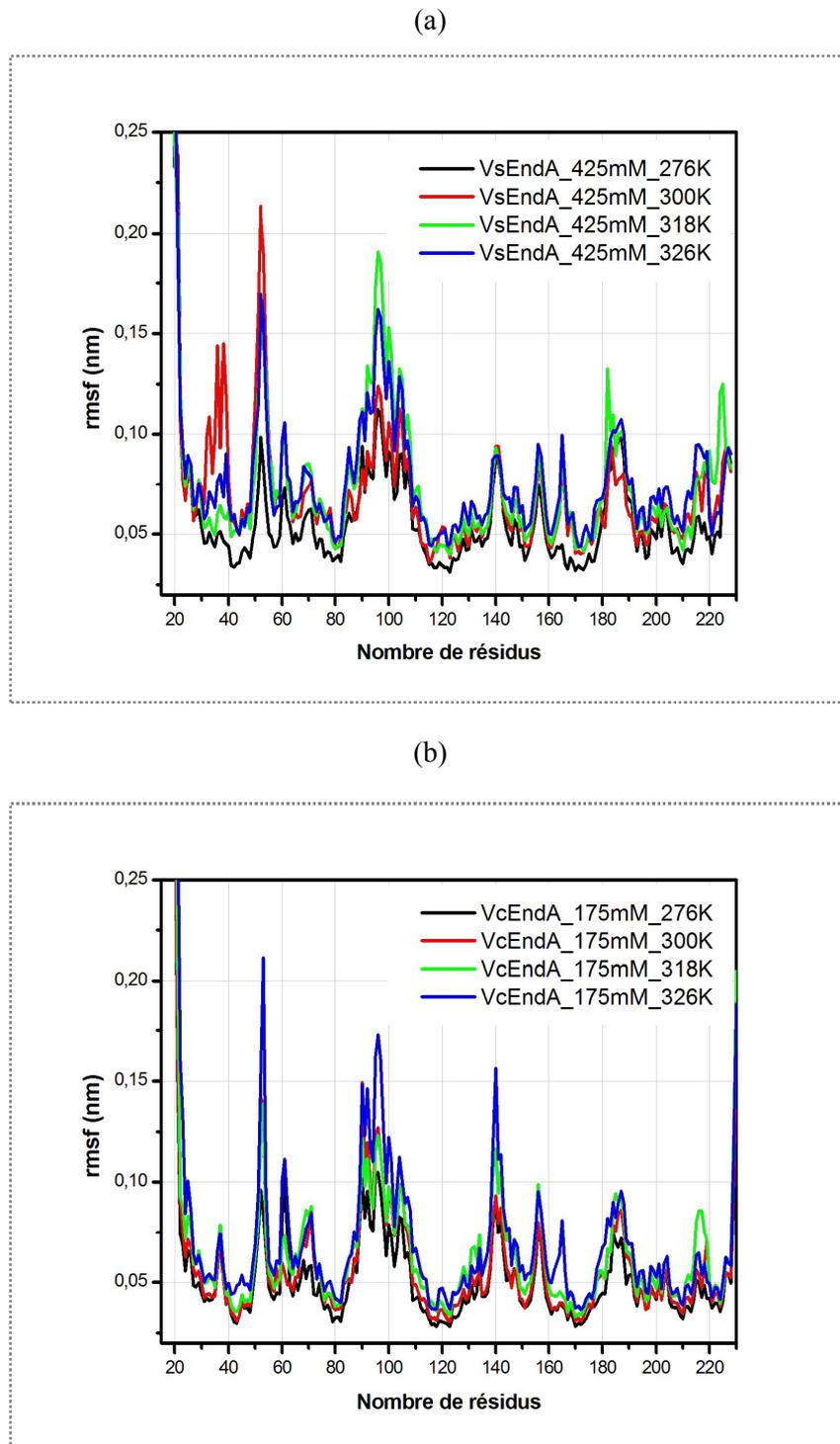


Figure 6 : rmsf en fonction de la température ; a) VsEndA, b) VcEndA.

L'analyse des valeurs du rmsf montre clairement l'importante flexibilité structurale de la région boucle (51-53), par rapport au reste de la structure des deux protéines (Fig. 6a et 6b). Et quand on compare la valeur maximale de la flexibilité de cette région boucle entre l'enzyme psychrophile et mésophile, on trouve des valeurs presque similaires du rmsf ; 0.2133 nm enregistrée pour le résidu ASN52 à la température  $T=300\text{K}$  pour VsEndA (Fig. 6a), et 0.2112 nm enregistrée pour le résidu

LYS53 à la température  $T=326\text{K}$ , pour son homologue VcEndA (Fig. 6b). Cette région de la protéine est d'une importance cruciale, puisqu'elle est proche du site de liaison à l'ADN de la structure de Vvn<sup>[23]</sup>, et peut donc potentiellement avoir un effet sur l'activité catalytique des deux enzymes.

Une autre région tout aussi bien importante que la première, et qui présente un rmsf très élevé pour les deux homologues, est la région (90-96). Appartenant au motif  $\alpha 5$  dans la structure secondaire des deux protéines (Fig. 3), et située à la proximité du site actif ARG99 ; la LYS96 a une valeur du rmsf égale à  $0.191\text{ nm}$  à  $T=318\text{K}$  (Fig. 6a), ce résidu est remplacé par le résidu polaire GLN96 dans la structure de VcEndA, avec la valeur la plus élevée du rmsf ( $0.1729\text{ nm}$ ) enregistrée pour  $T=326\text{K}$ , pour ce résidu (Fig. 6b).

Deux autres régions de l'enzyme VsEndA, où on a noté une plus grande flexibilité de l'enzyme pour la température de  $318\text{K}$ , sont les régions 182-184 et 224-225, successivement. Située dans une région boucle, entre deux motifs  $\alpha$  ( $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ ), la LYS182 atteint la valeur maximale du rmsf qui est égale à  $0.1324\text{ nm}$ . De plus, le rmsf du résidu polaire TYR225 qui est situé dans le motif  $\alpha 11$ , atteint la valeur de  $0.1248\text{ nm}$ , sous la même température  $318\text{K}$  (Fig. 6a).

La région boucle de VsEndA (36-38), est également caractérisée par une importante flexibilité enregistrée à  $T=300\text{K}$ , avec la plus grande valeur du rmsf observée pour le résidu polaire TYR38 ( $0.1451\text{ nm}$ ). En revanche, cette même région boucle de l'enzyme mésophile VcEndA, reste assez stable sous l'influence du changement de température, et ne montre pas de mobilité structurale.

Le profil du rmsf de l'enzyme VcEndA est marqué aussi par une augmentation de la flexibilité du résidu hydrophobe GLY140 à la température de  $326\text{K}$  ( $0.1564\text{ nm}$ ). Situé dans la région boucle entre deux feuillets  $\beta$  ( $\beta 5$  et  $\beta 6$ ), ce résidu est conservé dans la structure primaire de VsEndA, mais n'a pas d'influence sur la flexibilité de l'enzyme psychrophile.

Contrairement à l'enzyme mésophile où la flexibilité structurale est dominée par une seule température ; la plus haute étudiée ;  $326\text{K}$ , l'enzyme psychrophile montre un comportement différent vis à vis de l'effet de la température. Les températures dominantes sur la flexibilité structurale de cette enzyme sont plus basses que son homologue mésophile ; notamment  $300\text{K}$  et  $318\text{K}$ . De plus, elles touchent deux principales régions ; ASN52 et LYS96, avec des intensités du rmsf plus importantes que son homologue mésophile.

On a noté des flexibilités structurales comparables entre l'enzyme VsEndA et VcEndA pour la région boucle N-terminale, à différentes valeurs de la température. Cependant, la région C-terminale de l'enzyme VcEndA (Fig. 6b) montre une flexibilité plus prononcée que son homologue

VsEndA (Fig. 6a), pour la simple raison que la structure primaire de cette dernière se termine par le résidu CYS228 (Fig. 3) qui forme un pont disulfure avec le résidu CYS207, ce qui entrave sa flexibilité. Tandis que la structure primaire de VcEndA se termine par le résidu ASN230 (Fig. 3) ; qui est libre au bout de la chaîne polypeptidique de l'enzyme.

### 3.3 Fonctions de distribution radiales

Dans le but d'établir un lien entre l'effet de température sur la distribution des ions autour des régions caractérisées par de larges valeurs du rmsf (Fig. 6a et 6b), les fonctions de distribution radiales entre les ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  et les résidus les plus flexibles de la structure des deux enzymes ; VsEndA et VcEndA, sont présentées dans les figures 7-11 et 12-14, respectivement. Elles sont calculées pour les différentes valeurs de la température ; 276, 300, 318 et 326K.

