



HAL
open science

Expression et caractérisation de la phosphate alcaline de l'Euryarchaeote Hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*

Sébastien Zappa

► To cite this version:

Sébastien Zappa. Expression et caractérisation de la phosphate alcaline de l'Euryarchaeote Hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2002. Français. NNT : 2002INPL081N . tel-01749731

HAL Id: tel-01749731

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749731v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

136021 4848

02INPL081N

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS UPR 6811
Groupe de Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

THESE

(M) 2002 ZAPPA, S.

Présentée à l'INPL par

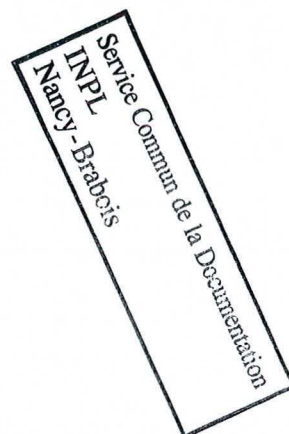
Sébastien ZAPPA

Ingénieur ENSAIA

En vue d'obtenir le grade de :

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement
(Procédés Biotechnologiques et Alimentaires)



Sujet :

**Expression et Caractérisation de la Phosphatase Alcaline
de l'Euryarchaeote Hyperthermophile *Pyrococcus abyssi***

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2002, devant la commission d'examen suivante :

Président : Dr. Jacques Magdalou (Faculté de Médecine, CNRS, Nancy, France)

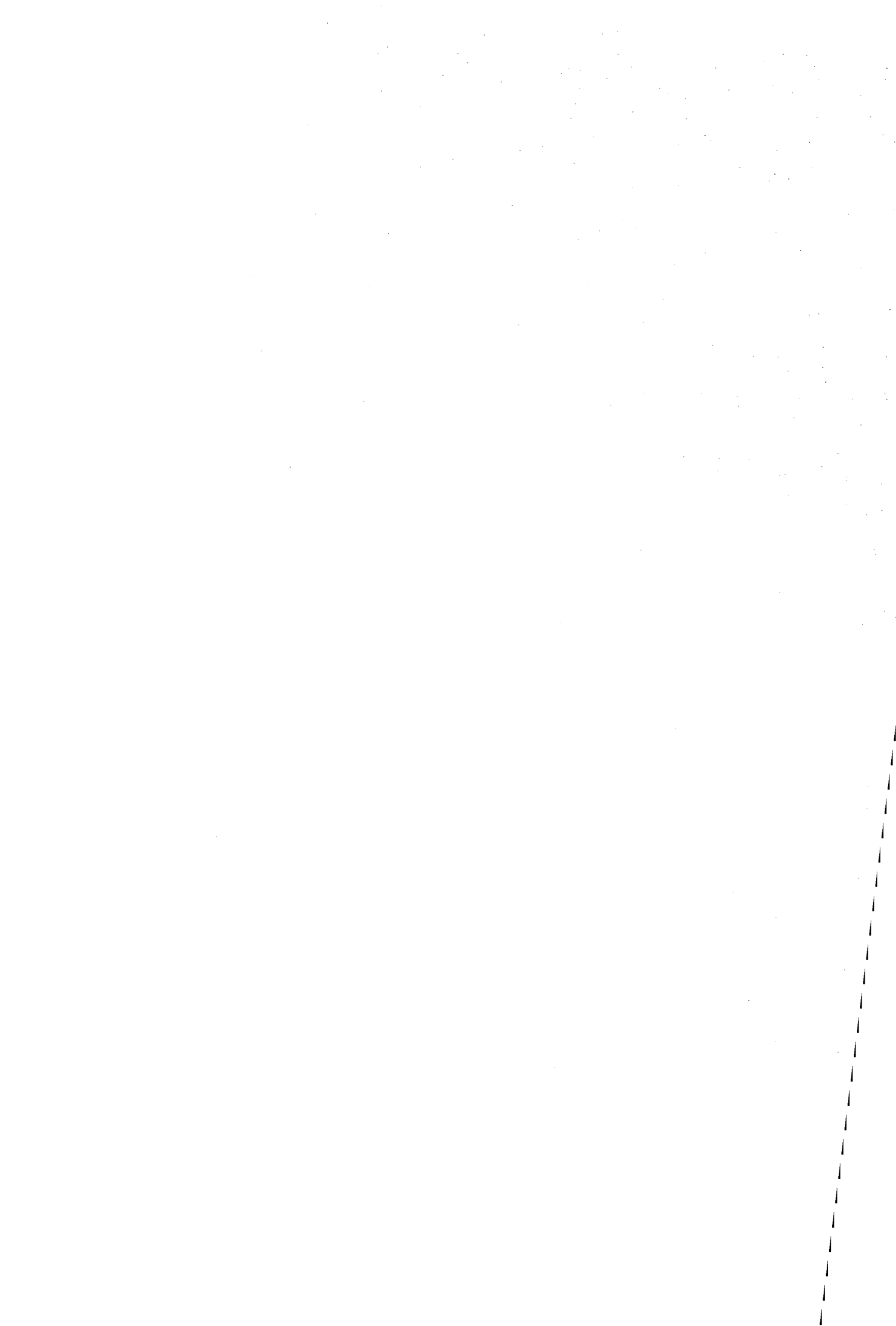
Rapporteurs : Pr. Styliani C. Pastra-Landis (Wheaton College, Norton, MA, USA)

Pr. Francis Duchiron (Université de Reims-Champagne-Ardenne, France)

Examineurs : Dr. Joseph Boudrant (LSGC-CNRS, Nancy, France) (directeur de thèse)

Dr. Jacques Dietrich (Ifremer, Sète, France)

Dr. Guy Hervé (Université Pierre et Marie Curie, CNRS, Paris, France)



*“Pur produit du système éducatif, Rodolphe pouvait espérer
obtenir un poste de maître de conférence d’ici à deux ans, passer
professeur d’université dans sept ans et mourir complètement
oublié une soixantaine d’années plus tard en laissant une œuvre
qui influencera des générations de termites”*

Martin Page, *Comment je suis devenu stupide*

© Le Dilettante, 2001

Je remercie Messieurs Hans-Günther Lintz et Michel Sardin, Directeurs du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, ainsi que Messieurs Ivan Marc et Michel Fick, responsables du groupe de Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, pour m'avoir permis de travailler dans leurs locaux.

J'adresse également mes remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur Joseph Boudrant, Directeur de Recherche au CNRS, pour son enthousiasme à l'égard de mes travaux et la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ma thèse.

J'exprime ma sincère gratitude à Madame Elita Pastra-Landis, Professeur à Wheaton College, et Monsieur Francis Duchiron, Professeur à l'Université de Reims-Champagne-Ardenne, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Messieurs Jacques Dietrich, Directeur de Recherche à l'Ifremer, Guy Hervé, Directeur de Recherche au CNRS, et Jacques Magdalou, Directeur de Recherche au CNRS, d'avoir accepté de participer au jury.

Un grand merci à Jacques Dietrich qui m'a ouvert la porte du Laboratoire de Biotechnologie des Micro-organismes Hydrothermaux au moment où il a fallu redéfinir totalement les objectifs de mes travaux. Merci à tous les hydrothermaux de la Pointe du Diable (Didier, Gigi, Gisèle, Jacques, Jean-Luc, Jean-Paul, Philippe, Yann, Yannick) pour le travail et l'ambiance générale.

Un grand merci encore à Elita Pastra-Landis sans qui je ne serais jamais allé travailler pendant quelques mois à Boston College. Merci également pour avoir largement participé au bon déroulement de mon séjour aux Etats-Unis. Ευχαριστω πολυ !

Je remercie Monsieur Evan R. Kantrowitz, Professeur à Boston College, pour m'avoir accueilli dans ses locaux pendant quatre mois et pour avoir suivi mes travaux avec beaucoup d'intérêt. Merci également à toute son équipe pour leur aide quotidienne au laboratoire (Ashok, Cheryl, Christine, Jay, Jim, Neelima, Paul, Rob).

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du groupe de Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires pour la sympathie qu'ils m'ont témoigné tout au long de mon séjour au laboratoire. Je salue particulièrement ceux que j'ai le plus côtoyé : "la recherche d'en bas", c'est-à-dire, les thésards et les stagiaires.

Et puis, il y a tous ceux qui ont indirectement participé à cette thèse en me permettant de "décompresser" entre les manips : à Nancy ou presque (Ahmed, Amélie et son petit, Antoine, Arnaud, Bérangère, Carine, Davin, Erwan, Franck, François, Fred, Jules, Marie, Marion, Max, Mélanie, Michel, Nadia, Nadine, Nico, Patrice, Richard, Samira, Sophie, Verity, Véro, Vincent), à Brest (le team de la Pointe du Diable, cf. ci-dessus), les colocataires de Boston (Alex, Binod, Eve, Johnny, Meryl, Michael, Richard, Izmit, Victoria, Vanesa), à Chelles (la bande des vieilles paillasses), en France (le frère, les parents, la famille). Merci à chacun de vous pour des raisons aussi diverses que vous êtes nombreux.

Merci enfin à la Confédération des Etudiants-Chercheurs et au Ministre de la Recherche pour l'augmentation de 300 FF de l'allocation de recherche MENRT en janvier 2002.

SOMMAIRE GENERAL

ABBREVIATIONS.....	i
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....	47
PARTIE III : ANALYSE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUE ET PEPTIDIQUE.....	67
PARTIE IV : CARACTERISATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i>	83
PARTIE V : STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i>	105
PARTIE VI : EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i>	125
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	145

ABBREVIATIONS

Genres microbiens

E. : *Escherichia*

P. : *Pyrococcus*

Pc. : *Pichia*

H. : *Halobacterium*

Acides aminés

Alanine	Ala	A	Glycine	Gly	G	Proline	Pro	P
Arginine	Arg	R	Histidine	His	H	Sérine	Ser	S
Asparagine	Asn	N	Isoleucine	Ile	I	Thréonine	Thr	T
Aspartate	Asp	D	Leucine	Leu	L	Tryptophane	Trp	W
Cystéine	Cys	C	Lysine	Lys	K	Tyrosine	Tyr	Y
Glutamate	Glu	E	Méthionine	Met	M	Valine	Val	V
Glutamine	Gln	Q	Phénylalanine	Phe	F			

Nucléotides et acides nucléiques

A : adénine

T : thymine

C : cytosine

G : guanine

ADN acide désoxyribonucléique

ARN acide ribonucléique

ARNt ARN de transfert

ARNr ARN ribosomal

ARNm ARN messenger

Divers

D.O./OD densité optique/optical density

h, min, sec heure(s), minute(s), seconde(s)

pds/wt, vol poids/weight, volume

pdb, bp paire(s) de base/base pair(s)

rpm rotations par minutes

SDS sodium dodécyl sulfate

Tris tris-(hydroxyméthyl)aminométhane

pNP/pNPP para-nitrophénolate/para-nitrophénylphosphate

4-MUFP 4-méthylumbélliférylphosphate

AP alkaline phosphatase, phosphatase alcaline

IPTG isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

CA carbonic anhydrase

BSA bovine serum albumin, albumine de sérum bovin

CD circular dichroism, dichroïsme circulaire

EDTA ethylenediaminetetraacetic acid

PAGE polyacrylamide gel electrophoresis, électrophorèse sur gel de polyacrylamide

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE :

PHOSPHATASES ALCALINES ET EXTREMOPHILES

Les phosphatases alcalines (E.C. 3.1.3.1.) sont des phosphomonoesterases aspécifiques dont l'activité optimale est atteinte à pH alcalin [McComb *et al.*, 1979 ; Trowsdale *et al.*, 1990]. Cette famille d'enzymes intéresse la communauté scientifique, non seulement dans le cadre d'applications médicales et biotechnologiques mais aussi en recherche fondamentale.

Les phosphatases alcalines sont l'objet d'une grande considération dans le domaine de la recherche appliquée. D'une part, l'étude des phosphatases alcalines humaines est d'une grande utilité dans le domaine de la médecine. Diverses maladies, telles que l'hypophosphatasie et certains cancers se caractérisent en effet par des isoformes mutantes de phosphatases alcalines humaines [Harris, 1989]. Le suivi médical des concentrations en certaines isoformes permet de caractériser certains états physiologiques pathologiques ou heureux, tel que la grossesse [McComb *et al.*, 1979]. D'autre part, en termes d'applications biotechnologiques, les phosphatases alcalines sont des outils très répandus en biologie moléculaire, où elles sont utilisées pour déphosphoryler des fragments d'ADN linéaires, mais aussi en immunodétection (par exemple, dans les systèmes ELISA).

En ce qui concerne l'intérêt fondamental pour les phosphatases alcalines, l'étude de leur biochimie a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, les travaux sur leur mécanisme d'action ont révélé leur nature de métallo-enzyme. Elles constituent ainsi un matériel de base intéressant pour l'étude de la catalyse enzymatique métal-dépendante [Kim & Wyckoff, 1991 ; Stec *et al.*, 2000], et peuvent apporter une compréhension de ce phénomène chez d'autres enzymes [Galperin *et al.*, 1998]. De plus, leur structure typique est homodimérique. Cette structure est nécessaire à l'activité enzymatique, bien que chaque sous-unité dispose d'un site actif complet. Il s'agit d'un cas particulier d'un mécanisme appelé "complémentation intragénique". Les phosphatases alcalines se posent aujourd'hui comme un bon modèle d'étude de ce mécanisme [Hehir *et al.*, 2000 ; Martin *et al.*, 1999].

Des phosphatases alcalines ont été isolées à partir d'une grande diversité d'organismes, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères. De ce fait, elles sont classiquement décrites

comme ubiquitaires et cette caractéristique semble indiquer qu'elles sont associées à des processus biochimiques fondamentaux et apparus tôt dans l'évolution [McComb *et al.*, 1979]. Toutefois, très peu de phosphatases alcalines ont été à ce jour décrites dans le troisième domaine du vivant, les Archaea, et en particulier, aucune n'a jamais été isolée d'un Archaea hyperthermophile.

Les Archaea représentent un domaine longtemps rattaché aux Bactéries sous la dénomination d'Archaeobactéries. Jusqu'en 1990, les Archaeobactéries et les Bactéries constituaient le taxon primaire des Procaryotes. Cependant, cette année-là, Carl Woese *et al.* ont montré que, d'un point de vue phylogénétique, les Archaeobactéries n'étaient pas plus proches des Bactéries que des Eucaryotes. Ils proposèrent donc une classification du vivant en trois domaines : Archaea, Bacteria et Eucarya. L'intérêt pour les Archaea a connu un accroissement considérable ces vingt dernières années et l'exploration de milieux extrêmes caractérisés par de fortes teneurs en sel, des pHs très acides (1-3) ou très basiques (11-13), de fortes températures (100°C) a permis de découvrir dans ces biotopes une grande diversité microbienne comptant de nombreuses espèces d'Archaea. Parmi ces organismes, les hyperthermophiles continuent à fasciner la communauté scientifique par leur capacité à se développer à des températures proches du point d'ébullition de l'eau. Tandis que seulement deux micro-organismes hyperthermophiles avaient été isolés en 1972, 75 espèces étaient référencées à la fin de l'année 2000, dont plus de 90% appartiennent au domaine des Archaea [Huber *et al.*, 2000 ; Vieille & Zeikus, 2001]. L'hyperthermophilie semble ainsi à la fois poser des questions et donner des réponses : d'une part des questions d'ordre fondamental sur la résistance des structures biologiques dans de telles conditions, autrement dit sur la compréhension de la vie à haute température ; d'autre part des réponses à des procédés industriels nécessitant des enzymes thermostables [Niehaus *et al.*, 1999 ; Vieille & Zeikus, 2001].