#### 3.3.1 RDF de l'enzyme VsEndA

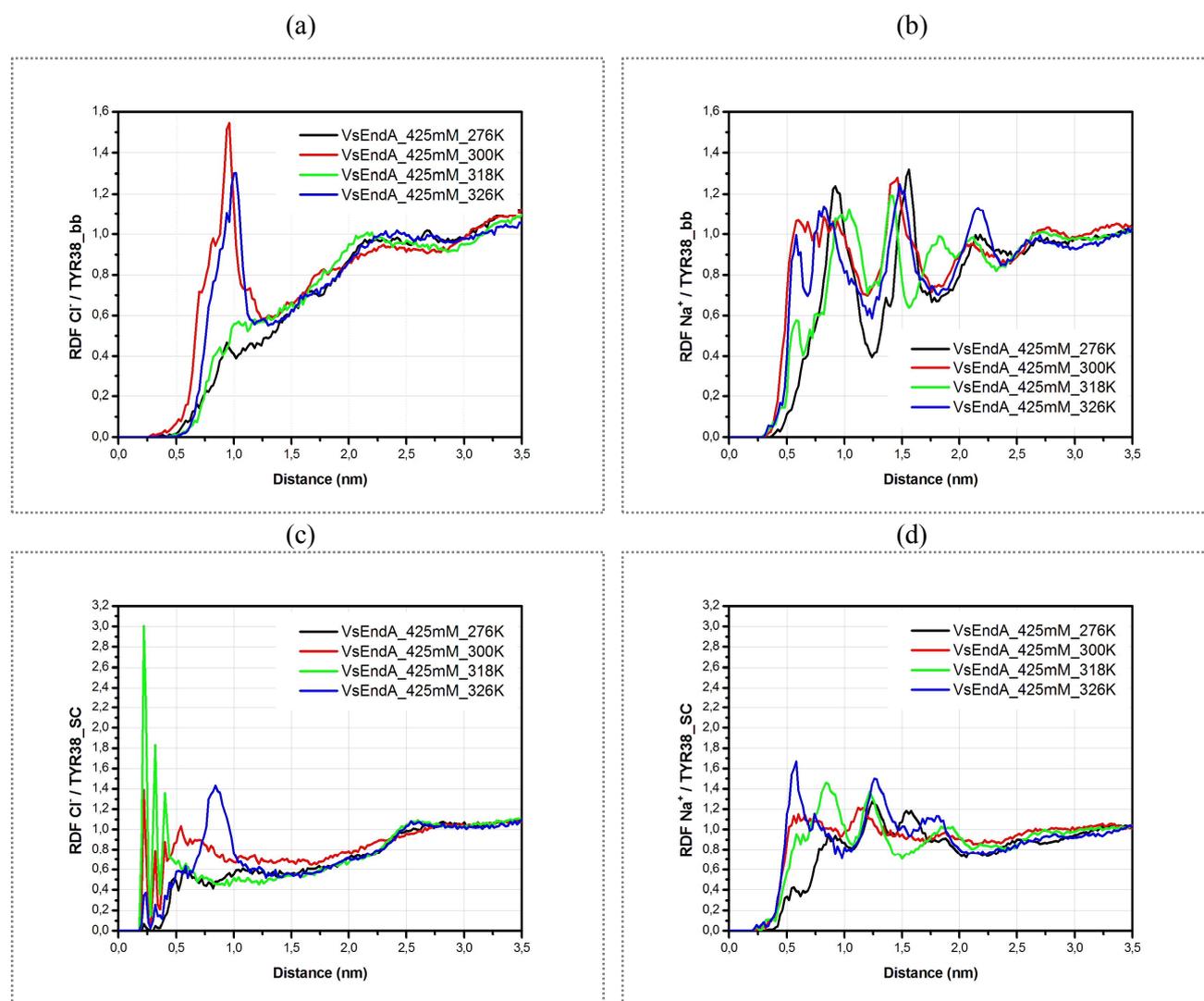


Figure 7 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de TYR38 en fonction de la température.

On remarque un large pic de la RDF de l'enzyme VsEndA situé à 0.956 nm, il est plus intense à T=300K, comparé aux autres températures, et il correspond à la distribution des ions  $\text{Cl}^-$  autour du squelette (\_bb) du résidu TYR38 (Fig. 7a). Cette même partie du résidu TYR38 est aussi bien marquée par l'accumulation des ions  $\text{Na}^+$  autour d'elle à T=300K, cependant, la différence avec les autres températures n'est pas vraiment frappante.

La RDF des ions  $\text{Cl}^-$  par rapport à la chaîne latérale (\_SC) de ce même résidu est caractérisée par trois pics plus intenses à T=318K (Fig. 7c); le premier pic se situe à 0.22 nm, traduisant ainsi un contact direct des ions chlorures avec cette partie de TYR38. De plus, on note une importante distribution des ions  $\text{Na}^+$  autour de cette même partie du résidu polaire à T=326K, avec un pic à 0.582 nm. Cependant, un deuxième pic tout aussi important que le premier, et qui se situe à 0.838 nm est enregistré à T=318K.

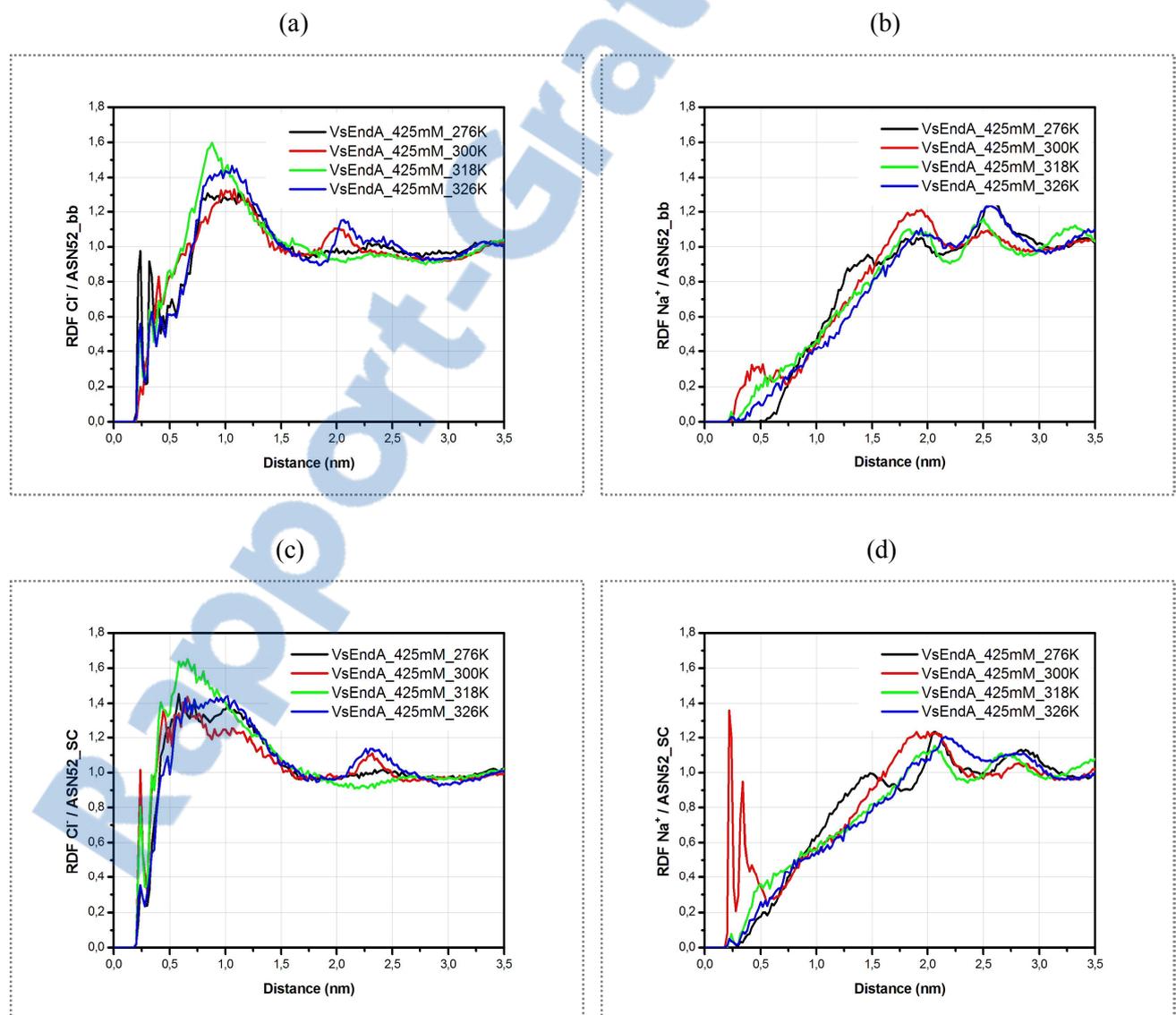


Figure 8 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de ASN52 en fonction de la température.

Le résidu polaire ASN52 qui présente les plus grandes valeurs du rmsf dans la structure de VsEndA pour toutes les températures étudiées, est considéré comme le résidu le plus flexible de la structure de l'enzyme. À T=300 K, il atteint la valeur la plus élevée du rmsf (Fig. 6a). Selon les graphiques de la fonction de distribution radiale, on observe une forte interaction des ions Na<sup>+</sup> avec sa partie (\_SC) à T=300K par rapport aux autres températures (Fig. 8d). De plus, la RDF Na<sup>+</sup>/ASN52\_SC présente deux pics bien distincts; le premier qui apparaît à 0.22 nm et qui traduit donc que les ions Na<sup>+</sup> se lient directement au (\_SC) de ASN52 à T=300K. Le deuxième pic se situe à 0.337 nm.

Les ions Cl<sup>-</sup> suivent également la même tendance, puisqu'ils s'associent aussi de près à ASN52\_SC à la même température (Fig. 8c). Par conséquent, d'un point de vue dynamique, la flexibilité structurale prononcée de cette région de l'enzyme à T=300K est causée par l'accumulation des deux ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> autour du (\_SC) polaire de ASN52.

Quoiqu'elle est faible comparée à la RDF Na<sup>+</sup>/ASN52\_SC, on doit noter une importante distribution à T=300K des ions Na<sup>+</sup> autour du (\_bb) de ce même résidu (Fig. 8b).

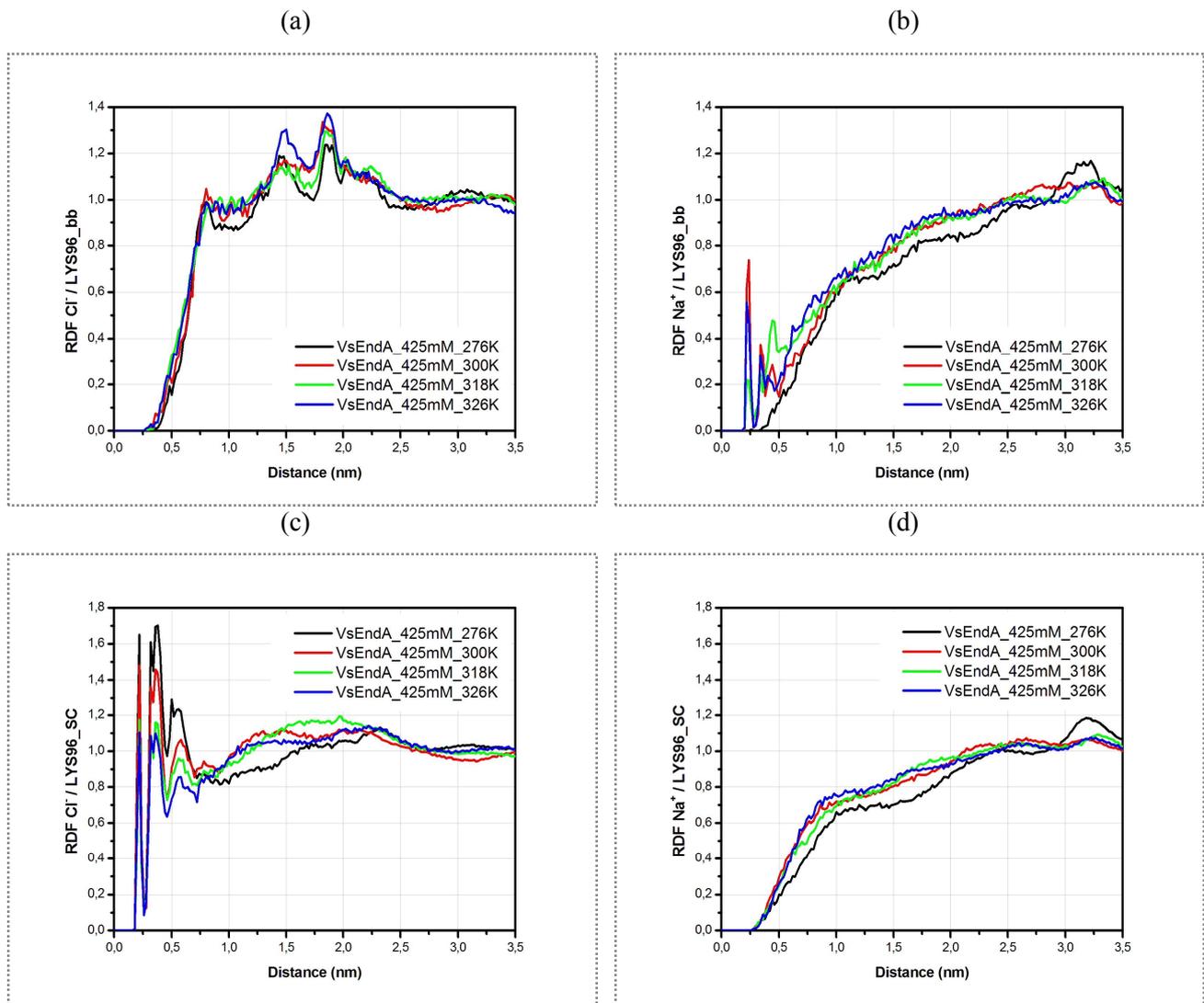


Figure 9 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de LYS96 en fonction de la température.

Les ions  $\text{Cl}^-$  s'associent plus au ( $\_SC$ ) de la LYS96 qu'à son ( $\_bb$ ) (Fig. 9a et 9c), de plus l'accumulation est d'autant plus importante pour les basses températures; 276 et 300K, (Fig. 9c). La situation inverse est observée concernant la distribution des ions  $\text{Na}^+$  autour de la LYS96, où on a une plus grande affinité de ces ions pour le ( $\_bb$ ) de la LYS96 (Fig. 9b), plutôt que pour son ( $\_SC$ ) (Fig. 9d).

Les ions  $\text{Na}^+$  sont en contact direct avec le ( $\_bb$ ) de la LYS96, puisque la RDF  $\text{Na}^+/\text{LYS96}$ , présente deux pics bien distincts, le premier à 0.241 nm et le second à 0.337 nm, et l'interaction entre ces ions et cette partie de la lysine est la plus importante à  $T=300\text{K}$ . Seulement, on doit bien noter un troisième pic dans cette même distribution radiale, situé à 0.444 nm avec la valeur la plus élevée pour  $T=318\text{K}$ .



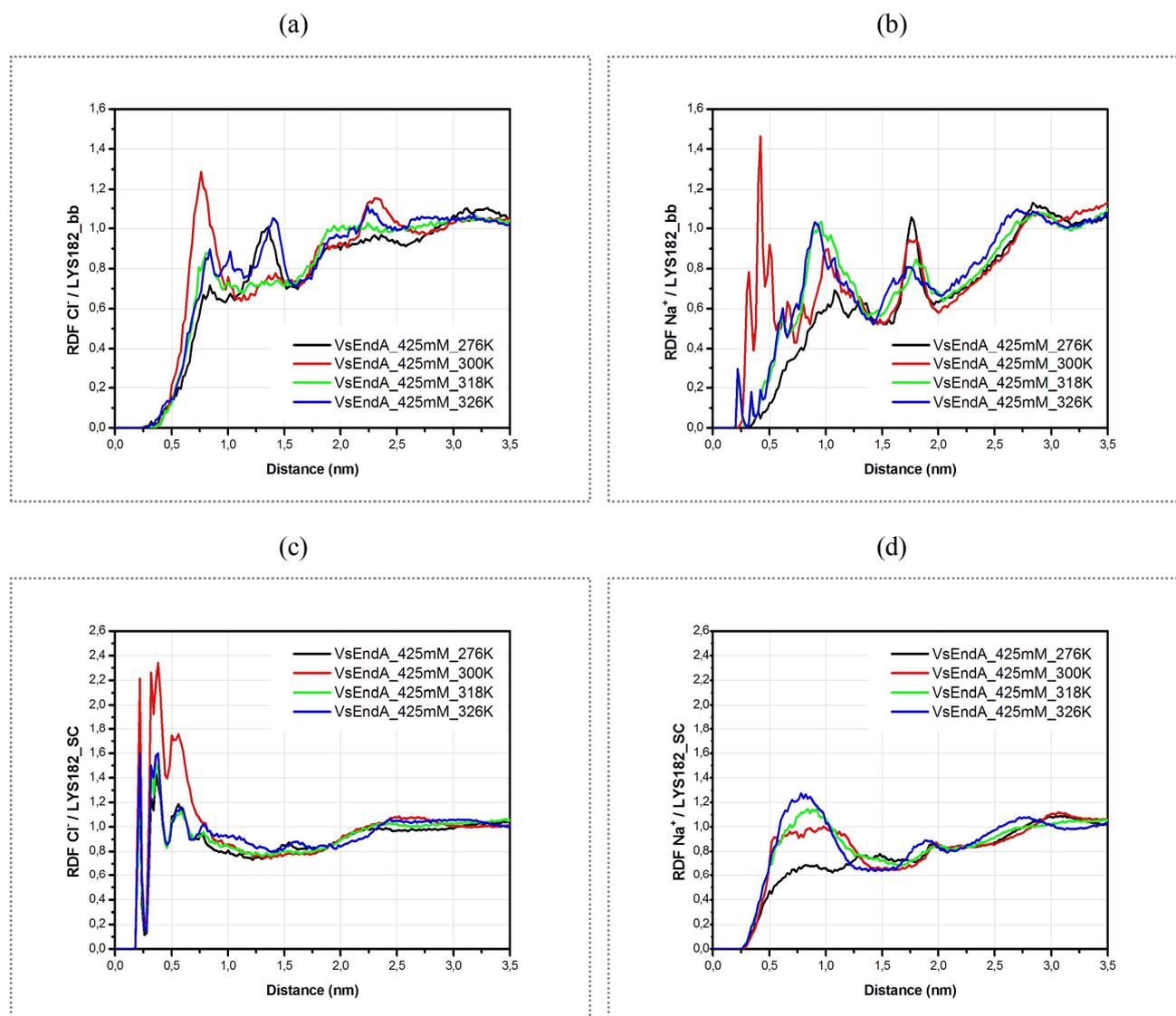


Figure 10 : RDF des ions Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> autour de LYS182 en fonction de la température.

Tout comme la LYS96, la partie (\_SC) de la LYS182 a plus d'interaction avec les Cl<sup>-</sup> que les Na<sup>+</sup> (Fig. 10c et 10d) ; notamment à T=300K. A la même température, les ions Cl<sup>-</sup> s'associent aussi au (\_bb) du même résidu, mais pas d'aussi près que le (\_SC), puisque le premier pic de la RDF Cl<sup>-</sup>/LYS182\_bb se situe à 0.764 nm (Fig. 10a), comparé au premier pic de la RDF Cl<sup>-</sup>/LYS182\_SC qui est à 0.22 nm, pour la même température (Fig. 10c).

La distribution des ions Na<sup>+</sup> autour du (\_bb) de la LYS182 est aussi affectée par la température de 300K, puisqu'on a enregistré trois pics successifs de la RDF plus intenses à cette température que les autres (Fig. 10b). Quoiqu'il soit peu intense, on doit noter le pic qui se situe à 0.22 nm enregistré pour T=326K.