Pyrococcus abyssi est un Archaea hyperthermophile. Isolé au large des Iles Fidji, au niveau d'une source hydrothermale à 2000 mètres de profondeur, il s'agit d'un Euryarchaeote capable de se développer à 100°C et incapable de croître au dessous de 80°C [Erauso *et al.*, 1993]. Un tel micro-organisme présente un fort potentiel, tant en terme de connaissances académiques qu'en terme d'applications industrielles. C'est pourquoi, le génome de *Pyrococcus abyssi* fut séquencé au Centre National de Séquençage (Evry) et analysé dans le cadre d'une collaboration entre l'Ifremer, le C.N.R.S. et l'I.G.B.M.C.

Le projet de cette thèse s'inscrit dans une optique de valorisation scientifique de *Pyrococcus abyssi*. L'annotation de son génome a révélé un cadre ouvert de lecture, nommé *phoA*,

présentant de fortes homologies avec des séquences de phosphatases alcalines connues. Ce travail de thèse a consisté à confirmer expérimentalement cette observation, dans le but de caractériser, pour la première fois, une phosphatase alcaline issue d'un Archaea hyperthermophile.

Ce document présente tout d'abord un bilan des connaissances actuelles sur les phosphatases alcalines, les micro-organismes hyperthermophiles et leurs enzymes. Puis, après une description des techniques expérimentales mises en œuvre, les différentes étapes de l'étude de la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi* sont successivement abordées dans quatre volets. Le premier est consacré à l'analyse des séquences nucléotidique et peptidique relatives à *phoA*. Les deux parties suivantes décrivent respectivement la caractérisation enzymatique et structurale de la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi*. Enfin, le dernier volet concerne l'étude de l'expression de la protéine recombinante chez deux hôtes mésophiles : la bactérie *Escherichia coli* et la levure méthylotrrophe *Pichia pastoris*.

PARTIE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



SOMMAIRE DE LA PARTIE I

LES PHOSPHATASES ALCALINES.....	5
I. LES PHOSPHATASES.....	5
I.1. LA LIAISON PHOSPHOMONOESTER ET SON HYDROLYSE.....	5
I.2. LES PHOSPHATASES : OMNIPRESENTES DANS LES PROCESSUS CELLULAIRES FONDAMENTAUX.....	6
I.3. UN CAS PARTICULIER : LA PHOSPHATASE ALCALINE.....	7
II. DISTRIBUTION DES PHOSPHATASES ALCALINES DANS LE VIVANT.....	8
II.1. LES PHOSPHATASES ALCALINES ISSUES D'ORGANISMES PROCARYOTES : UNE GRANDE DIVERSITE DE BIOTOPES.....	8
II.2. LES PHOSPHATASES ALCALINES ISSUES D'ORGANISMES EUCARYOTES : LES PLANTES, SEULES DEFICIENTES.....	9
II.3. LA NOTION D'ISOENZYME.....	9
II.4. CONCLUSION.....	10
III. UNE ENZYME MODELE : LA PHOSPHATASE ALCALINE D'<i>ESCHERICHIA COLI</i>.....	10
III.1. ORGANISATION GENETIQUE : LE REGULON PHO.....	11
III.2. VOIE DE BIOSYNTHESE, LOCALISATION CELLULAIRE : UNE PROTEINE PERIPLASMIQUE.....	12
III.3. STRUCTURE.....	12
III.3.1. Description de la structure globale.....	12
III.3.2. Structure du site actif.....	13
III.3.2.1. Le résidu sérine nucléophile : Ser102.....	14
III.3.2.2. Le site de fixation de métal M1.....	15
III.3.2.3. Le site de fixation de métal M2.....	15
III.3.2.4. Le site de fixation de métal M3.....	16
III.3.2.5. Le site de fixation du phosphate.....	16
III.4. MECANISME REACTIONNEL.....	17
III.4.1. Réactions catalysées.....	17
III.4.2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline.....	18
III.4.3. D'autres substrats.....	18
III.4.4. Inhibition de la phosphatase alcaline.....	19
III.4.5. Etapes déterminantes du mécanisme réactionnel.....	19
III.4.6. Mécanisme proposé pour la réaction d'hydrolyse.....	19
III.4.6.1. Catalyse à deux ions métalliques.....	19
III.4.6.2. La catalyse à trois ions métalliques.....	20
III.5. CONCLUSION.....	22

IV. CONNAISSANCES COMPLEMENTAIRES RELATIVES AUX PHOSPHATASES ALCALINES.....	22
IV.1. BIOSYNTHESE DES PHOSPHATASES ALCALINES.....	22
IV.1.1. Le régulon Pho.....	22
IV.1.2. Régulation.....	23
IV.2. SPECIFICITES DES PHOSPHATASES ALCALINES MAMMIFERES.....	23
IV.2.1. Caractéristiques générales.....	23
IV.2.2. Nature et régulation de l'activité catalytique.....	24
IV.2.3. Le cas des phosphatases alcalines humaines.....	25
IV.3. STRUCTURES ELUCIDEES A CE JOUR.....	25
IV.4. APPROCHE BIO-INFORMATIQUE.....	27
IV.5. CONCLUSION.....	28

MICRO-ORGANISMES THERMOPHILES ET ENZYMES THERMOSTABLES.....29

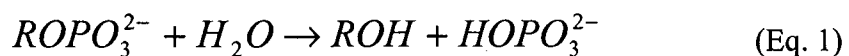
I. L'HYPERTHERMOPHILIE.....	29
I.1. L'EXTREMOPHILIE.....	29
I.2. UN CAS PARTICULIER : L'HYPERTHERMOPHILIE.....	29
I.2.1. Thermophilie et hyperthermophilie.....	29
I.2.2. Les hyperthermophiles : biotopes, taxonomie et phylogénie.....	30
I.3. UN MICRO-ORGANISME HYPERTHERMOPHILE : <i>Pyrococcus abyssi</i>	33
II. BIOCHIMIE DE L'HYPERTHERMOPHILIE.....	35
II.1. LES MEMBRANES DES HYPERTHERMOPHILES.....	35
II.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES HYPERTHERMOPHILES.....	36
II.3. LES PROTEINES DES HYPERTHERMOPHILES.....	37
II.3.1. Généralités.....	37
II.3.2. Aspect macroscopique de la thermostabilité : description thermodynamique.....	38
II.3.3. Aspects moléculaires de la thermostabilité.....	39
II.3.3.1. La thermostabilité : caractère intrinsèque ou extrinsèque ?.....	39
II.3.3.2. Facteurs intrinsèques de thermostabilisation.....	40
II.3.3.3. Facteurs extrinsèques.....	45
II.3.3.4. Conclusion.....	46

LES PHOSPHATASES ALCALINES

I. LES PHOSPHATASES

I.1. LA LIAISON PHOSPHOMONOESTER ET SON HYDROLYSE

La liaison phosphomonoester est présente dans de nombreuses molécules du vivant (exemples : phospholipides, phosphoprotéines, etc...). Ces molécules, très variées, sont des éléments-clef des nombreux systèmes biologiques. Elles sont en effet associées à de multiples aspects de la vie cellulaire : métabolisme énergétique, régulation métabolique, signaux cellulaires. Ainsi, l'hydrolyse de la liaison phosphomonoester est une réaction au cœur de nombreux processus biologiques. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction d'hydrolyse, schématisée par l'équation 1, est un phénomène spontané ($\Delta G^{\circ} \leq -9 \text{ kJ.mol}^{-1}$) mais très lent [Vincent *et al.*, 1992].



Dans les systèmes biologiques, elle est catalysée par une famille d'enzymes, regroupées sous le terme générique de phosphatases, découverte au début du 20^{ième} siècle. En 1907, Suzuki *et al.* observent une augmentation de la quantité de phosphate inorganique dans les graines de riz lors de la germination de ces dernières. Ils concluent que la phytine a été transformée en inositol et en acide phosphorique par une enzyme qu'ils nomment à l'époque "phytase". A la même époque, Harden et Young étudient la fermentation alcoolique chez les levures et découvrent une enzyme capable de produire du phosphate inorganique à partir d'hexose diphosphate. Ils montrent également que le phosphate inorganique inhibe l'activité de cette enzyme. En 1912, Grosser et Husler, et, von Euler et Funke mettent en évidence l'hydrolyse de glycérophosphate et de fructose-1,6-bisphosphate par des extraits de divers tissus mammifères [d'après l'historique de McComb *et al.*, 1979].

Depuis ces premiers travaux, de nombreuses phosphatases ont été étudiées et cette famille compte désormais un grand nombre de représentants, classés en plusieurs subdivisions

[Vincent *et al.*, 1992]. La classification des phosphatases est basée sur leur mécanisme d'action (certaines utilisent des cofacteurs métalliques, d'autres non), par leurs conditions physico-chimiques optimales (en l'occurrence, le pH), par leur spécificité de substrat. En 1992, Vincent *et al.* proposent ainsi une classification des phosphatases, en cinq classes : (1) les phosphatases alcalines, (2) les phosphatases acides pourpres, (3) les phosphatases acides à bas poids moléculaires, (4) les phosphatases acides à haut poids moléculaire, et (5) les protéine Ser/Thr phosphatases. Une sixième classe a été décrite en 1996 par Fauman et Saper, il s'agit des protéine tyrosine phosphatases. Les deux classes concernant les protéine phosphatases peuvent être elles-mêmes subdivisées en plusieurs sous-classes. Les classes 1 à 4 correspondent à des phosphatases substrat-aspécifiques, tandis que les protéine phosphatases sont des enzymes substrat-spécifiques.

I.2. LES PHOSPHATASES : OMNIPRESENTES DANS LES PROCESSUS CELLULAIRES FONDAMENTAUX

D'après la classification évoquée ci-dessus, il apparaît que les phosphatases peuvent être plus ou moins spécifiques vis-à-vis de leurs substrats.

Les phosphatases substrat-spécifiques sont représentées par les protéine phosphatases. Ces dernières jouent un rôle très important dans la régulation des procédés cellulaires, en déphosphorylant certaines protéines. La phosphorylation des protéines sur certains résidus aminés provoque des changements de conformation majeures, pouvant aboutir à des modifications fonctionnelles. Le système de phosphorylation-déphosphorylation des protéines agit ainsi tel un interrupteur "marche-arrêt". Les protéine kinases sont connues pour avoir un tel rôle dans la régulation de voies métaboliques, en phosphorylant certaines protéines, les protéine phosphatases assurant l'autre position de l'interrupteur [Barford, 1996].

Les phosphatases substrat-aspécifiques sont notamment classées selon le pH auquel elles montrent leur activité maximale. Ainsi, les phosphatases aspécifiques dont l'activité maximale est observée à des pH avoisinant 5,0 sont appelées "phosphatases acides". Par opposition, celles qui ont une activité maximale quand le pH est de l'ordre de 9,0 sont nommées "phosphatases alcalines". Par définition, ces phosphatases sont capables de produire du phosphate inorganique à partir d'une grande variété de substrats. Le besoin en phosphate fait partie des besoins fondamentaux d'une cellule vivante, puisque cet élément entre dans la composition de constituants cellulaires essentiels tels que les phospholipides (compartimentation cellulaire), les acides nucléiques (hérédité, synthèse des protéines), l'ATP

(énergie), etc... Ces quelques exemples permettent de souligner l'importance des phosphatases aspécifiques dans le vivant.

I.3. UN CAS PARTICULIER : LA PHOSPHATASE ALCALINE

L'intérêt de cette étude s'est porté sur les phosphatases alcalines. Il est difficile de savoir précisément quand les phosphatases alcalines sont apparues dans la littérature, étant donné qu'à une certaine époque la plupart des chercheurs ne relevaient pas le pH des milieux de réaction enzymatique. Cependant, en 1923, Robert Robison décrivait la forte teneur en activité phosphatase d'une préparation de tissu osseux, dont l'activité maximale était atteinte à des pHs alcalins [d'après l'historique de McComb *et al.*, 1979]. Toujours est-il qu'à la fin des années 1950 et au début des années 1960, l'étude des phosphatases alcalines connut un essor considérable lorsqu'il fut découvert que la bactérie *Escherichia coli* possédait une phosphatase alcaline dont la synthèse était dérégulée en absence de phosphate inorganique dans le milieu de culture. Dès lors, de nombreux travaux ont été réalisés sur la phosphatase alcaline d'*E. coli*, mais aussi sur les phosphatases alcalines mammifères, en particulier humaines. De plus, des phosphatases alcalines ont été isolées à partir de très nombreux organismes, aboutissant à l'idée que cette enzyme est ubiquitaire et lui conférant un intérêt certain pour la recherche fondamentale. En outre, ces dernières décennies ont également vu le développement des connaissances et des techniques dans les domaines de la biologie moléculaire et de l'immunologie. La phosphatase alcaline est ainsi devenue un outil communément employé pour déphosphoryler des fragments d'ADN linéaires en biologie moléculaire, et dans les systèmes ELISA en immunodétection.

Le double intérêt, entre recherche fondamentale et application pratique, suscité par les phosphatases alcalines pousse à découvrir de nouveaux représentants de cette famille à partir de nouvelles sources biologiques, afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme et d'en améliorer les performances.

II. DISTRIBUTION DES PHOSPHATASES ALCALINES DANS LE VIVANT

La phosphatase alcaline est présente dans de nombreux taxons du vivant. Elle est généralement décrite comme une enzyme ubiquitaire. Cependant, cet attribut est abusif dans la mesure où cette enzyme n'a à ce jour jamais été décrite chez les plantes. La distribution des phosphatases alcalines dans la nature a été très largement rapportée dans la revue de McComb *et al.* (1979). Les chapitres suivants tentent ainsi de dresser un bilan non-exhaustif mais représentatif des divers organismes à partir desquels une activité phosphatase alcaline a été isolée ces dernières années.

II.1. LES PHOSPHATASES ALCALINES ISSUES D'ORGANISMES PROCARYOTES : UNE GRANDE DIVERSITE DE BIOTOPES

Chez les Bactéries, des phosphatases alcalines ont été découvertes aussi bien dans la microflore du sol (*Bacillus subtilis* [Hulett *et al.*, 1990]) que dans la microflore intestinale (*Enterococcus faecalis* [Lee *et al.*, 1999]) et périodontale (*Bacteriodes gingivalis* [Yamashita *et al.*, 1990], *Prevotella intermedia* [Ansai *et al.*, 1998]). Ces dernières années ont vu un intérêt grandissant pour l'étude d'enzymes provenant de micro-organismes psychrophiles et thermophiles, en raison des potentiels de découvertes tant fondamentales qu'appliquées qu'ils impliquent. Ainsi, des bactéries psychrophiles ont permis d'isoler des phosphatases alcalines thermolabiles : *Vibrio* sp. [Hauksson *et al.*, 2000], Antarctic Bacterium TAB5 [Rina *et al.*, 2000], *Arthrobacter* sp. [de Prada & Brenchley, 1997]. De même, *Thermus thermophilus* [Pantazaki *et al.*, 1998], *Thermus caldophilus* [Park *et al.*, 1999], *Thermotoga neapolitana* [Dong & Zeikus, 1997], *Thermotoga maritima* [Wojciechowski *et al.*, 2002] et *Bacillus stearothermophilus* [Mori *et al.*, 1999] ont permis d'étudier des phosphatases alcalines thermostables.