L'affinité des ions Cl<sup>-</sup> pour le (\_SC) de TYR225 est presque la même pour les températures de 300, 318 et 326K, avec une légère augmentation pour T=300K (Fig. 11c). La même constatation est

notée pour la partie (\_bb) de ce même résidu, où on a une faible interaction des ions  $\text{Cl}^-$  avec cette dernière, à toutes les températures étudiées (Fig. 11a). Cependant, il faut bien noter que la plus forte des interactions ion-résidu discutée jusqu'à présent, est enregistrée pour la distribution des ions  $\text{Na}^+$  autour du (\_bb) de TYR225 (Fig. 11b). Les ions  $\text{Na}^+$  montrent une très grande affinité pour cette partie du résidu polaire, et elle est d'autant plus forte à  $T=326\text{K}$ , de plus le premier pic de la RDF se situe à 0.22 nm, indiquant ainsi une interaction de près. On observe aussi une claire accumulation des ions  $\text{Na}^+$  autour de la partie (\_SC) du résidu polaire, et elle est la plus élevée à la plus basse des températures étudiées ; 276K (Fig. 11d).

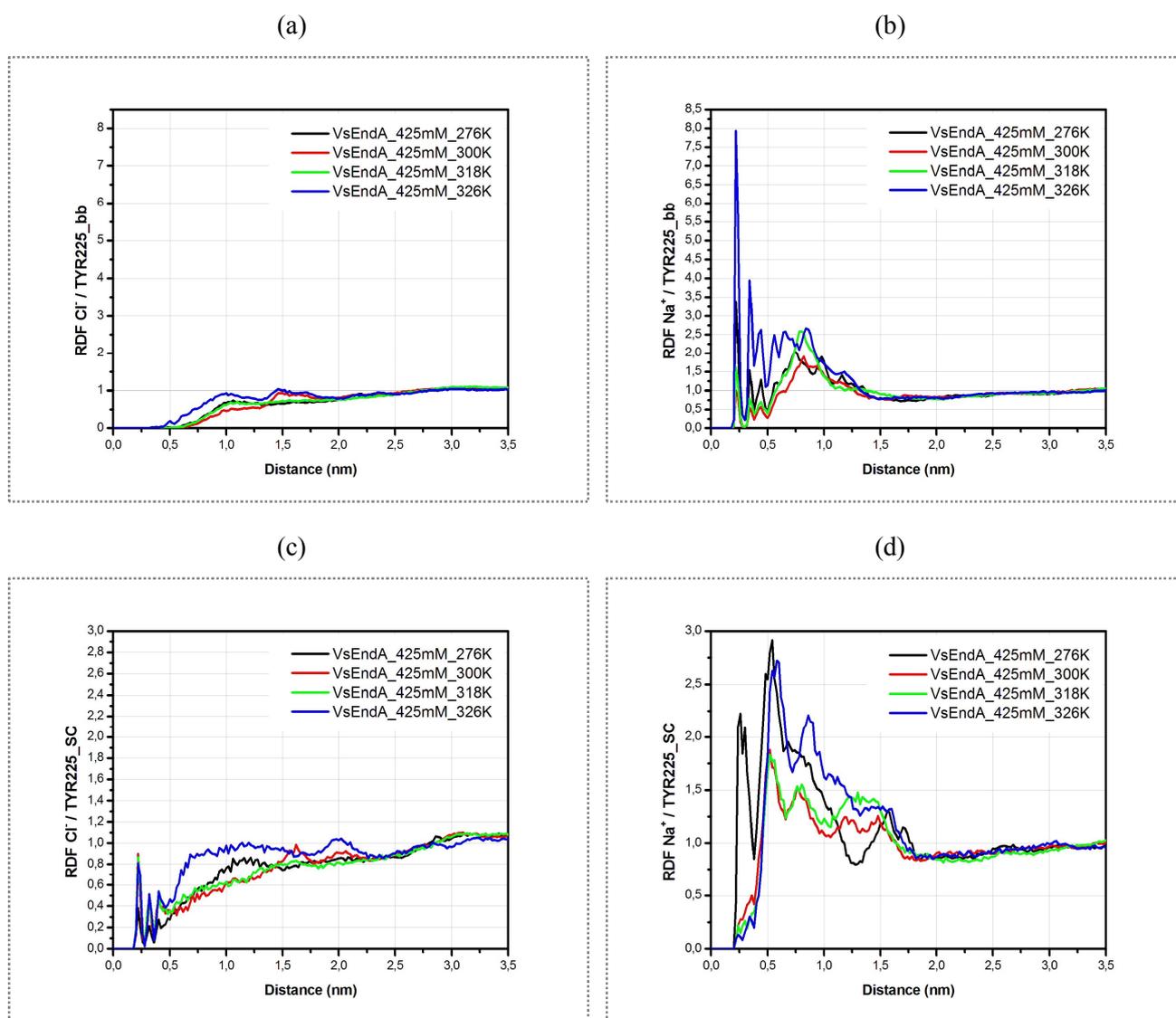


Figure 11 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de TYR225 en fonction de la température.

### 3.3.2 RDF de l'enzyme VcEndA

Les figures 12-14 présentent les RDF entre les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , et les résidus les plus flexibles de la structure de VcEndA, notamment ; LYS53, GLN96 et GLY140.

Contrairement aux ions  $\text{Na}^+$  qui s'accumulent peu autour de la LYS53 à  $T=326\text{K}$  (Fig. 12b et 12d), on observe une forte interaction entre les ions  $\text{Cl}^-$  et le résidu chargé positivement LYS53 à cette température, et spécifiquement avec la chaîne latérale ( $\_SC$ ) du même résidu, où on a noté un premier pic à 0.22 nm, traduisant ainsi une association directe de la chaîne latérale à charge positive de ce résidu et les ions  $\text{Cl}^-$ , à  $T = 326\text{K}$  (Fig. 12c).

La partie squelette ( $\_bb$ ) du même résidu est aussi caractérisée par l'accumulation des deux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  à  $T=326$ , seulement elle est plus intense avec les ions chlorure avec le premier pic de la RDF de  $\text{Cl}^-/\text{LYS53\_bb}$  qui apparait à 0.241 nm (Fig. 12a).

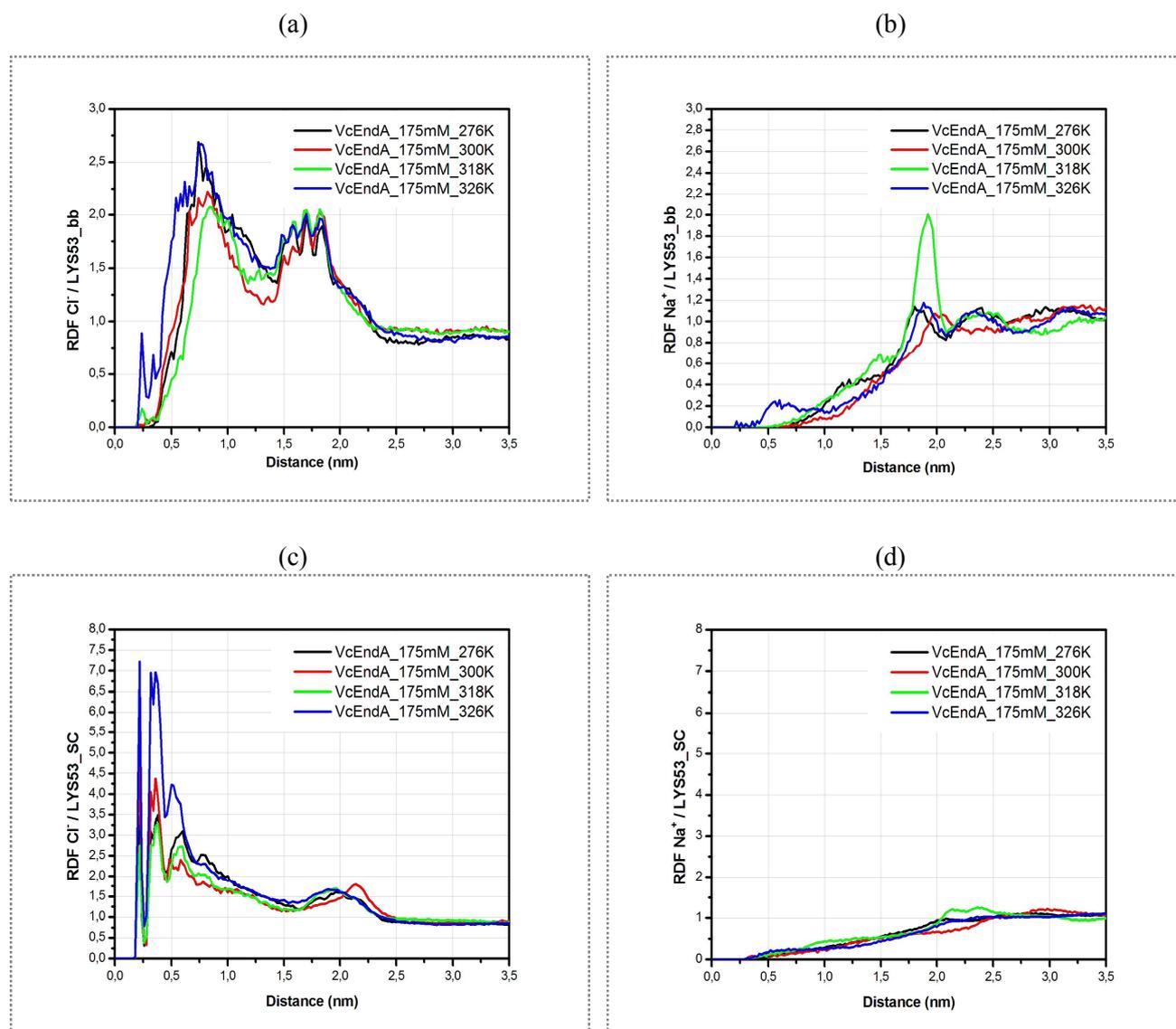


Figure 12 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de LYS53 en fonction de la température.

La distribution des ions  $\text{Cl}^-$  autour de GLN96 est presque similaire à toutes les températures étudiées, que ce soit pour la partie squelette ( $\_bb$ ) ou bien chaîne latérale ( $\_SC$ ), où on n'a pas observé d'importante accumulation (Fig. 13a et 13c). Cependant, les ions  $\text{Na}^+$  ne suivent pas cette même tendance, puisque l'interaction des ions  $\text{Na}^+$  avec le ( $\_bb$ ) de GLN96 est plus forte à  $T=326\text{K}$ , comparée aux autres températures (Fig. 13b), et l'interaction de ces ions avec le ( $\_SC$ ) du même résidu est plus importante à  $T=318\text{K}$  (Fig. 13d).

Une exception intéressante est observée pour cette enzyme mésophile pour le résidu hydrophobe GLY140, pour lequel ni la distribution des  $\text{Cl}^-$  ni celle des  $\text{Na}^+$  n'est la plus élevée à

T=326K (Fig. 14a et 14b). En effet, les ions  $\text{Na}^+$  ont plus d'affinité au résidu GLY140 à T=318K. Tandis que les ions  $\text{Cl}^-$  s'accablent plus autour du même résidu à T=300K

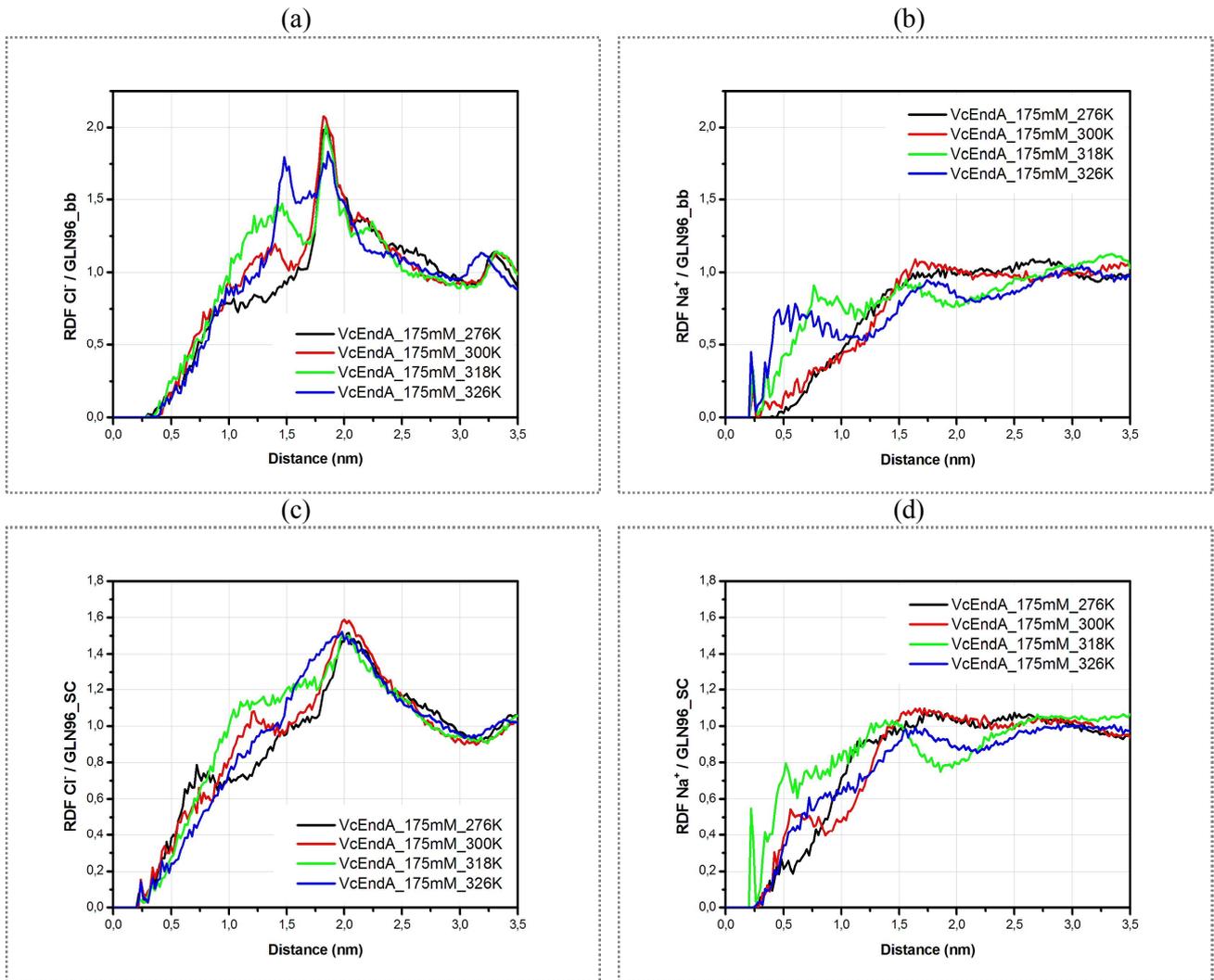


Figure 13 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de Gln96 en fonction de la température.

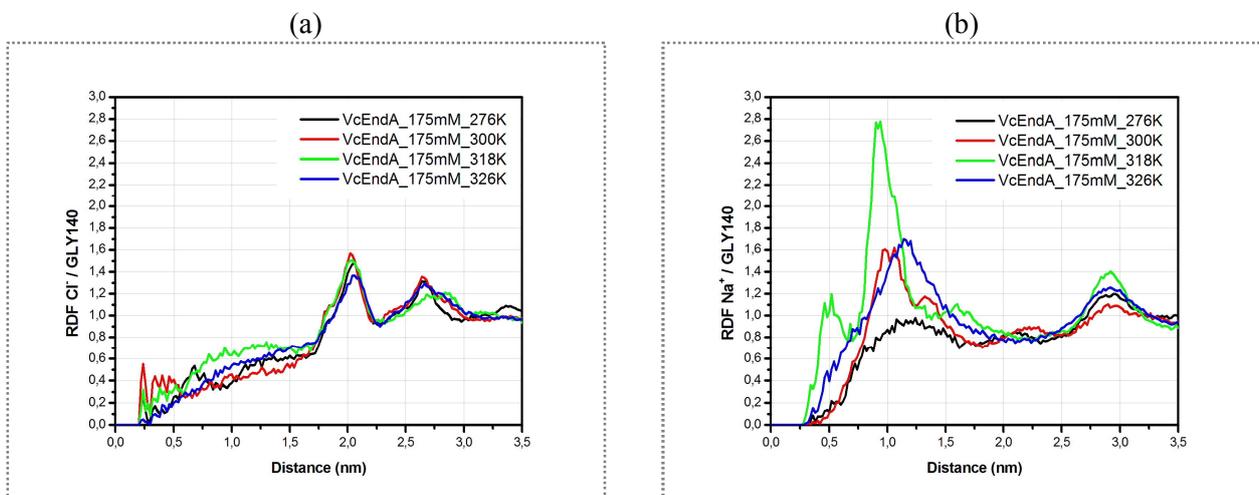


Figure 14 : RDF des ions  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  autour de Gly140 en fonction de la température.

### 3.4 Durée de vie des liaisons hydrogène

#### 3.4.1 L'enzyme psychrophile VsEndA

Les durées de vie des liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires calculées pour les résidus les plus flexibles de l'enzyme psychrophile VsEndA;TYR38, ASN52, LYS96, LYS182 et TYR225, en fonction de la température, sont regroupées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Durée de vie des liaisons hydrogènes (ps) pour l'enzyme VsEndA en fonction de la température.

	Vs_425mM_276K	Vs_425mM_300K	Vs_425mM_318K	Vs_425mM_326K
Tyr38_bb_Wat	24.504	<b>4.664</b>	-66.291	5.167
Tyr38_SC_Wat	5.136	4.480	2.312	2.503
Tyr38_bb_P	87.630	357.496	382.376	42.699
Tyr38_SC_P	aucune	38.040	aucune	Aucune
Asn52_bb_Wat	3.938	<b>2.636</b>	8.453	2.644
Asn52_SC_Wat	2.568	1.832	1.300	0.989
Asn52_bb_P	aucune	97.119	aucune	Aucune
Asn52_SC_P	aucune	130.661	9.132	-93.1
Lys96_bb_Wat	1.675	1.488	1.046	0.918
Lys96_SC_Wat	5.849	3.092	2.069	1.665
Lys96_bb_P	50.979	59.337	90.849	19.532
Lys96_SC_P	31.262	19.126	<b>17.477</b>	21.534
Lys182_bb_Wat	13.875	121.496	-16.277	2.157
Lys182_SC_Wat	4.317	2.903	<b>1.743</b>	<b>1.677</b>
Lys182_bb_P	199.917	226.472	79.354	37.415
Lys182_SC_P	-11.894	15.507	797.646	76.648
Tyr225_bb_Wat	20.737	7.027	<b>3.549</b>	<b>3.436</b>
Tyr225_SC_Wat	2.590	1.851	1.542	1.368
Tyr225_bb_P	854.846	401.057	775.720	159.523
Tyr225_SC_P	198.984	103.911	510.568	2.001

Les résidus les plus flexibles de l'enzyme VsEndA à T=300 K, comparé aux autres températures, et qui sont TYR38 et ASN52 (Fig. 6a) présentent les plus basses valeurs des durées de vie des liaisons hydrogène, entre les molécules d'eau environnantes et la partie squelette ( $\_bb$ ) des résidus en question, sous la même température ; 4.664 et 2.636 ps respectivement (tableau 1). Ceci, est en bon accord, d'un coté avec le profile de la flexibilité de l'enzyme (Fig. 6a), et d'un autre coté, l'importante accumulation des ions  $Cl^-$  et  $Na^+$  autour des squelettes des résidus considérés, révélée par les fonctions de distribution radiales à T=300K (Fig. 7a, 7b et 8b), interrompt la dynamique et la cinétique des liaisons hydrogènes susceptibles de se former avec l'eau, d'où une diminution des durées de vie enregistrées à cette température.