Chez les Archaea, les seules phosphatases alcalines décrites proviennent d'espèces halophiles. Ainsi, le genre *Halobacterium* a permis l'isolement de phosphatases alcalines chez trois espèces : *H. halobium* [Bonet *et al.*, 1994], *H. cutirubrum* [Fitt & Baddoo, 1978], *H. salinarum* [Marhuenda-Egea *et al.*, 2001]. Par ailleurs, une phosphatase alcaline a été caractérisée chez une autre espèce Euryarchaeote halophile, *Haloarcula marismortui* [Goldman *et al.*, 1990].

II.2. LES PHOSPHATASES ALCALINES ISSUES D'ORGANISMES EUCARYOTES : LES PLANTES, SEULES DEFICIENTES

Chez les Eucaryotes, la phosphatase alcaline est présente à de nombreux niveaux phylogénétiques. Ainsi, chez les Eucaryotes inférieurs, plusieurs phosphatases alcalines d'origine fongique ont été étudiées : *Saccharomyces cerevisiae* [Kaneko *et al.*, 1987 ; Tuleva *et al.*, 1998], *Neurospora crassa* [Morales *et al.*, 2000], *Penicillium chrysogenum* [Politino *et al.*, 1996]. Dans le règne animal, des phosphatases alcalines sont connues chez les insectes : *Bombyx mori* [Itoh *et al.*, 1999 ; Eguchi, 1995] ; les crustacés : *Scylla seratta* [Chen *et al.*, 2000] ; les poissons : *Gadus morhua* [Ásgeirsson *et al.*, 1995] ; les mammifères : lapin [Fujimori-Arai *et al.*, 1997], rat [Xie & Alpers, 1995], bovin [Weissig *et al.*, 1993], humain [Weiss *et al.*, 1980 ; Berger *et al.*, 1987].

Dans le règne végétal, la phosphatase alcaline ne semble pas être présente [McComb *et al.*, 1979]. En 1996, une activité phosphatase alcaline a été isolée de l'algue verte *Spirodella oligorrhiza* [Morita *et al.* 1996], mais après des travaux complémentaires, il s'est avéré qu'il s'agissait d'une phosphatase acide pourpre [Nakazato *et al.*, 1998].

II.3. LA NOTION D'ISOENZYME

Chez de nombreux organismes, plusieurs formes de phosphatases alcalines sont produites. Certains micro-organismes synthétisent ainsi plusieurs isoformes. C'est, par exemple, le cas de *B. subtilis* [Hulett *et al.*, 1990] et de *S. cerevisiae* [Tuleva *et al.*, 1998]. Cependant, c'est chez les Mammifères, et de façon moindre chez les Insectes, que cette production de formes multiples semble prépondérante. Chez les Mammifères, deux phosphatases alcalines principales sont connues. Il s'agit des phosphatases alcalines intestinale (IAP pour *intestinal alkaline phosphatase*) et tissu-aspécifique ou hépatique/rénale/osseuse (TNAP pour *tissu-non-specific alkaline phosphatase*). Chez les Primates, une troisième isoforme vient s'ajouter, la phosphatase alcaline placentaire (PLAP pour *placental alkaline phosphatase*). Il est intéressant de noter que ces trois principales isoenzymes sont produites par trois gènes distincts. En terme d'évolution, il semblerait que la phosphatase alcaline aspécifique (TNAP) soit la plus ancienne et la duplication de son gène aurait abouti à l'IAP. Enfin, par duplication génétique de ce dernier, la PLAP serait apparue. Outre, ces trois isoenzymes principales, il existe d'autres isoformes, notamment de la PLAP (appelée alors PLAP-like) qui sont produites par certaines tumeurs [Trowsdale *et al.*, 1990]. Enfin, il faut noter que même si les

isoformes TNAP et IAP sont présentes chez l'ensemble des Mammifères, leurs caractéristiques ne sont pas forcément identiques d'une espèce à une autre. Ainsi, les rats et les bovins disposent de deux gènes distincts pour la synthèse de deux isoformes de l'IAPs [Xie & Alpers, 2000] tandis qu'il n'y en a qu'un seul chez les Primates. De plus, la répartition au niveau des organes d'une phosphatase alcaline tissu spécifique peut varier d'une espèce à une autre.

Chez les Insectes, des travaux ont montré que le concept d'isoenzyme existe également. Les principales études ont été réalisées chez *Bombyx mori* et *Drosophila melanogaster*. Il en ressort que deux gènes distincts codent pour deux formes de phosphatases alcalines : l'une ancrée à la membrane (m-AP), l'autre étant soluble (s-AP) [Eguchi, 1995].

II.4. CONCLUSION

Ainsi, il apparaît que l'activité phosphatase alcaline est prépondérante dans la nature. Elle est représentée dans une grande diversité de milieux naturels et de nombreux phylla. Ce caractère quasi-ubiquitaire des phosphatases alcalines laisse penser que cette activité enzymatique joue un rôle clef dans les processus fondamentaux de la vie. De plus, ceci indique que l'évolution a permis la mise en place de structures protéiques permettant la présence de cette activité enzymatique dans des conditions physico-chimiques très diverses.

III. UNE ENZYME MODELE : LA PHOSPHATASE ALCALINE D'*ESCHERICHIA COLI*

Dès les années 1930, Gordon et Cooper (1932), puis Boivin et Mesrobeanu (1933), rapportaient l'existence d'une activité phosphatase alcaline chez *E. coli*. Cependant, cette enzyme fut plutôt ignorée jusqu'à la fin des années 50 et au début des années 60, lorsqu'il fut découvert que la synthèse de celle-ci était déréprimée en absence de phosphate inorganique dans le milieu de culture. Sa fonction précise n'est pas connue mais il semble qu'elle joue un rôle important dans le métabolisme du phosphate, permettant à *E. coli* d'obtenir du phosphate inorganique à partir de phosphomonoesters présents dans son environnement. La phosphatase alcaline d'*E. coli* a fait l'objet de nombreuses études et s'est depuis imposée comme modèle

de référence de l'ensemble des phosphatases alcalines. Ce chapitre tente de faire le point sur les connaissances relatives à cette enzyme [d'après l'historique de McComb *et al.*, 1979].

III.1. ORGANISATION GENETIQUE : LE REGULON PHO

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est codée par le gène *phoA*, dont la séquence a été déterminée par Chang *et al.* en 1986. *phoA* fait partie du régulon Pho, un groupe de plus de trente gènes contrôlés par la concentration extracellulaire en phosphate inorganique. Ce régulon est principalement composé de deux opérons, *phoBR* [Morris *et al.*, 1974 ; Stock *et al.* 1989] et *pstSCAB-phoU* [Surin *et al.*, 1985].

L'opéron *phoBR* code pour deux protéines, PhoB et PhoR, qui sont directement impliquées dans la régulation de la synthèse de la phosphatase alcaline. La forme phosphorylée de PhoB est un activateur de transcription [Makino *et al.*, 1989] qui se fixe sur une séquence consensus de 18 nucléotides, appelée "pho box", se trouvant dans la zone promotrice de tous les membres du régulon Pho. De son côté, PhoR est une protéine transmembranaire, localisée au niveau de la membrane interne [Scholten & Tommassen, 1993]. En conditions limitantes en phosphate inorganique, PhoR phosphoryle PhoB, et cette dernière peut alors activer la transcription des gènes du régulon Pho.

L'opéron *pstSCAB-phoU* semble avoir deux fonctions indépendantes : le transport du phosphate du périplasma vers le cytoplasme, à travers la membrane interne, et, une médiation dans la régulation de l'ensemble Pho [Cox *et al.*, 1988]. Le transport du phosphate est réalisé par le complexe Pst, formé par les protéines PstS, PstC, PstA et PstB. PstS est une protéine périplasmique qui fixe le phosphate et le transporte vers un canal membranaire constitué des protéines PstA et PstC. PstB est une protéine membranaire associée à la face cytoplasmique de la membrane interne. Sa fonction serait de fournir de l'énergie pour le transport du phosphate.

La jonction entre la concentration en phosphate extracellulaire et l'activité de PhoR est encore obscure, mais un modèle a été proposé : le phosphate inorganique fixé à PstS induirait un changement de conformation du complexe Pst, qui se répercuterait sur PhoR via PhoU [Muda *et al.*, 1992]. Le résultat de cette série d'événements serait la répression de la synthèse de la phosphatase alcaline (et des autres protéines du régulon Pho).

III.2. VOIE DE BIOSYNTHESE, LOCALISATION CELLULAIRE : UNE PROTEINE PERIPLASMIQUE

La phosphatase alcaline est synthétisée sous forme d'un précurseur comprenant un peptide signal en N-terminal [Inouye & Beckwith, 1977]. Celui-ci permet de transloquer le précurseur à travers la membrane interne vers le périplasma de la cellule [McComb *et al.*, 1979], où le peptide signal est clivé par une signal peptidase membranaire [Chang *et al.*, 1980]. Le transport de la protéine depuis un milieu réducteur, le cytoplasme, vers un milieu oxydant, le périplasma, s'accompagne de la formation de ponts disulfures [Derman & Beckwith, 1991]. Lors de ce transport, chaque chaîne peptidique incorpore un ion Mg^{2+} et deux ions Zn^{2+} et s'associe à une chaîne peptidique identique pour former un homodimère actif.

Le peptide signal en N-terminal du précurseur de la phosphatase alcaline est composé de 21 acides aminés, à forte teneur en résidus hydrophobes [Inouye *et al.*, 1982]. Les mutations affectant la séquence du peptide signal interfèrent avec la translocation de l'enzyme, aboutissant généralement à une enzyme localisée dans le cytoplasme, de même que la séquence N-terminal de l'enzyme mature semble également jouer un rôle important sur l'efficacité de la translocation [Karamyshev *et al.*, 1998].

III.3. STRUCTURE

La phosphatase alcaline d'*E. coli* a été cristallisée pour la première fois en 1964 par précipitation en présence de sulfate d'ammonium [McComb *et al.*, 1979]. Elle a été depuis cristallisée à nouveau et sa structure déterminée par diffraction des rayons X. Kim et Wyckoff ont réalisé les travaux les plus récents concernant la structure de l'enzyme, atteignant une résolution de 2,0 Å ($R = 0,184$) [Kim & Wyckoff, 1989 et 1991].

III.3.1. Description de la structure globale

La phosphatase alcaline est une enzyme homodimérique munie d'une double symétrie axiale. Chaque sous-unité est composée d'une chaîne de 449 acides aminés, d'une taille de 47 kDa. Les dimensions de l'enzyme sont de 100 Å × 50 Å × 50 Å. Chaque monomère a une topologie α/β caractéristique : le cœur de la molécule est un feuillet β à 10 brins, tandis que le sommet est un feuillet β à trois brins. Ces deux feuillets sont entourés de 16 hélices α . Ces éléments

constituent environ 55 % de chaque monomère, le reste étant composé de diverses boucles, tours, épingles, etc... Les brins du feuillet β central, nommés de A à J selon l'ordre d'apparition sur la séquence, sont tous parallèles à l'exception du brin i. La structure globale de cette enzyme est présentée figure I.1.

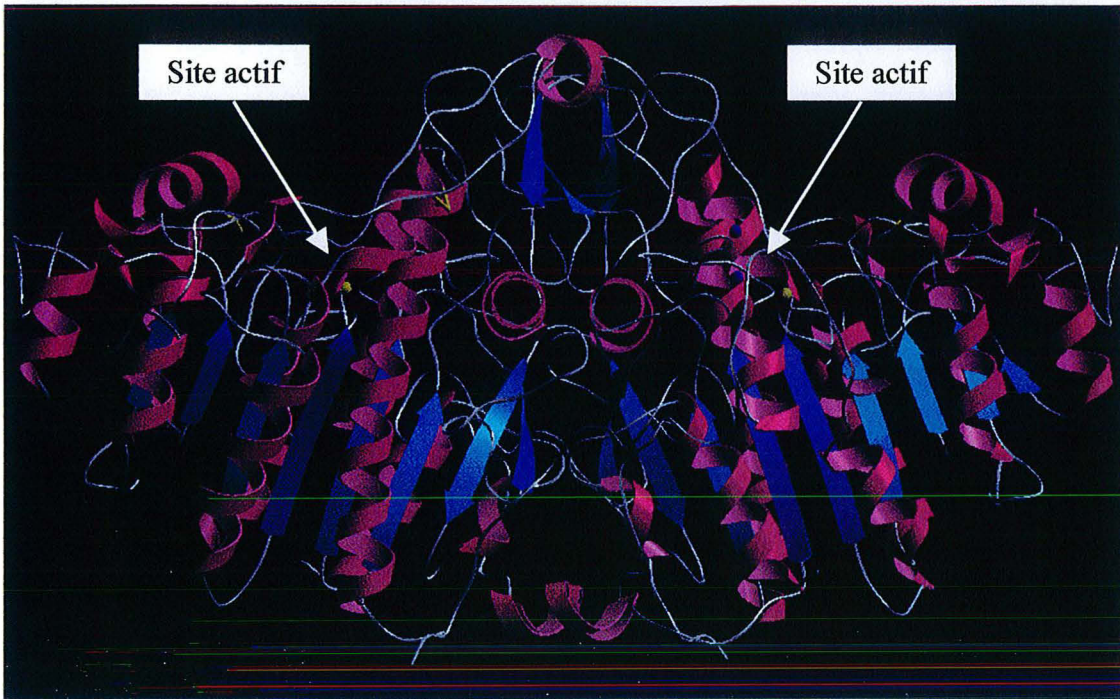


Figure I.1. Structure tridimensionnelle de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Les principales structures secondaires sont représentées en rubans, bleus pour les brins β , roses pour les hélices α . La triade métallique du site catalytique est visible sur la sous-unité de droite [Evan Kantrowitz, d'après les données cristallographiques de Kim & Wyckoff, 1991].

III.3.2. Structure du site actif

La phosphatase alcaline est un homodimère comportant un site actif dans chacune de ses sous-unités. Les deux sites actifs de l'enzyme sont séparés d'environ 30 Å. Chaque sous-unité comprend tous les acides aminés nécessaires à la formation d'un site actif complet. Ce dernier forme une poche en surface du monomère. La surface intérieure de cette poche est très réduite.

Chaque site actif est formé d'un résidu aminé sérine nucléophile, d'un site de fixation du phosphate et de trois sites de fixation de métaux, appelés M1, M2 et M3. Les sites M1 et M2 sont occupés par des ions Zn^{2+} , et sont également nommés Zn1 et Zn2. Le site M3 fixe quant à lui un ion Mg^{2+} , et est donc appelé parfois le site Mg. Les sites Zn1 et Zn2 sont distants de 4 Å, tandis que Mg est à respectivement 7 Å et 4 Å de Zn1 et Zn2. Le site actif est présenté

figure I.2. La droite formée par Mg et Zn2 est perpendiculaire à celle formée par les deux atomes de zinc. La structure globale du site actif, notamment le positionnement des métaux et des ligands, est similaire à celle de sites actifs observés dans d'autres phosphoestérases, comme la phospholipase C de *Bacillus cereus* et la nucléase P1 de *Penicillium citrinum*, bien que les séquences de ces enzymes ne partagent pas de similarité [Stec *et al.*, 1998].