Les plus petites valeurs des durées de vie des liaisons hydrogène formées avec la partie squelette ( $\_bb$ ) de la LYS96 et l'eau sont enregistrées pour les températures les plus élevées ; 318 et 326 K ; 1.046 et 0.918 ps, respectivement. Ce résultat des durées de vie rejoint parfaitement le profile du rmsf en fonction des températures (Fig. 6a) où les valeurs du rmsf sont les plus élevées ; 0.191 et 0.161 nm, pour la température de 318 et 326K, respectivement. Quoique l'écart entre les deux valeurs des durées de vie à T=318 et T=326 K est relativement faible, la plus basse valeur enregistrée à T=326 K ; 0.918 ps est due à la diffusion des molécules d'eau entourant le squelette de la lysine, qui augmente avec la température.

Le rôle de la dynamique du solvant dans la relaxation structurale des protéines globulaires a déjà été étudié au niveau microscopique. Les résultats de la dynamique moléculaire de la protéine globulaire Ribonucléase A (RNase), établissent fermement une corrélation entre la mobilité des molécules d'eau sur la surface de la protéine et les mouvements diffusifs de cette dernière <sup>[24]</sup>. La relaxation structurale complète nécessite une relaxation du réseau des liaisons hydrogène à travers le déplacement translationnel des molécules d'eau, ceci est d'autant plus important avec l'élévation de la température, où on a noté des durées de vie des liaisons H plus courtes.

La même explication est donnée en ce qui concerne la chaîne latérale ( $\_SC$ ) de LYS96 qui forme des liaisons hydrogène de courtes durée avec l'eau à T=326K. La durée de vie des liaisons hydrogène entre la protéine et la chaîne latérale de LYS96 est relativement faible à 318K, par rapport aux autres températures, ce qui porte à croire que de même que les liaisons hydrogène intermoléculaires formées avec l'eau, les liaisons hydrogènes intramoléculaires peuvent aussi influencer la dynamique de la protéine.

Les deux résidus LYS182 et TYR225 sont caractérisés par de courtes durées des liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires à T=326K, comparées aux autres températures. L'importante accumulation des ions  $Na^+$  autour du squelette de ces deux résidus (Fig. 10b et 11b) à

T=326K est d'une partie responsable de la baisse des durées de vie formées avec les molécules d'eau ; 2.157 et 3.436 ps, pour LYS182 et TYR225, respectivement (tableau 1).

Cependant, on voit bien que les durées de vie enregistrées à T=318K entre la chaîne latérale de LYS182 et l'eau ; 1.743 ps, et entre le squelette de TYR225 et l'eau ; 3.549 ps, sont relativement proches de celles enregistrées à T=326K, ce qui permet de conclure que les durées de vie des liaisons hydrogène calculées pour les régions les plus flexibles de l'enzyme VcEndA est en corrélation avec le profil du rmsf de la même enzyme.

### 3.4.2 L'enzyme mésophile VcEndA

Le tableau 2 regroupe les durées de vie des liaisons hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires formées avec les résidus les plus flexibles de l'enzyme mésophile VcEndA ; LYS53, GLN96 et GLY140, pour les différentes valeurs de la température.

Tableau 2 : Durée de vie des liaisons hydrogènes (ps) pour l'enzyme VcEndA en fonction de la température.

	Vc_175mM_276K	Vc_175mM_300K	Vc_175mM_318K	Vc_175mM_326K
Lys53_bb_Wat	7.786	16.241	7.691	<b>5.408</b>
Lys53_SC_Wat	4.362	3.471	1.906	<b>1.878</b>
Lys53_bb_P	aucune	-2748.665	37.428	25.194
Lys53_SC_P	79.268	101.087	80.117	96.125
Gln96_bb_Wat	2.043	1.637	<b>0.936</b>	<b>0.937</b>
Gln96_SC_Wat	1.846	1.293	0.821	<b>0.559</b>
Gln96_bb_P	144.256	504.247	30.880	96.679
Gln96_SC_P	143.457	71.147	37.072	<b>22.270</b>
Gly140_Wat	8.630	9.920	3.771	<b>1.400</b>
Gly140_P	aucune	aucune	-93.416	0.001

On remarque bien, d'après le tableau 2 que les liaisons hydrogène formées entre les résidus considérés et les molécules d'eau sont les plus courtes à T=326K, comparées aux autres valeurs de la température. Ce qui est expliqué par l'importante diffusion des molécules d'eau sur la surface de l'enzyme mésophile, à la plus haute température étudiée ; 326K.

En parallèle, on doit également souligner l'effet des ions sur la dynamique des liaisons hydrogène. Par exemple, le résultat de la RDF de la LYS53 révèle une accumulation des deux types d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  autour de la partie squelette du résidu considéré à T=326 K (Fig. 12a et 12b), et

celle des ions Cl<sup>-</sup> seulement autour de la partie chaîne latérale (Fig. 12c), pour la même température. La dynamique des liaisons hydrogène du résidu polaire GLN96 est aussi affectée par la position des ions, puisqu'on a noté une importante accumulation des ions Na<sup>+</sup> autour du squelette du résidu considéré à T=326 K (Fig. 13b).

## 4. Conclusion

L'influence omniprésente de la température sur les systèmes biologiques nécessite une série d'adaptations thermiques compensatoires qui couvrent tous les niveaux des organisations biologiques; du comportement à la structure moléculaire à petite échelle. Il est cependant d'intérêt de comprendre les mécanismes moléculaires de l'adaptation à la température des enzymes contemporaines.

Dans un premier pas vers cet objectif, nous avons entrepris dans ce chapitre l'effet de température sur la paire d'enzyme homologues ; l'enzyme adaptée au froid *Vibrio Salmonicida* VsEndA et l'enzyme mésophile *Vibrio cholerae* VcEndA. Les simulations de dynamique moléculaire à différentes températures, sont effectuées aux conditions optimales en sel (NaCl) pour chaque enzyme, tel que l'étude expérimentale déjà effectuée sur la paire d'enzyme <sup>[18]</sup>. L'analyse structurale, en terme de RMSD, rayon de giration et structure secondaire de ces deux enzymes révèlent des trajectoires stables aux températures considérées ; 276, 300, 318 et 326K. Les profils du rmsf des deux enzymes sont similaires, avec les résidus les plus flexibles des deux homologues qui apparaissent aux régions boucles qui sont identiques dans la structure primaire des deux enzymes ; résidus 52-53 et 96. Cependant, l'effet de température n'est pas le même pour ces régions considérées. L'enzyme adaptée au froid présente une flexibilité structurale plus importante à des températures plus basse (300 et 318 K) comparé à l'enzyme mésophile, où la température qui présente la plus grande flexibilité est la plus élevée étudiée (326K). On a pu trouver une corrélation entre la position des ions et la flexibilité structurale de seulement TYR38 et ASN52 pour l'enzyme psychrophile, et LYS53 et GLN96 pour l'enzyme mésophile. Cependant, les durées de vie des liaisons hydrogènes de presque la totalité des résidus les plus flexibles des deux enzymes, corrèlent bien avec le profile du rmsf de l'enzyme considérée.

## 5. Références bibliographiques

1. D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life, *EMBO Rep.* 7: 385-389.
2. Muga, A., Moro, F. (2008). Thermal adaptation of heat shock proteins. *Curr. Protein PeptSci* 9: 552-566.
3. Somero, G. N. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic strategies. *Comp. Biochem. and Physiol. B* 139: 321-333.
4. Trivedi, S., Gehlot, H. S., Rao, S. R. (2006). Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet. Mol. Res.* 5: 816-827.
5. Daniel, R. M., Danson, M. J., Eienthal, R., Lee, C. K., Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. *Extremophiles*, 12: 51-59.
6. Schiraldi, C., De Rosa, M. (2002). The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles, *Trends Biotechnol.* 20: 515-521.
7. Chiuri, R., et al. (2009). Exploring local flexibility/rigidity in psychrophilic and mesophilic carbonic anhydrases. *Biophys. J.* 96: 1586–1596.
8. Li, W. F., et al. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnol. Adv.* 23: 271–281.
9. Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1–43.
10. Sterner, R., Liebl, W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36: 39–106.
11. Del Vecchio, P., et al. (2009). Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus Solfataricus*. *Extremophiles* 13: 461–470.
12. Feller, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *J. Phys. Condens. Matter* 22: 323101.
13. Feller, G., Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 200–208.
14. Chiuri, R., et al (2009). Exploring local flexibility/rigidity in psychrophilic and mesophilic carbonic anhydrases. *Biophys. J.* 96: 1586–1596.
15. Liang, Z. X., et al. (2004). Evidence for increased local flexibility in psychrophilic alcohol dehydrogenase relative to its thermophilic homologue. *Biochemistry* 43: 14676–14683.
16. Georgette, D., et al. (2003). Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J. Biol. Chem.* 278: 37015–37023.
17. Siddiqui, K. S., Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 403–433.
18. Altermark, B., Niiranen, L., Willassen, N. P., Smalas, A. O., Moe, E. (2007). Comparative studies of endonuclease I from cold-adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 274: 252–263.



19. Papaleo, E., Riccardi, L., Villa, C., Fantucci, P., De Gioia, L. (2006). Flexibility and enzymatic cold-adaptation: A comparative molecular dynamics investigation of the elastase family, *Biochimica et Biophysica Acta* 1764: 1397–1406.
20. Spiwok, V., Lipovova, P., Skalova, T., Duskova, J., Dohnalek, J., Hasek, J., Russell, N. J. J., Kralova, B. (2007). *Mol Model* 13: 485–497.
21. Kundu, S., Roy, D. (2009). Comparative structural studies of psychrophilic and mesophilic protein homologues by molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 27: 871-880.
22. Robert, X., Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*. 42: 320–324.
23. Li, C. L., Hor, L. I., Chang, Z. F., Tsai, L. C., Yang, W. Z., Yuan, H. S. (2003). DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J.* 22: 4014–4025.
24. Tarek, M., Tobias, D. J. (2002). Role of Protein-Water Hydrogen Bond Dynamics in the Protein Dynamical Transition. *Phys. Rev. Lett.* 88: 138101-4.

## **Conclusion Générale**

Nous avons effectué des simulations de dynamique moléculaire avec un traitement explicite du solvant et du sel, sur une paire d'enzyme Endonucléase I ; *Vibrio Salmonicida* et *Vibrio Cholerae*, à fin d'étudier leur propriétés structurales, et par la suite fournir plus d'informations sur leur activité catalytique. Nous avons étudié plus particulièrement deux facteurs importants pouvant influencer l'activité catalytique de l'enzyme ; la température et la concentration en sel NaCl.

*A propos de l'enzyme adaptée au froid Vibrio Salmonicida Endonucléase I*

la localisation péri plasmique ou extracellulaire de cette enzyme lui permet de s'adapter aux concentrations élevées en sel NaCl (par rapport à son homologue mésophile) par l'augmentation du nombre des résidus positivement chargés sur la surface de l'enzyme.

Le profile du rmsf de cette enzyme obtenu par l'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire sous différentes concentrations en sel, présente deux régions boucles caractérisées par une flexibilité plus prononcée à 425 mM ; la concentration optimale pour l'activité catalytique révélée par l'étude expérimentale sur la même enzyme. Nous avons mis en évidence grâce à l'analyse des fonctions de distribution radiales une corrélation entre le profile du rmsf et la position des ions étudiés, puisque l'accumulation de près des ions  $\text{Cl}^-$  et/ou  $\text{Na}^+$  autour des résidus polaires les plus flexibles de l'enzyme psychrophile, est responsable de la singularité dans le profile du rmsf de la même enzyme.

Nous avons effectué également une série de simulations de dynamique moléculaire sous différentes températures, en gardant la concentration en sel fixe et égale à la concentration optimale à l'activité catalytique ; 425mM, et ceci dans le but précis d'élucider l'effet de la température sur l'enzyme. Cependant, le découplage des deux effets ; l'effet de sel, de celui de la température, n'est pas une tâche facile. L'analyse des fonctions de distribution radiales de l'enzyme psychrophile, indique une importante accumulation des ions  $\text{Cl}^-$  et/ou  $\text{Na}^+$  autour des résidus les plus flexibles à  $T=300\text{K}$  (TYR38 et ASN52). Cependant, nous n'avons noté aucune interaction entre ces ions et les résidus les plus flexibles à  $T=318\text{K}$  (LYS96, LYS182 et TYR225). Par ailleurs, les durées de vie des liaisons hydrogènes formées entre ces résidus et les molécules d'eau sont les plus courtes enregistrées à  $T=318\text{K}$ . Ce qui est dû en partie à la plus grande diffusion des molécules d'eau entourant ces résidus chargés ou polaires sous cette température.

*A propos de l'enzyme mésophile Vibrio Cholerae Endonucléase I*

L'étude de l'effet de sel que nous avons effectué sur l'enzyme mésophile a montré que tout comme son homologue, l'enzyme mésophile VcEndA présente un rmsf marqué par la flexibilité structurale élevées des régions boucles sous la concentration en sel optimale à l'activité de cette

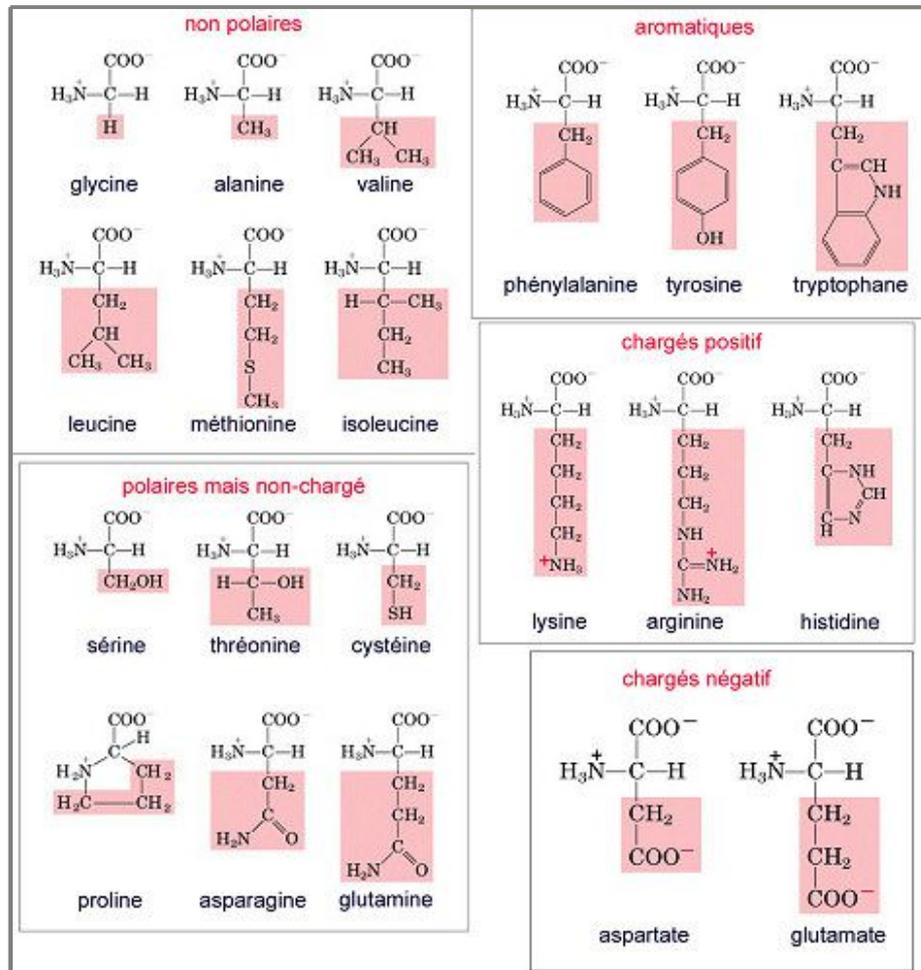
enzyme ; 175 mM. Cependant, la position des ions n'est pas responsable de cette grande mobilité pour la majorité des résidus en question. L'analyse des fonctions de distribution radiales a révélé plutôt une importante accumulation des molécules d'eau autour des résidus GLY52 et LYS53, qui forment une des régions boucles les plus flexibles de la structure de l'enzyme mésophile.

La dynamique du résidu polaire le plus flexible de la structure de VcEndA ; GLN90 est affectée, quant à elle par la position des ions, puisque sous la concentration en sel optimale, le squelette de ce résidu s'entoure de plus d'ions  $\text{Cl}^-$ , et ce qu'il lui confère plus de flexibilité sous la concentration considérée.

L'étude de l'effet de température sur l'enzyme mésophile a révélé un profil du rmsf dominé par la plus haute température étudiée ; 326K. La position des ions affecte significativement la flexibilité des résidus les plus flexibles, puisque l'analyse des fonctions de distribution radiales a révélé une importante accumulation des ions  $\text{Cl}^-$  et/ou  $\text{Na}^+$  autour des résidus les plus flexibles à 326K ; LYS53, GLN96 et GLY140.

# Annexe I

## Structure des 20 acides aminés

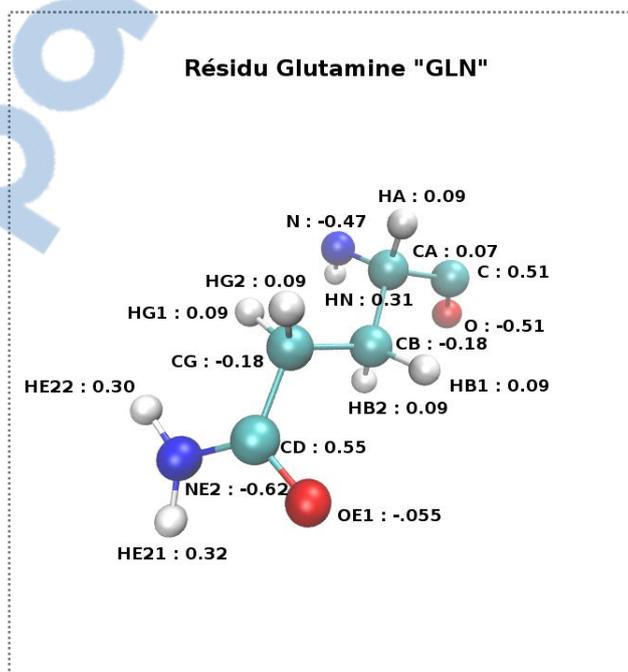
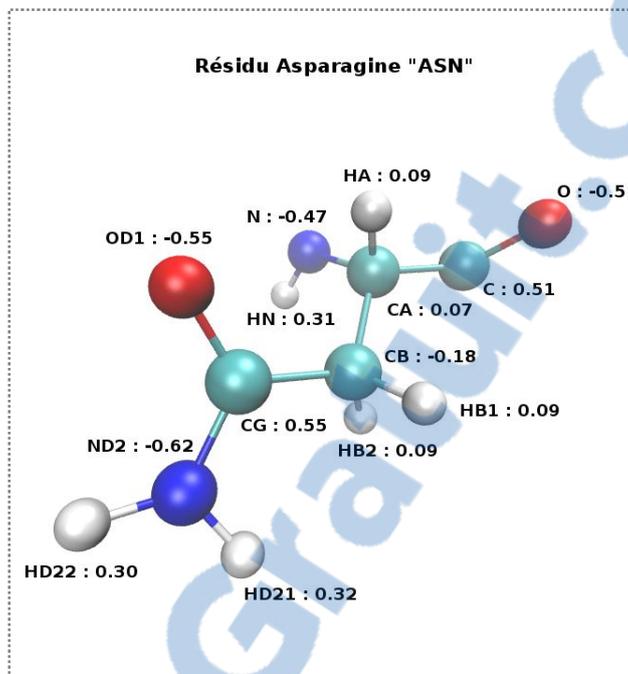