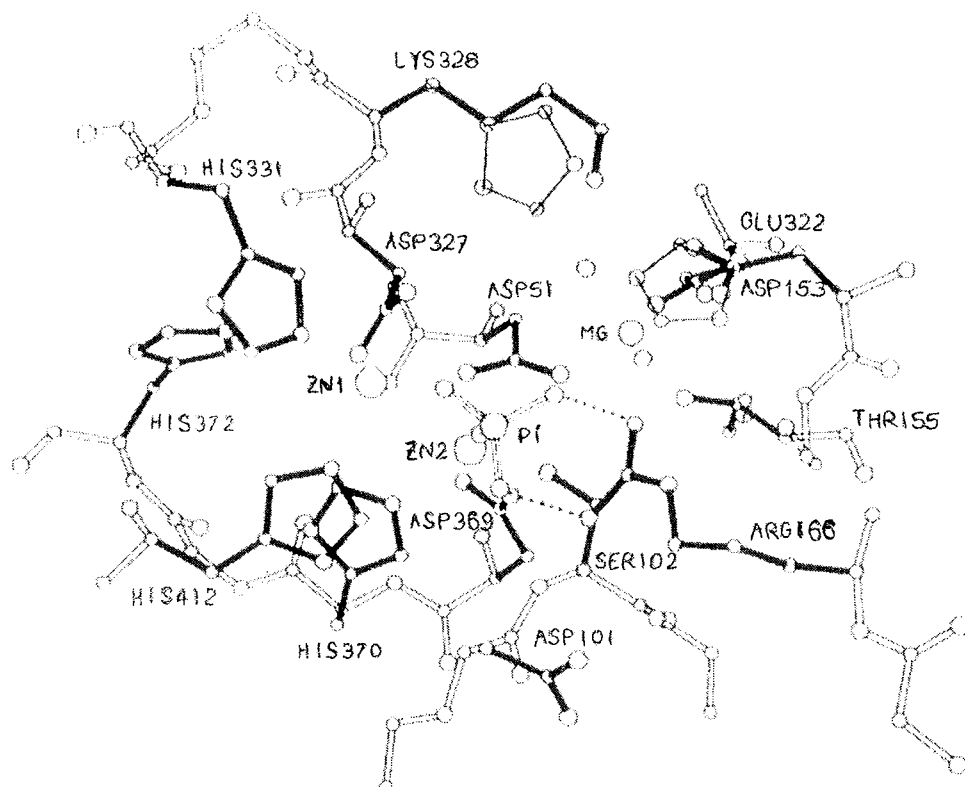


Figure I.2. Le site actif de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Quelques résidus aminés ainsi que les molécules d'eau ne sont pas représentés par souci de clarté. Les résidus Asp153 et Lys328 sont substitués par des histidines chez d'autres espèces (cf. paragraphes IV.2.2.), ces substitutions sont représentées en traits fins sur les résidus concernés [d'après Kim & Wyckoff, 1989].

III.3.2.1. Le résidu sérine nucléophile : Ser102

Ce résidu est nommé Ser102 d'après sa position sur la séquence peptidique de la phosphatase alcaline mature. Il joue le rôle de nucléophile lors de la catalyse enzymatique, formant l'intermédiaire de réaction phosphosérine. Cependant, tandis que la sérine est un nucléophile particulièrement efficace, l'étude d'enzymes mutantes a permis de montrer que ce résidu n'était pas absolument nécessaire à la catalyse enzymatique. Des mutants S102C, S102A, S102G et S102L permettent en effet une dégradation du substrat, certes 10^3 - 10^4 fois plus faible que l'enzyme native, mais 10^5 - 10^7 fois plus importante que la dégradation non-

enzymatique [Holtz & Kantrowitz, 1999]. Ceci met en évidence à la fois le rôle déterminant de la triade métallique pour réaliser la catalyse, mais aussi l'importance du résidu S102 qui permet le déroulement optimal de la réaction.

III.3.2.2. Le site de fixation de métal M1

Le site de fixation de métal M1 (figure I.3) est occupé par un ion Zn^{2+} . Ce dernier est penta-coordonné par : les deux atomes d'oxygène du groupement carboxylate d'Asp327, un atome d'azote des groupements imidazoles de chacun des résidus His331 et His412, l'un des atomes d'oxygène du groupement phosphate du substrat. Le zinc fixé sur le site M1 (Zn1) joue un rôle essentiel dans le mécanisme de la catalyse exercée par l'enzyme [Kim & Wyckoff, 1991] : il stabilise la charge négative du groupe partant du substrat dans le complexe non-covalent enzyme-substrat, et, il active la molécule d'eau qui attaque l'atome de phosphore de l'intermédiaire phosphosérine dans le complexe covalent enzyme-phosphate.

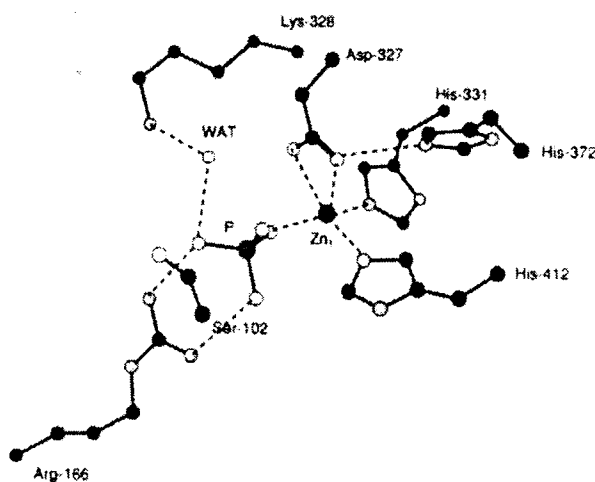


Figure I.3. Coordination de Zn1 et du phosphate dans le site actif de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Les lignes en pointillées représentent les interactions électrostatiques [Xu *et al.*, 1994]

III.3.2.3. Le site de fixation de métal M2

Le site de fixation de métal M2 (figure I.4) est également occupé par un ion Zn^{2+} . Il est tétra-coordonné par un atome d'oxygène de chacun des groupements carboxylates des résidus Asp51 et Asp369, un atome d'azote du groupement imidazole de l'His370, ainsi qu'un atome d'oxygène du phosphate du substrat. Le résidu Asp51 est également en interaction avec l'ion Mg^{2+} du site de fixation M3. Dans le mécanisme réactionnel, le zinc en position M2 (Zn2) favorise la formation de l'oxyanion sérine qui peut réagir avec le phosphate du substrat. De plus, il permet de positionner ce même groupement phosphate pour l'attaque nucléophile.

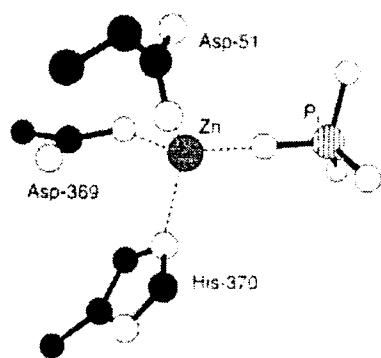


Figure I.4. Coordination de Zn^{2+} dans le site actif de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Les lignes en pointillées représentent les interactions électrostatiques [Tibbitts *et al.*, 1994].

III.3.2.4. Le site de fixation de métal M3

Le troisième site de fixation de métal est quant à lui occupé par un atome de Mg^{2+} (figure I.5). Ce dernier est stabilisé dans un site octaédrique par le groupement hydroxyle du résidu Thr155, un atome d'oxygène de chacun des groupements carboxylates des résidus Glu322 et Asp51, et trois molécules d'eau. Le résidu Asp51 permet à l'atome de Mg^{2+} d'interagir avec Zn^{2+} . Parmi les trois molécules d'eau, deux sont stabilisées par le groupement carboxyle du résidu Asp153, ce dernier formant également un pont salin avec le résidu Lys328. Lys328 interagit avec le phosphate du substrat via une molécule d'eau. Asp153 et Lys328 sont appelés les ligands secondaires du Mg^{2+} .

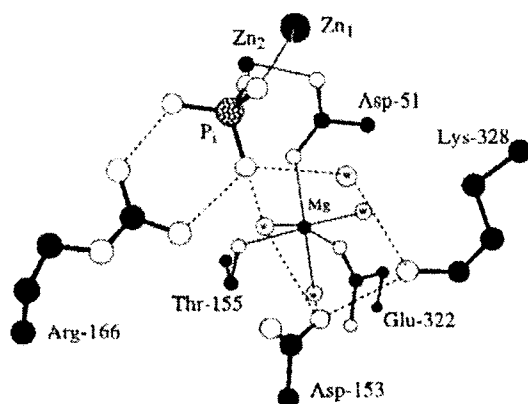


Figure I.5. Coordination de Mg et du groupement phosphate. Les lignes en pointillées représentent les interactions électrostatiques. w : H_2O [Sun *et al.*, 1999].

III.3.2.5. Le site de fixation du phosphate

La phosphatase alcaline a été cristallisée en présence de phosphate. L'analyse par rayons X a montré que le groupement phosphate du substrat est maintenu dans le site actif par les deux atomes de zinc des sites M1 et M2, par le groupement guanidium du résidu Arg166, ainsi que

par un certain nombre d'interactions avec des molécules d'eau. Parmi ces dernières, certaines permettent de le relier au Mg^{2+} du site M3 et au résidu Lys328. La poche formée par le site actif ne permet que la pénétration du groupement phosphate du substrat, laissant le groupe partant R exposé au solvant. Ceci constitue une explication, à l'échelle moléculaire, de l'aspécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat. Le positionnement du groupement phosphate dans le site actif est présenté figures I.3 et I.5.

III.4. MECANISME REACTIONNEL

En 1958, il avait été montré que de la phosphosérine pouvait être isolée de la phosphatase alcaline intestinale bovine après incubation en présence d'orthophosphate marqué au ^{32}P à pH acide. Des résultats similaires ont ensuite été obtenus avec l'enzyme d'*E. coli* et une séquence peptidique contenant de la phosphosérine a été obtenue. Il a alors été conclu qu'un résidu sérine de l'enzyme est phosphorylé lors de la réaction d'hydrolyse [d'après la revue de McComb *et al.*, 1979].

III.4.1. Réactions catalysées

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse d'une grande variété de monoesters de phosphate avec une efficacité similaire, produisant l'alcool correspondant et du phosphate inorganique. En présence d'un accepteur de phosphate tel que l'éthanolamine ou le Tris, l'enzyme peut également catalyser une réaction de transphosphorylation en transférant le groupement phosphoryle du substrat sur une fonction alcool de l'accepteur [d'après la revue de McComb *et al.*, 1979]. La figure I.6 présente ces réactions.

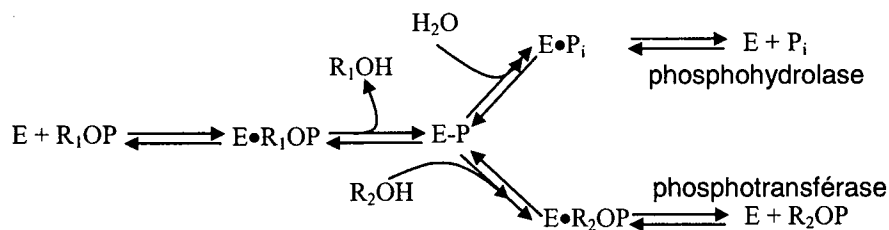


Figure I.6. Réactions catalysées par la phosphatase alcaline (E). R_1OP , substrat ; $E \cdot R_1OP$, intermédiaire non-covalent enzyme-substrat ; $E-P$, intermédiaire covalent enzyme-substrat ; R_2OP , accepteur de phosphate ; $E \cdot P_i$ et $E \cdot R_2OP$, intermédiaires non-covalents enzyme-produit ; P_i , phosphate inorganique [Kim & Wyckoff, 1991].

III.4.2. Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Etant donné que l'activité de la phosphatase alcaline est très peu spécifique du groupe partant du substrat, l'intérêt principal d'un substrat pour l'étude de cette enzyme est la facilité avec laquelle l'avancement de la réaction enzymatique peut être mesuré. Le substrat le plus communément utilisé est le *p*-nitrophénylphosphate (*p*NPP) qui est hydrolysé par la phosphatase alcaline en phosphate inorganique et en *p*-nitrophénolate (*p*NP). Ce dernier est un composé jaune, doté d'un maximum d'absorbance à 410 nm et d'un coefficient d'extinction élevé à pH alcalin. La réaction enzymatique est ainsi facilement mesurée par spectrophotométrie en suivant le changement d'absorbance à 410 nm au cours du temps. De plus, le choix du tampon doit tenir compte du fait que la phosphatase alcaline peut catalyser une réaction de transphosphorylation, en plus de l'hydrolyse. La réaction d'hydrolyse est réalisée seule en absence d'accepteur de phosphate, par exemple en tampon MOPS, CAPS ou même en tampon Tris à des faibles molarités (10 mM). La combinaison des réactions d'hydrolyse et de transphosphorylation est quant à elle mesurée à de fortes molarités en tampon Tris ou éthanolamine. La vitesse de réaction est plus élevée en présence d'un accepteur de phosphate qu'en son absence car la présence de ce dernier accélère la libération du phosphate du complexe non-covalent enzyme-phosphate [d'après la revue de McComb *et al.*, 1979].

III.4.3. D'autres substrats

Les phosphatases alcalines sont par définition des « phosphohydrolases de monoesters d'orthophosphate (à optimum alcalin) », E. C. 3.1.3.1. (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). La phosphatase alcaline d'*E. coli* ne catalyse ainsi pas d'hydrolyse de diesters ou de triesters de phosphate. En revanche, elle est capable de catalyser l'hydrolyse de divers composés contenant des liaisons C-S-P ou C-N-P au niveau des liaisons équivalentes à celle désignée par O-P chez les monoesters de phosphate (c'est-à-dire, les liaisons S-P et N-P). La vitesse d'hydrolyse de phosphoramidites (R-NHPO₃H₂) s'est avérée être de l'ordre de 30 à 60% de celle du *p*NPP, avec une légère dépendance vis-à-vis du groupe partant R. L'hydrolyse de phosphoromonothioesters [R-SP(:O)(OH)₂] est pH-dépendante, avec des K_m et V_{max} similaires à ceux obtenus pour l'hydrolyse du *p*NPP. Cependant, les phosphorothioates [R-OP(:S)(OH)₂] se sont avérés être de mauvais substrats : l'hydrolyse de *p*-nitrophénylphosphorothioate représente seulement 1 % de celle du *p*NPP, et le K_m vis-à-vis

du phosphorothioate est huit fois plus élevé que celui obtenu avec le *p*NPP [d'après les revues de McComb *et al.*, 1979 ; Coleman, 1992].

III.4.4. Inhibition de la phosphatase alcaline

L'inhibiteur compétitif classique de la phosphatase alcaline est l'orthophosphate, qui est l'un des produits de la réaction et dont le relargage est une étape limitante à pH alcalin. Les autres inhibiteurs compétitifs connus sont des composés qui « miment » le produit de la réaction. Il s'agit de l'orthoarsenate, du périodate, du permanganate et du vanadate. Du fait que la phosphatase alcaline n'hydrolyse pas les liaisons C-P, les composés de type phosphonate peuvent également se comporter en inhibiteurs compétitifs [d'après la revue de McComb *et al.*, 1979].

III.4.5. Etapes déterminantes du mécanisme réactionnel

Les différentes étapes du mécanisme sont dépendantes du pH. A pH acide, l'hydrolyse du complexe covalent enzyme-phosphate est l'étape limitante ; tandis qu'à pH alcalin, c'est le relargage du phosphate du complexe non-covalent enzyme-phosphate qui est limitant [d'après la revue de Coleman, 1992].

III.4.6. Mécanisme proposé pour la réaction d'hydrolyse

Le mécanisme catalytique de la phosphatase alcaline d'*E. coli* a fait l'objet de nombreuses études cinétiques [Coleman, 1992] et structurales [Kim & Wyckoff, 1989 et 1991]. Un mécanisme réactionnel détaillé a été proposé sur les bases des résultats obtenus par RMN, cristallographie rayon X et mutagenèse dirigée. Ces travaux ont permis d'élaborer deux modèles du mécanisme réactionnel, l'un faisant intervenir uniquement les deux atomes de zinc, l'autre ajoutant l'influence de l'atome de magnésium.

III.4.6.1. Catalyse à deux ions métalliques

Ce modèle a été décrit par Kim et Wyckoff en 1991. La réaction d'hydrolyse, catalysée par la phosphatase alcaline, peut être divisée en deux étapes : (1) le transfert du groupement phosphoryle du substrat sur l'enzyme, et (2) l'hydrolyse de la phosphosérine afin de régénérer

l'enzyme. Lors de la première étape, Zn2 interagit avec le groupement hydroxyle du résidu S102, stabilisant la forme déprotonée de la sérine nécessaire à l'attaque nucléophile sur le phosphore du substrat. Pendant ce temps, Zn1 stabilise la charge négative sur le groupe partant. Dans la seconde étape, Zn1 abaisse le pK_a d'une molécule d'eau coordonnée permettant à celle-ci de se comporter en nucléophile, tandis que Zn2 stabilise la charge négative du groupement hydroxyle de la sérine.

Lors de la réaction de transphosphorylation, Zn1 active l'alcool accepteur au lieu d'activer la molécule d'eau. Dans ce modèle de mécanisme réactionnel, la présence d'un site de fixation du groupement R du monoester de phosphate n'est pas précisée, ce qui est en accord avec l'aspécificité de substrat de l'enzyme démontrée expérimentalement.

La figure I.7 présente ce mécanisme catalytique à deux ions métalliques.

III.4.6.2. La catalyse à trois ions métalliques

Ce mécanisme est une mise à jour du modèle précédent, permettant d'expliquer le rôle de l'ion Mg^{2+} . Il a été proposé en 2000 par Stec *et al.* et est présenté figure I.8. Au cœur de l'enzyme libre (E), trois molécules d'eau occupent le site de fixation du phosphate. Le groupement hydroxyle du résidu S102 forme une liaison hydrogène avec un ion hydroxyde stabilisé par l'atome de Mg. La formation du complexe enzyme-substrat (E•ROP) implique la coordination du groupement phosphate du substrat par Zn1, Zn2 et le groupement guanidium du résidu R166. Vis-à-vis du groupement phosphate, le résidu S102 se trouve à l'opposé du groupe partant (R). Lors de la fixation du substrat, un ion hydroxyde stabilisé par l'atome de Mg permet la déprotonation du groupement hydroxyle de S102, le rendant prêt pour l'attaque nucléophile sur l'atome de phosphore du substrat. La formation de l'intermédiaire covalent enzyme-substrat (E-P) résulte de cette attaque nucléophile, inversant la conformation du phosphate et provoquant le départ du radical RO^{\cdot} . Un ion hydroxyde nucléophile, stabilisé par Zn1, attaque alors le phosphore de l'intermédiaire covalent E-P, aboutissant à la formation de l'intermédiaire non-covalent enzyme-phosphate (E·P_i) et inversant à nouveau la conformation du phosphate. La molécule d'eau, stabilisée par Mg, agit maintenant en acide en donnant un proton au groupement hydroxyle du résidu S102.

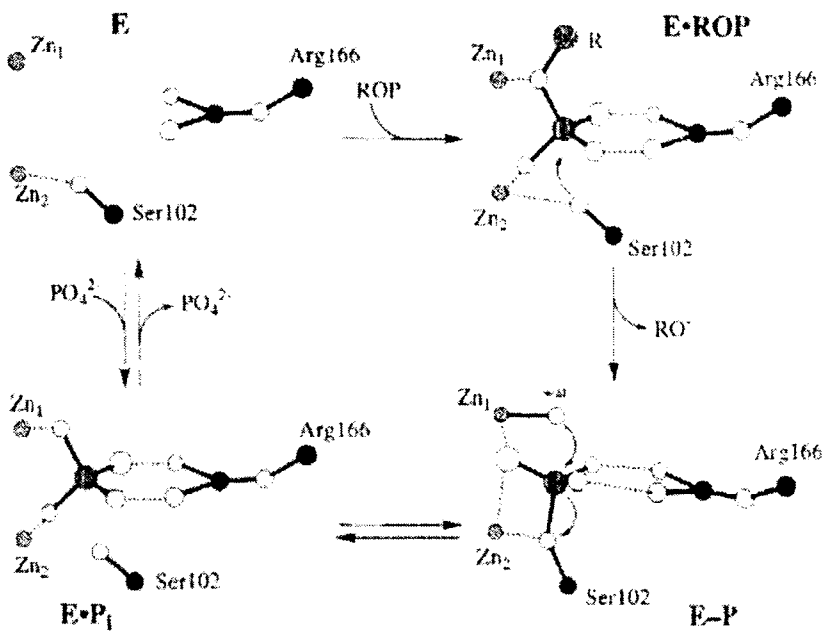


Figure 1.7. Mécanisme réactionnel à deux ions métalliques, de la phosphatase alcaline d'*E. coli* [Kim & Wyckoff, 1991]. E ; enzyme ; E•ROP, intermédiaire non-covalent enzyme-substrat ; E-P, intermédiaire covalent enzyme-susbrat ; E•P_i, intermédiaires non-covalent enzyme-produit ; wat, molécule d'H₂O.

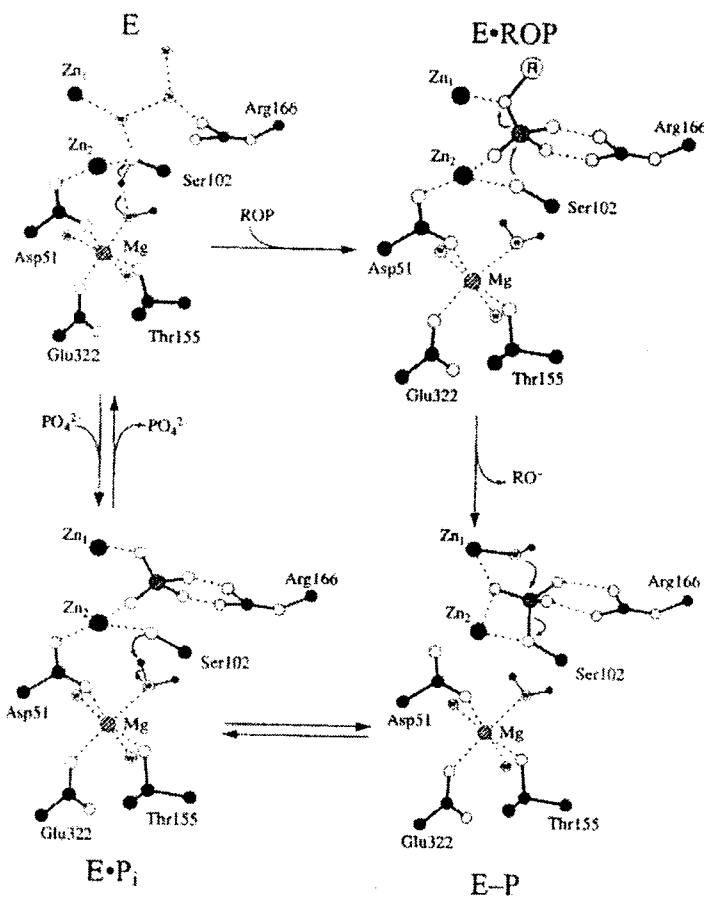


Figure 1.8. Mécanisme réactionnel à trois ions métalliques, de la phosphatase alcaline d'*E. coli* [Stec *et al.*, 2000]. E ; enzyme ; E•ROP, intermédiaire non-covalent enzyme-substrat ; E-P, intermédiaire covalent enzyme-susbrat ; E•P_i, intermédiaires non-covalent enzyme-produit ; wat, molécule d'H₂O.

Bien qu'il ne fasse pas intervenir l'ion Mg^{2+} , le mécanisme à deux ions métalliques peut suffire à expliquer l'activité de l'enzyme. Il a en effet été montré expérimentalement que la phosphatase alcaline d'*E. coli* est active en absence de magnésium dans son site actif [Coleman, 1992]. Le mécanisme à trois ions métalliques explique quant à lui le fonctionnement optimal de l'enzyme.

III.5. CONCLUSION

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est, de loin, l'enzyme la mieux connue de cette famille. Elle a été étudiée sous de nombreux aspects : biosynthèse, structure, mécanisme réactionnel, etc... Ces connaissances sont d'une grande importance dans la mesure où elles font de cette enzyme un modèle d'étude des autres phosphatases alcalines.

Le chapitre suivant permet de faire le point sur les données principales concernant les phosphatases alcalines issues de divers organismes, en insistant particulièrement sur les caractéristiques qui les démarquent de l'enzyme d'*E. coli*.

IV. CONNAISSANCES COMPLEMENTAIRES RELATIVES AUX PHOSPHATASES ALCALINES

IV.1. BIOSYNTHESE DES PHOSPHATASES ALCALINES

IV.1.1. Le régulon Pho

L'organisation génétique de la synthèse de phosphatase alcaline est bien comprise chez *E. coli* (cf. paragraphe III.1.). Elle a également été très étudiée chez *Bacillus subtilis* où un régulon Pho a aussi été décrit. Un opéron *phoPR* permet la synthèse de deux protéines régulatrices PhoP et PhoR. Cette dernière est une histidine kinase, possédant une propriété d'autophosphorylation. Elle peut phosphoryler PhoP qui, alors activée, induit la transcription des gènes codant pour les phosphatases alcalines III et IV (ou A et B, respectivement) de *Bacillus subtilis*. Un autre opéron codant également pour un couple de protéines régulatrices,

resDE, ainsi qu'un autre gène, *spo0A*, codant pour une autre protéine régulatrice, seraient impliqués dans la régulation de la synthèse des phosphatases alcalines, en amont de l'opéron *phoPR* [Hulett, 1996].

Enfin, les éléments d'un régulon Pho ont été identifiés chez la bactérie *Shigella flexneri* [Scholten *et al.*, 1995].

IV.1.2. Régulation

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est une enzyme dont la synthèse est réalisée en conditions limitantes en phosphate inorganique extracellulaire (cf. paragraphe III.2.). Ce cas de figure a été décrit chez de nombreux autres micro-organismes. De nombreuses phosphatases alcalines sont en effet synthétisées lorsque le phosphate inorganique vient à manquer dans le milieu. C'est le cas des enzymes d'*Haloarcula marismortui* [Goldman *et al.*, 1990], de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* [Huang *et al.*, 1998], de *Vibrio* sp. [Hauksson *et al.*, 2000], etc... Cependant, certains micro-organismes, la situation s'avère plus complexe. Ainsi, la synthèse de phosphatase(s) alcaline(s) peut dépendre de l'état physiologique des cellules. C'est le cas de *Bacillus subtilis* qui en produit deux au stade de cellules végétatives, tandis qu'il en produit au moins deux autres au moment de la sporulation [Hulett *et al.*, 1990]. De plus, la synthèse de ces enzymes n'est pas forcément régulée par la concentration extracellulaire en phosphate inorganique. *Neurospora crassa* produit trois phosphatases alcalines, dont deux ont une synthèse inductible en conditions limitantes en phosphate tandis que la synthèse de la troisième est constitutive [Morales *et al.*, 2000]. De même, *Serratia marcescens* sécrète deux phosphatases alcalines, l'une indépendamment des conditions limitantes en phosphate et l'autre non [Bhatti *et al.*, 2000].

IV.2. SPECIFICITES DES PHOSPHATASES ALCALINES MAMMIFERES

IV.2.1. Caractéristiques générales

La plupart des propriétés mises en évidence chez les phosphatases alcalines bactériennes, symbolisées par l'enzyme d'*E. coli*, ont été vérifiées chez leurs homologues issues de mammifères [McComb *et al.*, 1979]. Cependant, ces dernières présentent des caractéristiques spécifiques. Cela fait longtemps que l'on sait qu'elles sont de tailles plus importantes (120 à 140 kDa contre 90 à 100 kDa pour les phosphatases alcalines issues de procaryotes) et sont

glycosylées [McComb *et al.*, 1979]. De plus, elles sont ancrées à la face externe de la membrane cellulaire par un groupement prosthétique phosphatidylinositol-glycane en C-terminal de la chaîne peptidique. Ce groupement est attaché à la protéine post-traductionnellement dans le reticulum endoplasmique après clivage d'une zone hydrophobe en C-terminal de la chaîne peptidique [Ferguson & Williams, 1988].

IV.2.2. Nature et régulation de l'activité catalytique

L'activité des phosphatases alcalines issues de mammifères est 20 à 30 fois plus importante que celle des enzymes bactériennes et leur pH optimal est plus élevé [Murphy & Kantrowitz, 1994]. En outre, contrairement aux observations concernant l'enzyme d'*E. coli*, les phosphatases alcalines mammifères sont activées par ajout de magnésium exogène. Les résidus aminés impliqués dans le site actif, décrit précédemment pour *E. coli* (cf. paragraphe III.3.), sont conservés, à l'exception des deux ligands secondaires du magnésium, à savoir D153 et K328. Chez les mammifères, les deux résidus correspondant sont des histidines. L'environnement de l'atome de magnésium est ainsi différent. Des travaux sur la phosphatase alcaline d'*E. coli* ont permis d'établir que ce site, originellement octaédrique, devient tétraédrique lorsque, par mutagenèse dirigée, les ligands secondaires de Mg sont remplacés par deux résidus histidines [Murphy *et al.*, 1993]. Le nouveau site de fixation d'ion métallique obtenu a beaucoup plus d'affinité pour le zinc que pour le magnésium. Enfin, l'enzyme mutante obtenue présente de nouvelles caractéristiques, similaires à celles décrites en début de paragraphe à propos des phosphatases alcalines mammifères en terme d'activité, de pH optimal et de dépendance au magnésium [Murphy *et al.*, 1995]. Il a donc été proposé que les deux résidus aminés du site actif qui diffèrent entre les séquences des phosphatases alcalines mammifères et d'*E. coli* sont responsables des propriétés spécifiques à chacune de ces enzymes.