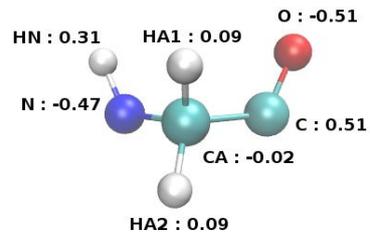
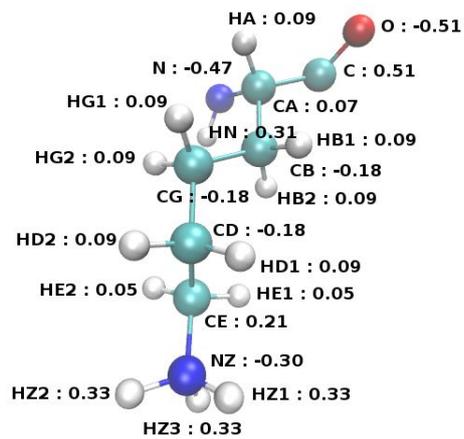
<b>Acide glutamique</b>	Glu	E
<b>Acide aspartique</b>	Asp	D
<b>Alanine</b>	Ala	A
<b>Arginine</b>	Arg	R
<b>Asparagine</b>	Asn	N
<b>Cystéine</b>	Cys	C
<b>Glutamine</b>	Gln	Q
<b>Glycine</b>	Gly	G
<b>Histidine</b>	His	H
<b>Isoleucine</b>	Ile	I

<b>Leucine</b>	Leu	L
<b>Lysine</b>	Lys	K
<b>Méthionine</b>	Met	M
<b>Phénylalanine</b>	Phe	F
<b>Proline</b>	Pro	P
<b>Sérine</b>	Ser	S
<b>Thréonine</b>	Thr	T
<b>Tryptophane</b>	Trp	W
<b>Tyrosine</b>	Tyr	Y
<b>Valine</b>	Val	V

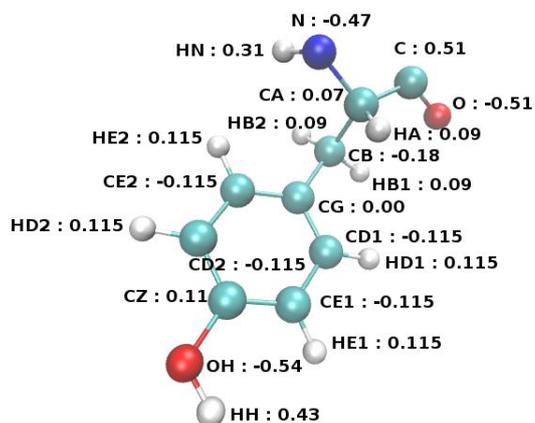
## **Annexe II**

## Charges atomiques partielles des résidus les plus flexibles dans ce manuscrit



**Résidu Glycine : "GLY"****Résidu Lysine "LYS"**

## Résidu Tyrosine "TYR"



## **Annexe III**

### L'Algorithme de LINCS :

Nous considérons un système de  $N$  particules, avec des positions données par un vecteur  $\mathbf{r}(t)$  de dimension  $3N$ . Les équations du mouvement sont données par la loi de Newton :

$$\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = M^{-1}\mathbf{F} \quad (1)$$

où  $\mathbf{f}$  est le vecteur de la force de dimension  $3N$ , et  $M$  est une matrice diagonale de dimension  $(3N \times 3N)$ . En générale, le système est contraint par  $K$  équations de contraintes indépendantes au temps :

$$g_i(\mathbf{r}) = |\mathbf{r}_{i_1} - \mathbf{r}_{i_2}| - d_i = 0 \quad i = 1, \dots, K \quad (2)$$

Le système est contraint selon le principe de moindre action<sup>[1]</sup>. Dans cette approche, les contraintes sont ajoutées comme un terme nul au potentiel  $V(\mathbf{r})$ , multiplié par les multiplicateurs de Lagrange  $\lambda_i(t)$  :

$$-M \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}}(V - \boldsymbol{\lambda} \cdot \mathbf{g}) \quad (3)$$

Une nouvelle notation est introduite pour la matrice du gradient des équations de contraintes (qui apparaissent du côté droit de l'équation,

$$B_{hi} = \frac{\partial g_h}{\partial r_i} \quad (4)$$

Notons bien que  $B$  est une matrice de dimension  $(K \times 3N)$ , et elle contient les directions des contraintes. L'équation (3) peut être simplifiée pour donner :

$$-M \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} + \mathbf{B}^T \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{f} = 0 \quad (5)$$

Puisque les équations de contraintes sont nulles, les dérivées premières et secondes des contraintes sont aussi nulles

$$\frac{d\mathbf{g}}{dt} = \mathbf{B} \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0 \quad (6)$$

$$\frac{d^2\mathbf{g}}{dt^2} = \mathbf{B} \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} + \frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0 \quad (7)$$

1. Chapter 19 of Volume II, [Feynman R.](#), [Leighton R.](#), and [Sands M.](#) *The Feynman Lectures on Physics*. 3 volumes 1964, 1966. Library of Congress Catalog Card No. 63-20717.

A fin de résoudre les équations relatives à  $\lambda$ , l'équation (5) est multipliée par  $\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}$ , et l'équation (7) est utilisée pour aboutir à :

$$\frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} + \mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T\boldsymbol{\lambda} + \mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} = 0 \quad (8)$$

Par conséquent les forces de contraintes sont :

$$\mathbf{B}^T\boldsymbol{\lambda} = -\mathbf{B}^T(\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1}\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} - \mathbf{B}^T(\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1}\frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \quad (9)$$

La substitution de cette dernière équation dans l'équation (5) donne les équations du mouvement sous contraintes. Utilisant l'abréviation  $\mathbf{T} = \mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T(\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1}$  donne :

$$\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = (\mathbf{I} - \mathbf{T}\mathbf{B})\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} - \mathbf{T}\frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \quad (10)$$

$\mathbf{I}-\mathbf{T}\mathbf{B}$  est une matrice de projection qui fixe les coordonnées contraintes à zéro,  $\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f}$  est un vecteur de dimension  $K$  des dérivées secondes des longueurs de liaison dans la direction des liaisons,  $\mathbf{T}$  est une matrice ( $3N \times K$ ) qui transforme les mouvements dans les coordonnées contraintes en mouvements dans les coordonnées Cartésiennes, sans le changement des équations de mouvement des coordonnées sans contraintes. Le dernier terme dans (10) représente les forces centripètes causées par la rotation des liaisons. Si les contraintes sont satisfaites dans la configuration de départ, l'équation (10) conservera les contraintes.

Les équations suivantes montrent comment les nouvelles coordonnées sous contraintes  $r_{n+1}$  sont reliées aux coordonnées sans contraintes  $r_{n+1}^{unc}$

$$\begin{aligned} r_{n+1} &= (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n \mathbf{B}_n) r_{n+1}^{unc} + \mathbf{T}_n \mathbf{d} = \\ r_{n+1}^{unc} - \mathbf{M}^{-1} \mathbf{B}_n (\mathbf{B}_n \mathbf{M}^{-1} \mathbf{B}_n^T)^{-1} (\mathbf{B}_n r_{n+1}^{unc} - \mathbf{d}) \end{aligned} \quad (11)$$

Cette première étape n'établit pas les longueurs de liaisons réelles aux longueurs prescrites, mais la projection des nouvelles liaisons sur les anciennes directions des liaisons. Pour corriger la rotation de la liaison  $i$ , la projection de la liaison sur l'ancienne direction est établie par :

$$p_i = \sqrt{2d_i^2 - l_i^2} \quad (12)$$

Où  $l_i$  est la longueur de la liaison après la première projection, Les positions corrigées sont

$$r_{n+1}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n \mathbf{B}_n) r_{n+1} + \mathbf{T}_n \mathbf{p} \quad (13)$$

La figure 1 montre une image schématique de la façon dont l'algorithme fonctionne sur une liaison.

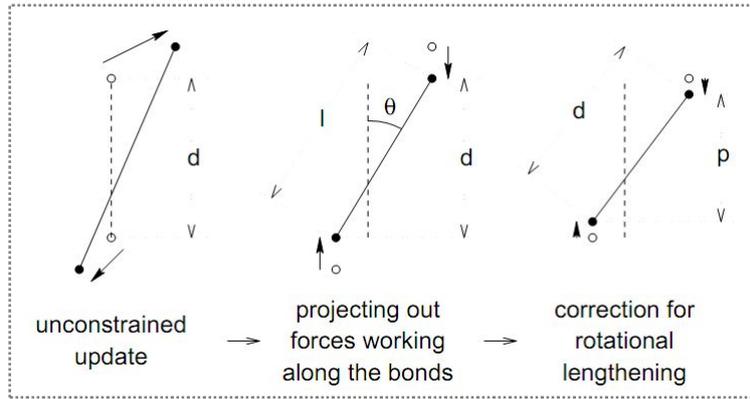


Figure 1: image schématique illustrant les trois mises à jour des positions nécessaires pour un pas de temps.