De plus, il a été montré que les phosphatases alcalines mammifères sont des enzymes allostériques dont la stabilité et les propriétés catalytiques de chacune des sous-unités sont dépendantes de la sous-unité voisine [Hoylaerts *et al.*, 1997].

Enfin, certains L-acides aminés, tels que la L-leucine et la L-phénylalanine, sont des inhibiteurs non-compétitifs des phosphatases alcalines mammifères [Hoylaerts *et al.*, 1992]. Notons qu'une telle propriété a été mise en évidence ailleurs que chez les mammifères, notamment chez les poissons [Ásgeirsson *et al.*, 1995] et les insectes [Eguchi, 1995].

IV.3. Le cas des phosphatases alcalines humaines

Les phosphatases alcalines humaines sont les enzymes les plus étudiées de cette famille après la phosphatase alcaline d'*E. coli*. Il y a au moins quatre gènes codant pour autant de phosphatases alcalines distinctes chez les humains. Ces isoformes ont été référencées selon leur localisation dans les différents tissus, et sont les formes placentaire [Kam *et al.*, 1985], de cellule germinale [Millán, 1986], intestinale [Berger *et al.*, 1987] et hépatique/osseuse/rénale ou tissu-aspécifique [Weiss *et al.*, 1986]. Les gènes codant pour ces quatre isoformes ont été localisés dans le génome humain. Le gène codant pour la forme aspécifique se trouve sur le chromosome n°1 tandis que les trois autres sont sur le chromosome n°2 [Harris, 1989].

Comme toutes les phosphatases alcalines mammifères, les enzymes humaines sont ancrées à la surface des cellules par un groupement phosphatidylinositol-glycane en C-terminal [Ferguson & Williams, 1988]. De plus, les phosphatases alcalines humaines sont glycosylées. Par exemple, les formes placentaires et de cellule germinale montrent deux sites de N-glycosylation, N122 et N249 [Millán, 1986]. Le rôle physiologique des phosphatases alcalines, bien qu'il ne soit pas très bien compris, est sujet à d'intenses spéculations. Cependant, il semble que la forme hépatique/osseuse/rénale joue un rôle essentiel dans la minéralisation. Cette hypothèse a été renforcée quand il a été montré que l'hypophosphatasie, maladie génétique rare, dont les symptômes sont une déficience en minéralisation des os, était associée à une très faible activité de la phosphatase alcaline hépatique/osseuse/rénale résultant de mutations sur le gène codant pour cette enzyme [Weiss *et al.*, 1988]. L'hypophosphatasie est caractérisée par de faibles concentrations en phosphatase alcaline hépatique/osseuse/rénale dans le sérum, tandis que les formes placentaire et intestinale sont présentes à des concentrations normales. De plus, cela s'accompagne d'une accumulation de certains composés (phosphoéthanolamine, pyridoxal 5-phosphate, pyrophosphosphate inorganique), supposés être les substrats physiologiques de la phosphatase alcaline hépatique/osseuse/rénale. La gravité de l'hypophosphatasie va de la mort *in utero* à des fractures osseuses chez l'adulte.

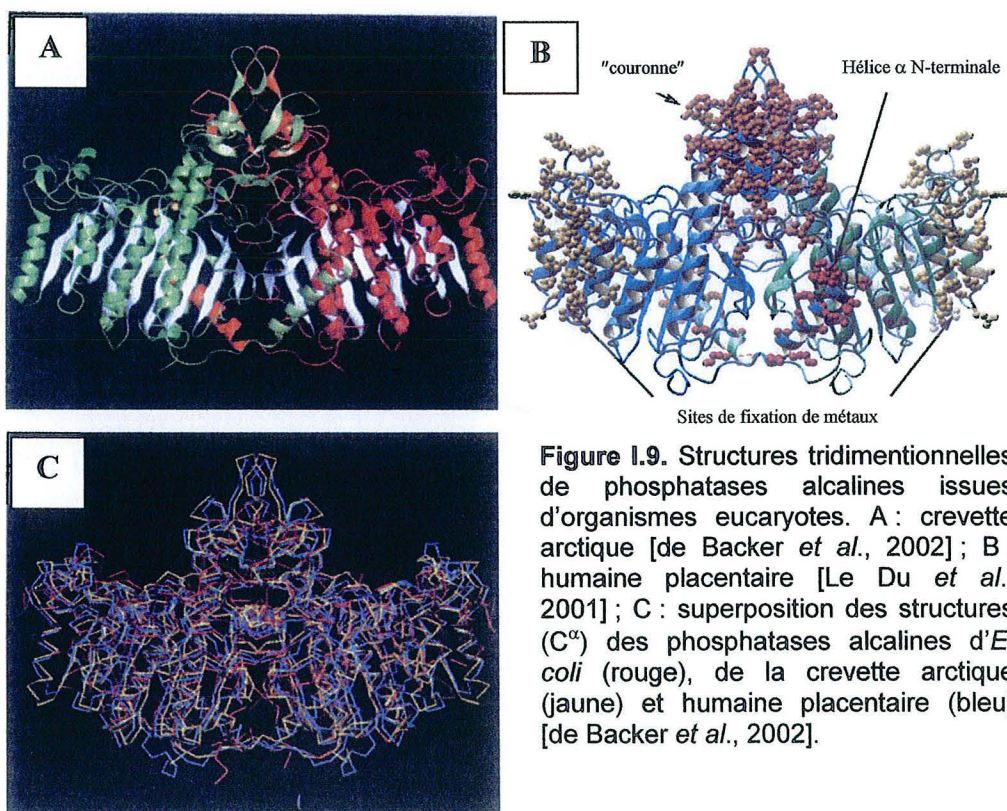
IV.3. STRUCTURES ELUCIDEES A CE JOUR

En terme de structure, seules trois phosphatases alcalines ont vu leur conformation tridimensionnelle élucidée. Il s'agit des phosphatases alcalines d'*E. coli* (cf. paragraphe

III.3.), de *Pandalus borealis* (crevette arctique, [de Backer *et al.*, 2002]) et de la phosphatase placentaire humaine [Le Du *et al.*, 2001]. Ces trois enzymes montrent une structure générale assez similaire (figure I.9). Pour chaque sous-unité, le cœur de celles-ci est en effet constitué d'un feuillet β central à 10 brins. Cependant, des spécificités intéressantes ont été observées.

Les phosphatases alcalines de crevette et humaine comportent au sommet du dimère un ensemble de six brins β courts, appelé le « domaine en couronne ». De plus, chaque monomère de la phosphatase alcaline de crevette comporte une triade métallique de zinc, au lieu des deux atomes de zinc et de l'atome de magnésium classiquement observés. Comparée aux deux autres phosphatases, cette enzyme a une charge de surface négative. Cette propriété serait une signature de l'adaptation aux basses températures.

En ce qui concerne les propriétés de la phosphatase alcaline humaine placentaire, sa structure comprend quelques éléments spécifiques relatifs à ses caractéristiques catalytiques. Ainsi, les résidus de surface et ceux de l'interface entre les deux sous-unités de l'homodimère sont très peu conservés. Cette observation semble être liée à la propriété d'allostérie des phosphatases alcalines mammifères. De plus, certains résidus semblent impliqués dans des phénomènes d'inhibition non-compétitive par des L-acides aminés. Enfin, bien que le(s) substrat(s) physiologique(s) de la phosphatase alcaline placentaire humaine ne soi(en)t pas connus, la structure du site actif laisse penser qu'il pourrait s'agir de phosphoprotéines.



IV.4. APPROCHE BIO-INFORMATIQUE

Depuis une vingtaine d'années, l'accumulation des séquences peptidiques dans les bases de données ainsi que le développement de logiciels de traitement de ces séquences (alignement de structures primaires, prédiction de structures secondaires, etc...) ont apporté beaucoup d'informations sur de nombreuses protéines et en particulier sur les phosphatases alcalines. Les alignements de séquences peptidiques de phosphatases alcalines rapportés dans la littérature indiquent classiquement 25 à 30% de résidus conservés entre les phosphatases bactériennes et mammifères [Kim & Wyckoff, 1989]. Ces comparaisons de séquences révèlent une forte conservation d'une part, du site actif, et d'autre part, des principaux éléments de structures secondaires (le feuillet β central) [Kim & Wyckoff, 1989 ; Hulett *et al.*, 1991]. La conservation du site actif se caractérise par la présence, chez toutes ces enzymes, de résidus aminés identiques impliqués dans : (i) la fixation du groupement phosphate du substrat, (ii) la formation de l'intermédiaire de réaction covalent phosphosérine, (iii) la fixation des métaux impliqués dans la catalyse enzymatique. Ces résidus aminés ont été décrits au cours des chapitres précédents. De plus, les résidus ligands secondaires de l'atome Mg^{2+} sont différents entre les phosphatases alcalines bactériennes et mammifères. De même, cela a été évoqué précédemment et ne sera pas détaillé dans ce chapitre.

De plus, l'approche bio-informatique a permis mettre en évidence des similarités entre les phosphatases alcalines et des enzymes aux fonctions différentes mais qui semblent partager un mécanisme d'action et une structure de leur site actif similaires. Il avait en effet déjà été établi que le site actif de la phosphatase alcaline d'*E. coli* est similaire à celui d'autres phosphoestérases, telles que la phospholipase C de *Bacillus cereus* et la nucléase P1 de *Penicillium citrinum* [Stec *et al.*, 1998]. Bien que ces enzymes partagent peu d'homologies de séquences, la configuration de leur site actif, notamment en ce qui concerne les métaux et leurs ligands, est très similaire. Plus récemment, les travaux de Galperin et Jedrzejewski ont permis de regrouper plusieurs enzymes sous le terme générique de « superfamille des phosphatases alcalines ». Cette superfamille comprend : (i) bien sûr, les phosphatases alcalines, (ii) les sulfatases, (iii) les phosphopentomutases, et (iv) les phosphoglycérate mutases cofacteur-indépendantes [Galperin *et al.*, 1998]. Ces enzymes partagent d'une part la présence d'un doublet métallique (zinc ou manganèse) nécessaire à la catalyse enzymatique au niveau de leur site actif, d'autre part la présence d'un résidu aminé impliqué dans la formation d'un intermédiaire covalent de réaction (sérine, thréonine ou cystéine) [Galperin & Jedrzejewski, 2001 ; Jedrzejewski & Setlow, 2001]. Ces travaux d'analyse bio-informatique semblent

indiquer que les enzymes de cette superfamille, qui sont très largement représentées dans la nature, pourraient avoir divergé à partir d'un ancêtre commun et s'être adaptées à différents mécanismes cellulaires.

IV.5. CONCLUSION

De nombreuses informations sont disponibles concernant les phosphatases alcalines. Les travaux réalisés sur l'enzyme d'*E. coli* ont permis d'établir un modèle de départ qui a trouvé un écho dans la biochimie d'autres phosphatases alcalines, notamment celles d'origine mammifère. Des similarités de structures, à la fois globale et locale (site actif), ont été mises en évidence. Des spécificités ont également pu être décrites (inhibition non-compétitive, allostérie, etc...). Enfin, la comparaison des séquences peptidiques de phosphatases alcalines avec d'autres enzymes a abouti à la création de la superfamille des phosphatases alcalines, rassemblant des enzymes partageant un mécanisme d'action similaire.

MICRO-ORGANISMES THERMOSTABLES	THERMOPHILES	ET	ENZYMES
---	---------------------	-----------	----------------

I. L'HYPERTHERMOPHILIE

I.1. L'EXTREMOPHILIE

En 1995, Kristjánsson et Hreggvidsson proposent une définition des habitats extrêmes. Ils s'appuient sur un consensus général pour définir un environnement normal (température entre 4°C et 40°C, pH entre 5 et 8,5, salinité entre celle de l'eau douce et l'eau de mer) et proposent qu'un habitat extrême est un milieu dont un des facteurs environnementaux sort de la gamme observée pour un environnement normal. Cette définition est certes anthropocentrique mais a le mérite de délimiter simplement les principaux biotopes extrêmes, caractérisés par de faibles ou fortes températures, des pHs acides ou alcalins, de fortes salinités, etc...

Un micro-organisme extrémophile est ainsi défini par sa capacité à se développer dans un habitat extrême. Selon ce dernier, il sera qualifié de : (i) *psychrophile* (faible température), (ii) *thermophile* (forte température), (iii) *acidophile* (pH acide), (iv) *alcalophile* (pH alcalin), (v) *halophile* (forte salinité). En fonction du type d'habitat, un micro-organisme extrémophile peut mêler plusieurs de ces caractéristiques. Enfin, les exemples cités ci-dessus correspondent aux milieux les plus étudiés, mais ce ne sont pas les seuls. En effet, plus récemment, les milieux à haute pression ont fait l'objet de travaux pour comprendre la biologie et la biochimie des micro-organismes dits *barophiles*.

I.2. UN CAS PARTICULIER : L'HYPERTHERMOPHILIE

I.2.1. Thermophilie et hyperthermophilie

La thermophilie et l'hyperthermophilie sont un cas particulier de l'extrémophilie lié à la préférence d'un micro-organisme à croître à haute température. D'après Madigan *et al.* (2000), un micro-organisme thermophile (ou thermophile modéré) est caractérisé par une température optimale de croissance située entre 45°C et 80°C. Un micro-organisme

hyperthermophile se développe préférentiellement à des températures supérieures ou égales à 80°C. Toutefois, cette définition n'est pas unique. En effet, la limite inférieure de la thermophilie est souvent admise entre 55°C et 60°C, telle que l'a définie Brock en 1986 [Kristjánsson & Hreggvidsson, 1995]. L'intérêt de cette limite est que, d'une part, les températures inférieures à cette limite sont fréquentes dans la nature tandis que les températures supérieures à 55°C/60°C sont beaucoup plus rares et souvent associées à la présence d'activité géothermique. En outre, 55°C/60°C est la limite supérieure d'existence des organismes eucaryotes.

La limite supérieure de l'hyperthermophilie est, quant à elle, sujette aux découvertes à venir. Elle a été sans cesse repoussée ces dernières décennies, et, à l'heure actuelle, *Pyrolobus fumarii* détient la température maximale de croissance record avec 113°C et une température optimale de croissance de 106°C [Blöchl *et al.*, 1997]. Cependant, d'après les données concernant la stabilité de certaines molécules d'intérêt biologique tel que l'ATP et les acides aminés à haute température, il est peu probable que la vie puisse exister au-delà de 150°C, bien que cette borne supérieure soit l'objet de débats passionnés [Deming & Baross, 1993].

I.2.2. Les hyperthermophiles : biotopes, taxonomie et phylogénie

Des micro-organismes hyperthermophiles ont été isolés de biotopes continentaux et océaniques associés à de l'activité volcanique [Stetter, 1999]. En domaine continental, les principaux habitats sont les sources chaudes acides (ou solfatares) et les sources chaudes alcalines (par exemple, les geysers). En domaine océanique, les sources hydrothermales sont d'excellents refuges pour des écosystèmes constitués de communautés animales et microbiennes profitant du gradient thermique et de l'apport en minéraux des fumeurs noirs [Barbier, 1994 ; Deming, 1998].

D'un point de vue taxonomique, 75 espèces de micro-organismes hyperthermophiles étaient référencées à la fin de l'année 2000, contre seulement deux en 1972, mettant en évidence l'explosion de ce domaine de la microbiologie depuis le début des années 1980 [Huber *et al.*, 2000 ; Vieille & Zeikus, 2001]. Ces 75 espèces peuvent être regroupées dans 32 genres et incluses dans 10 ordres. Le tableau I.1 présente un échantillon représentatif de la diversité de ces espèces.

Tableau I.1. Diversité des hyperthermophiles
 [Stetter, 1999 ; Vieille & Zeikus, 2001]

Espèce	Conditions de croissance	Aérobic (ae)/ Anaérobic(an)	Métabolisme	Biotopes (marin : m ; terrestre : t)	G+C%	Morphologie
Bacteria						
<i>Thermotoga maritima</i>	55-90°C pH 5,5-9	an	Hétérotrophe	m	46	Bâtonnets avec enveloppe
<i>Aquifex pyrophilus</i>	67-95°C pH 5,4-7,5	ae	Chimiolitho-autotrophe	m	40	Bâtonnets
Archaea						
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60-85°C pH 1-5	ae	Hétérotrophe	t	37	Coques lobées
<i>Acidianus infernus</i>	60-95°C pH 1,5-5	ae/an	Chimiolithotrophe stricte	t	31	Coques lobées
<i>Stygiolobus azoricus</i>	57-89°C pH 1-5,5	an	Chimiolitho-autotrophe	t	38	Coques lobées
<i>Thermoproteus tenax</i>	70-97°C pH 2,5-6	an	Chimiolithoauto-trophe facultatif	t	56	Bâtonnets réguliers
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	74-103°C pH 5-7	an	Hétérotrophe facultatif	t	46	Bâtonnets réguliers
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	75-104°C pH 5,8-9	ae/an	Autotrophe/Hétérotrophe	m	52	Bâtonnets réguliers
<i>Thermophilum pendens</i>	70-95°C pH 4-6,5	an	Hétérotrophe	t	57	Bâtonnets fins et réguliers
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	70-95°C pH 4,5-7	an	Hétérotrophe	m	51	Coques
<i>Thermosphaera aggregans</i>	67-90°C pH 5-7	an	Hétérotrophe	t	46	Coques agrégées
<i>Staphylothermus marinus</i>	65-98°C pH 4,5-8,5	an	Hétérotrophe	m	35	Coques agrégées
<i>Thermodiscus maritimus</i>	75-98°C pH 5-7	an	Autotrophe stricte	m	49	Disques
<i>Aeropyrum pernix</i>	70-100°C pH 5-9	ae	Hétérotrophe	m	67	Coques irrégulières
<i>Pyrodictium occultum</i>	82-110°C pH 5-7	an	Autotrophe	m	62	Disques cannelés
<i>Hyperthermus butylicus</i>	80-108°C pH 7	an	Hétérotrophe	m	56	Coques lobées
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90-113°C pH 4-6,5	ae/an	Chimiolitho-autotrophe	m	53	Coques lobées
<i>Thermococcus celer</i>	75-93°C pH 4-7	an	Hétérotrophe stricte	m	57	Coques
<i>Pyrococcus furiosus</i>	70-105°C pH 5-9	an	Hétérotrophe stricte	m	38	Coques
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	60-95°C pH 5,5-7,5	an	Chimiolithoauto-trophe facultatif	m	46	Coques irrégulières
<i>Methanothermus sociabilis</i>	65-97°C pH 5,5-7,5	an	Autotrophe	t	33	Bâtonnets regroupés
<i>Methanopyrus kandleri</i>	84-110°C pH 5,5-7	an	Chimiolitho-autotrophe	m	60	Bâtonnets en chaînes
<i>Methanococcus jannaschii</i>	50-86°C pH 5,5-6,5	an	Autotrophe	m	31	Coques irrégulières
<i>Methanococcus igneus</i>	45-91°C pH 5-7,5	an	Chimiolithoauto-trophe stricte	m	31	Coques irrégulières

La majorité de ces espèces appartiennent au domaine des Archaea. Seules cinq espèces hyperthermophiles bactériennes ont été décrites, elles appartiennent aux ordres des *Thermotogales* et *Aquificales*. Il est intéressant de noter que l'analyse des génomes de deux bactéries hyperthermophiles a montré un pourcentage élevé de gènes ayant de fortes homologies avec des gènes d'Archaea : 24% pour *Thermotoga maritima*, 16% pour *Aquifex aeolicus*. Ceci met en évidence un transfert latéral de gènes entre les Bactéries et les Archaea hyperthermophiles [Nelson *et al.*, 1999 ; Vieille & Zeikus, 2001]. Les espèces bactériennes hyperthermophiles sont les bactéries les plus proches de la base de l'arbre phylogénétique du vivant [Stetter, 1996 ; figure I.10].

La majorité des hyperthermophiles, appartenant au domaine des Archaea, est représentée par les Crenarchaeota et les Euryarchaeota, les deux principaux règnes des Archaea. Rappelons en effet qu'un troisième règne est référencé chez les Archaea, les Korarchaeota. Cependant, il est basé sur des analyses de séquences d'ARNr environnementaux et ne compte à l'heure actuelle aucune espèce cultivée [Barns *et al.*, 1996]. Plus récemment, un quatrième règne a été découvert chez les Archaea, les Nanoarchaeota, et ne compte qu'un seul représentant : l'hyperthermophile *Nanoarchaeum equitans* [Huber *et al.*, 2002]. Toujours est-il que les espèces hyperthermophiles sont omniprésentes dans le domaine des Archaea et qu'elles occupent les branches les plus basses (figure I.10).

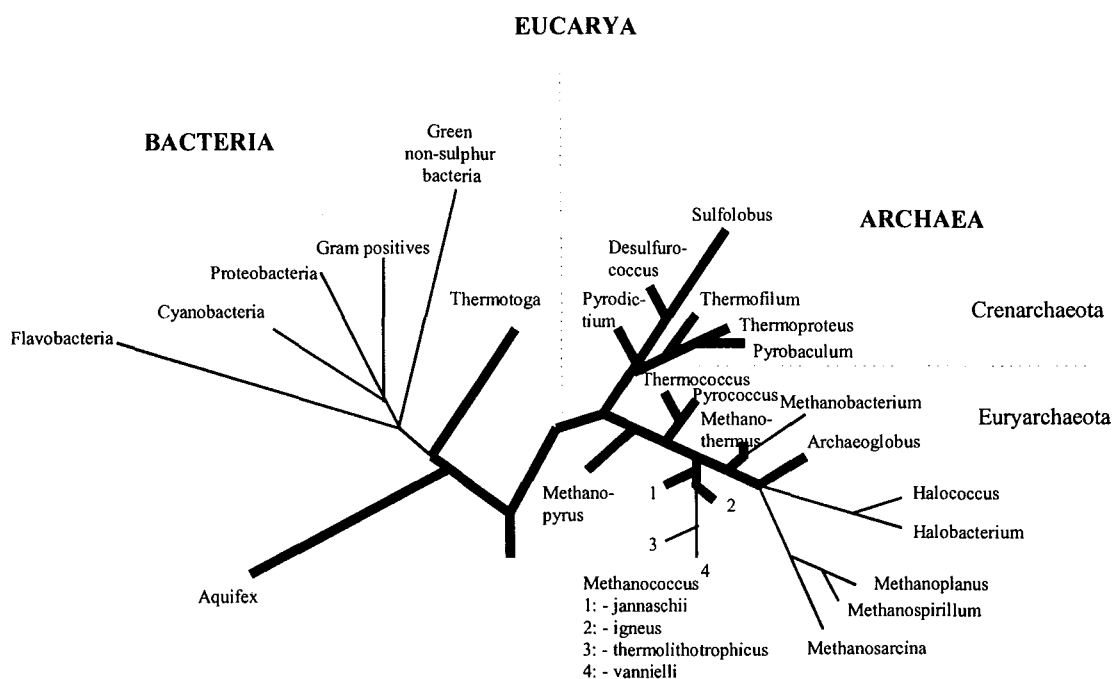


Figure I.10. Arbre phylogénétique du vivant basé sur la comparaison de séquences d'ARNr 16S ; d'après Woese *et al.*, 1990. Les lignes épaisses correspondent aux embranchements des espèces hyperthermophiles, d'après Stetter, 1996.

Ainsi, les données taxonomiques et phylogénétiques concernant les espèces hyperthermophiles indiquent que ces dernières sont très diverses (2 domaines, 10 ordres, 32 genres) et sont regroupées à la base de l'arbre phylogénétique du vivant. C'est pourquoi, il semblerait que l'Ancêtre Universel Cellulaire Commun, ou *LUCA* (pour *Last Universal Cellular Ancestor*), soit hyperthermophile [Stetter, 1996]. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les données géochimiques disponibles tendent à montrer que la vie serait apparue sur Terre alors que celle-ci était un environnement qualifiable d'extrême [Chyba, 1993]. Notons tout de même que cette théorie, bien que répandue, compte un certain nombre de détracteurs.

I.3. UN MICRO-ORGANISME HYPERTHERMOPHILE : *Pyrococcus abyssi*

En 1989, lors de la campagne océanographique franco-japonnaise « Starmer », co-organisée par l'*Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer* (Ifremer) et le *Japan Marine Science and Technology Center* (Jamstec), l'exploration du Bassin Nord des Fidji (173° 5'E ; 1° 59'S) à l'aide d'un submersible, le « Nautilé », a permis de découvrir de nouvelles sources hydrothermales à 2000 mètres de profondeur. Une série d'enrichissements et d'isolements microbiologiques fut réalisée à partir de débris de cheminées hydrothermales, permettant d'isoler une nouvelle souche hyperthermophile, baptisée après caractérisation *Pyrococcus abyssi* (figure I.12).

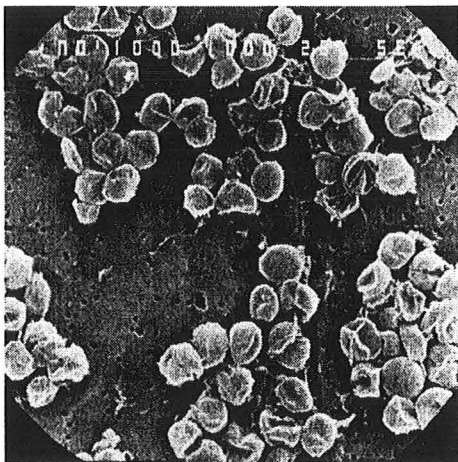


Figure I.12. *Pyrococcus abyssi*
(photographie Ifremer)

D'un point de vue taxonomique, *P. abyssi* fait partie du domaine des Archaea, du règne des Euryarchaeota et de l'ordre des Thermococcales. Cet ordre renferme deux genres : Thermococcus et Pyrococcus. D'après la base de données taxonomiques du *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, Maryland, USA ; NCBI), le genre Pyrococcus est

représenté par six espèces identifiées (*P. abyssi*, *P. endeavori*, *P. furiosus*, *P. glycovorans*, *P. horikoshii* et *P. woesei*) et 10 isolats non-identifiés.

Concernant sa morphologie et sa physiologie, les principales caractéristiques de *P. abyssi* sont résumées dans le tableau I.2. De plus, *P. abyssi* peut être qualifié de barophile facultatif puisque, sous de fortes pressions hydrostatiques, sa croissance est stimulée et sa température optimale de croissance plus élevée (atteignant 100°C sous deux atmosphères). A l'instar des Archaea hyperthermophiles, ses lipides membranaires sont composés essentiellement de diéthers de phytanyl glycérol et de tétraéthers de dibiphytanyl.

Tableau I.2. Principales caractéristiques de *P. abyssi* [Erauso *et al.*, 1993]

Morphologie	Coques légèrement irrégulières (diamètre : 0,8 à 2 µm) et polarisées par la présence de flagelles regroupées	
Température	Optimale	96°C ^a
	Gamme	67-102°C ^a
pH	Optimal	6,8
	Gamme	4,0-8,5
Concentration en NaCl	Optimale	3%
	Gamme	0,7-5,0%
Sources carbonées utilisées	Substrats complexes (extrait de levures, peptone, ...), maltose, amidon, pyruvate, casamino-acides, mélanges des 21 acides aminés	
Utilisation du soufre élémentaire	Améliore la croissance, induit la production d'H ₂ S, diminuant l'effet toxique de H ₂	
Temps de génération	33 minutes ^b	
G + C %	45	

^a : à pression atmosphérique ; ^b : en conditions optimales de croissance.

P. abyssi a fait l'objet de nombreux travaux dans le domaine de la biologie moléculaire. Son génome est composé d'un plasmide de 3 444 paires de bases, nommé pGT5 [Erauso *et al.*, 1996], et d'un chromosome circulaire de 1 765 118 paires de bases. L'intégralité du génome a été séquencée et est disponible publiquement dans les bases de données du Génoscope (Evry, France ; <http://www.genoscope.cns.fr/Pab/>). Son G + C % est de 44,7. L'analyse de la séquence de l'ADN chromosomique a permis d'identifier 1 765 cadres ouverts de lecture. A 51% de ces derniers, une fonction biologique a pu être associée : 14% de gènes de type informationnel, 37% de type opérationnel. Les 49% restant de cadres ouverts de lecture sont à l'heure actuelle de rôles inconnus. La partie codant pour des protéines correspond à 91,1% du génome. La comparaison de ce génome avec ceux de deux autres espèces de Pyrococci (*P.*

furiosus et *P. horikoshii*), dont les génomes ont également été séquencés, a permis de conclure que la séparation de *P. abyssi* et *P. horikoshii* est plus récente que celle entre *P. furiosus* et les deux autres espèces [Lecompte *et al.*, 2001].

II. BIOCHIMIE DE L'HYPERTHERMOPHILIE

La survie et/ou le développement d'un micro-organisme dans un habitat extrême impliquent que ses constituants cellulaires sont adaptés à des conditions physico-chimiques environnementales particulières. L'hyperthermophilie a fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre les raisons de la stabilité des structures cellulaires de tels micro-organismes à haute température.

II.1. LES MEMBRANES DES HYPERTHERMOPHILES

La membrane plasmique des procaryotes délimite l'espace intracellulaire de l'espace extracellulaire. Chez les espèces hyperthermophiles, sa résistance à des températures supérieures à 80°C est donc une garantie du maintien de l'intégrité physique des cellules.

Le principe d'*adaptation homéovisqueuse* décrit chez les Bactéries énonce que la composition en acides gras membranaires est directement corrélée à la température de croissance d'un micro-organisme. Les bactéries hyperthermophiles illustrent ce principe. En effet, leurs phospholipides sont majoritairement constitués de chaînes d'acides gras longues (C₁₈-C₂₄) et saturées, conférant à leur membrane une fluidité optimale à haute température [Driessen *et al.*, 1996].

Chez les Archaea, une toute autre stratégie est mise en place. En effet, au lieu de la classique bicouche de diesters de glycérol connue chez les Bactéries et les Eucaryotes, la membrane plasmique typique des Archaea est une bicouche de diethers de glycérol (figure I.13). La liaison éther entre le glycérol et la chaîne carbonée hydrophobe est plus résistante à la chaleur que la liaison ester. De plus, les chaînes carbonées de deux diether de glycérol peuvent être liées de façon covalente formant alors un tétra-éther de diglycérol (figure I.13), dont la résistance aux hautes températures est encore meilleure. La membrane plasmique est alors une monocouche de tétra-éther de diglycérol. Enfin, à la différence des lipides bactériens et eucaryotes, les chaînes carbonées hydrophobes des lipides d'Archaea ne sont pas des acides

gras mais des isoprénoides. Ces caractéristiques confèrent aux membranes d'Archaea hyperthermophiles une meilleure thermostabilité [Driessen *et al.*, 1996 ; van de Vossenberg *et al.*, 1998 ; Madigan *et al.*, 2000].

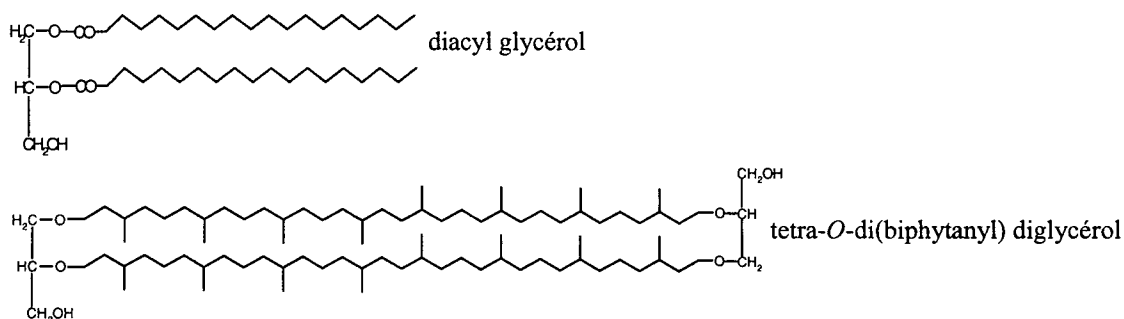


Figure I.13. Diacyl glycérol et tétra-*O*-di(biphytanyl) diglycérol, constituants typiques des membranes plasmiques des bactéries et Archaea hyperthermophiles.

II.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES HYPERTHERMOPHILES

Les génomes d'Archaea hyperthermophiles sont organisés de façon semblable à ceux des Bactéries, à savoir sous forme de chromosomes circulaires, parfois supplémentés d'ADN plasmidique. Ces molécules d'ADN sont associées à diverses protéines : topoisomérases, protéines *histone-like*, ADN et ARN polymérases. La thermostabilité de ces génomes ne semble pas résulter de facteurs intrinsèques puisque aucune corrélation n'a pu être établie entre le G + C% et la température optimale de croissance d'espèces hyperthermophiles. Au contraire, cette thermostabilité semble s'expliquer par des mécanismes extrinsèques : les protéines *histone-like* et une topoisomérase spécifique, la « *reverse gyrase* ». La réplication du matériel génétique est assurée par plusieurs ADN polymérases ainsi que par des facteurs de réplication [d'après van der Oost *et al.*, 1998].

En ce qui concerne la synthèse des protéines, des travaux ont permis de conclure que la transcription et la traduction chez les Archaea ont des éléments communs avec à la fois les Bactéries et les Eucaryotes. De nombreux gènes ont en effet montré une organisation en opérons similaires aux opérons bactériens, codant des ARNm mono- ou poly-cistroniques. De plus, les signaux de transcription des Archaea rappellent beaucoup la boîte TATA des Eucaryotes. En revanche, l'initiation de la traduction semble régie par une séquence proche des séquences de Shine-Dalgarno bactérienne. Le reste de la traduction présente du reste des similitudes avec le modèle eucaryote : la méthionine N-terminale n'est pas formylée et les

ARNr ainsi que les facteurs de transcription et les aminoacyl-ARNt synthétases présentent de fortes homologues avec leurs équivalents eucaryotes [d'après van der Oost *et al.*, 1998].

II.3. LES PROTEINES DES HYPERTHERMOPHILES

De tous les composants cellulaires étudiés pour comprendre la thermostabilité, ce sont les protéines qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Cela vient sans doute à la fois de l'intérêt scientifique pour comprendre la vie à haute température et du fait que les enzymes thermostables présentent un grand potentiel d'applications industrielles.

II.3.1. Généralités

L'étude de nombreuses enzymes issues de micro-organismes hyperthermophiles a montré que celles-ci ont généralement une activité optimale à une température proche de la température optimale de croissance du micro-organisme dont elles ont été isolées. Parmi les exceptions, les enzymes extracellulaires telles que les saccharidases et les protéases ont des températures optimales supérieures à leur hôte d'origine, mais rares sont les enzymes présentant un optimum de température très inférieur à la température de croissance de l'espèce dont elles proviennent. De plus, à l'exception de variations phylogénétiques, la principale différence entre les enzymes méso- et thermo-stables est la gamme de température à laquelle elles sont stables et actives. En effet, la comparaison d'enzymes issues d'organismes mésophiles avec leur équivalent issues d'espèces thermophiles a montré que ces protéines sont souvent très similaires en terme (i) d'homologie de séquences primaires, (ii) de structures tridimensionnelles, (iii) de mécanisme catalytique [d'après Vieille & Zeikus, 2001].

II.3.2. Aspect macroscopique de la thermostabilité : description thermodynamique

L'approche thermodynamique de la thermostabilité des protéines a été particulièrement rapportée par Kumar & Nussinov (2001). La courbe de stabilité thermique d'une protéine est donnée par l'équation de Gibbs-Helmholtz :

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)]$$

- où :
- $\Delta G(T)$: variation d'énergie libre, à la température T (°K), entre les états natif et dénaturé de la protéine ;
 - ΔH_m : variation d'enthalpie à la température T_m (°K) ;
 - T_m : température (°K) à laquelle les concentrations en protéine à l'état natif et dénaturé sont égales ;
 - ΔC_p : variation de la capacité calorifique entre les états natif et dénaturé.

En outre, T_S est la température de stabilité maximale de la protéine, valeur à laquelle le terme $\Delta G(T)$ est maximal et égal à $\Delta G(T_S)$.

Expérimentalement, des techniques de spectroscopie (dichroïsme circulaire, fluorescence) et de calorimétrie permettent d'étudier la dénaturation thermique et/ou chimique d'une protéine, donnant accès aux variables thermodynamiques décrites dans l'équation de Gibbs-Helmoltz. La figure I.14 [courbe (1)] représente la courbe de stabilité thermique $\Delta G(T) = f(T)$. La thermostabilité d'une protéine est caractérisée par sa valeur T_m dans des conditions données. Ainsi, augmenter la thermostabilité d'une protéine consiste à élever son T_m . Pour cela, trois stratégies sont théoriquement envisageables : (i) déplacer la courbe vers le haut, cela revient à augmenter la valeur $\Delta G(T_S)$, [figure I.14, courbe (2)] ; (ii) en diminuer la courbure, en intervenant sur le terme ΔC_p , [figure I.14, courbe (3)] ; (iii) déplacer la courbe vers la droite le long de l'axe des abscisses, [figure I.14, courbe (4)]. En pratique, à l'issue de travaux de comparaison d'enzymes thermostables avec leurs homologues d'origine mésophile, il s'avère que les trois stratégies sont souvent utilisées simultanément par les protéines thermostables. La première stratégie semble toutefois systématiquement mise en œuvre.

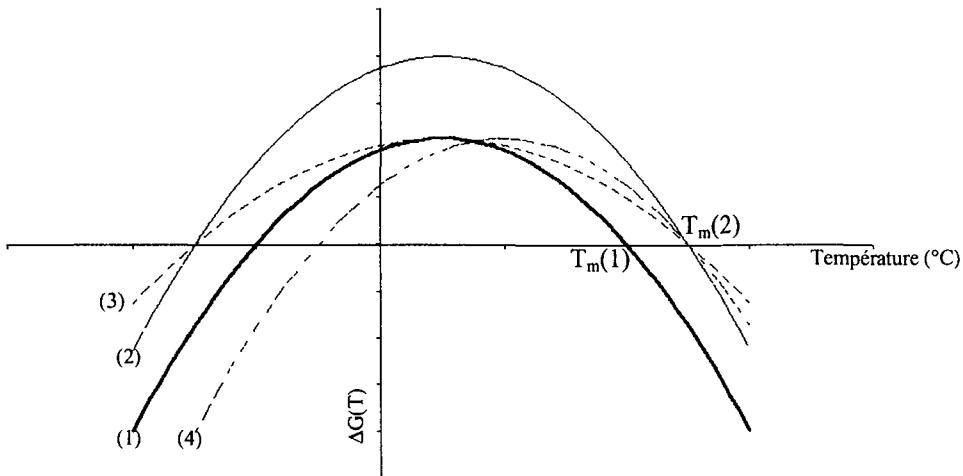


Figure I.14. Fonction de Gibbs-Helmoltz, $\Delta G(T) = f(T)$. La courbe (1) représente une courbe de référence. Les courbes (2), (3) et (4) présentent les différentes stratégies possibles pour augmenter la température de dénaturation (T_m) d'une protéine.

Les conclusions apportées par cette approche thermodynamique ne suffisent pas à expliquer la thermostabilité des protéines. Il est en effet impératif d'obtenir des informations sur les mécanismes moléculaires mis en jeu, afin de les corrélés avec les données macroscopiques.

II.3.3. Aspects moléculaires de la thermostabilité

II.3.3.1. La thermostabilité : caractère intrinsèque ou extrinsèque ?

L'approche moléculaire de la thermostabilité peut être envisagée selon deux options : d'une part, la thermostabilité peut être considérée comme une propriété intrinsèque à la protéine étudiée ; d'autre part, elle peut résulter de facteurs extrinsèques tels que des cofacteurs, des ligands, des chaperonnes, etc... [Scandurra *et al.*, 1998 ; Sterner & Liebl, 2001 ; Vieille & Zeikus, 2001]. L'étude de nombreuses protéines issues de micro-organismes hyperthermophiles cette dernière décennie a montré que la plupart de ces enzymes sont intrinsèquement thermostables [Vieille & Zeikus, 2001]. La preuve en est que plus de 90% des enzymes thermostables exprimées sous forme de protéines recombinantes chez un hôte mésophile, en général *E. coli*, ont montré des propriétés identiques à celles de l'enzyme native (notamment en termes de maturation, thermostabilité, température optimale et données cristallographiques). L'approche de l'étude de la thermostabilité en tant que caractéristique intrinsèque constitue ainsi la majorité des données disponibles actuellement.

II.3.3.2. Facteurs intrinsèques de thermostabilisation

L'accumulation de séquences complètes de génomes dans les bases de données permettent de réaliser de plus en plus de comparaisons et d'analyses statistiques entre organismes mésophiles et (hyper)thermophiles. En 2001, 37 génomes microbiens étaient disponibles, dont 9 d'espèces hyperthermophiles, et 6 génomes d'hyperthermophiles en cours de séquençage [Kumar & Nussinov, 2001]. De même, l'accroissement des données cristallographiques concernant des protéines thermostables ainsi que de leurs homologues issus d'espèces mésophiles permet d'avoir une approche de plus en plus généraliste sur les mécanismes moléculaires de la thermostabilité [Sternier & Liebl, 2001 ; Vieille & Zeikus, 2001]. Les paragraphes qui suivent résument brièvement les principaux mécanismes décrits à l'heure actuelle.

La composition en acides aminés fut l'un des premiers paramètres analysés. Bien que Böhm et Jaenicke, en 1994, avaient conclu que l'analyse de la composition en acides aminés des protéines thermostables ne permettait pas d'établir à elle seule de loi générale sur la thermostabilité, certaines tendances significatives sont notoires. Par exemple, comparées aux protéines mésostables, les protéines thermostables contiennent plus de résidus chargés au dépend des résidus polaires neutres. Elles contiennent également plus de résidus hydrophobes et aromatiques [Vieille & Zeikus, 2001]. Sternier et Liebl (2001) ont également rapporté la plus forte teneur en résidus chargés Glu, Arg et Lys chez les enzymes thermostables et la teneur moindre en résidus Gln, Asp, Thr et Ser, sujets à la déamidation, ainsi qu'en résidus thermolabiles Asp, Gln, Cys et Met. Kumar et Nussinov (2001) ont également relevé la préférence des protéines thermostables pour les résidus Arg et Tyr et la faible occurrence des résidus Cys et Thr. Concernant les tailles protéiques, plusieurs revues rapportent une taille moyenne de 268 ± 38 acides aminés pour les protéines thermostables contre 310 ± 16 acides aminés pour les protéines issues d'espèces mésophiles. Cette différence de taille peut être interprétée d'un point de vue thermodynamique (cf. paragraphe II.3.2.). La diminution de la taille a pour effet de diminuer la valeur ΔC_p et donc d'augmenter le T_m . Enfin, la réduction de la taille des enzymes thermostables est souvent la conséquence de délétions de boucles de surface. Ceci aurait pour effet de diminuer la variation d'entropie entre les états natif et dénaturé de la protéine et ainsi d'augmenter la valeur du T_m [Sternier & Liebl, 2001].

La rigidité structurale à température ambiante est un paramètre très souvent cité comme propriété générale des protéines thermostables. En effet, la thermostabilité d'une protéine semble directement corrélée à la rigidité de celle-ci. Une enzyme thermostable est en effet plus rigide que son homologue mésostable, à basse température (10-40°C). Cette grande rigidité expliquerait également pourquoi les enzymes thermostables sont inactives à basse température. A haute température, la flexibilité protéique augmente et l'enzyme devient active [Scandurra *et al.*, 1998 ; Sterner & Liebl, 2001 ; Vieille & Zeikus, 2001]. Quelques enzymes thermostables ont montré une activité importante à basse température, cela a été interprété comme une flexibilité locale de la structure, au niveau du site actif de l'enzyme [Vieille & Zeikus, 2001]. Enfin, cette relation entre thermostabilité et rigidité structurale a été montrée par une approche opposée : les protéines issues d'organismes psychrophiles sont plus flexibles que leurs homologues mésophiles [de Backer *et al.*, 2002 ; Mavromatis *et al.*, 2002].

Les interactions ioniques semblent actuellement faire l'objet d'un quasi-consensus en tant que stratégie prépondérante de thermostabilisation des protéines. Toutes les revues sur ce sujet font en effet état de la fréquence importante de ponts salins observés chez toutes les protéines thermostables [Karshikoff & Ladenstein, 2001]. La glutamate déshydrogénase de *P. furiosus* est un bel exemple illustrant l'effet stabilisateur des interactions ioniques sur une protéine [Vetriani *et al.*, 1998]. Le tableau I.3 présente les caractéristiques de cette enzyme ainsi que celles de son homologue issu de la souche mésophile *Clostridium symbiosum*. Il y apparaît que malgré une homologie de séquences de 34% et une structure homohexamérique similaire, la température de dénaturation passe du simple au double entre les deux enzymes. La fréquence des interactions ioniques ainsi que leurs associations en réseaux permet la stabilisation thermique de l'enzyme de *P. furiosus*. D'ailleurs, dans cette dernière, la mise en œuvre d'interactions ioniques mobilise très fortement l'ensemble des résidus chargés, notamment les Arg dont 90% sont impliqués dans des ponts salins simples ou en réseaux.

Tableau I.3. Comparaison des contenus en interactions ioniques chez les glutamates déshydrogénases de *P. furiosus* et *Clostridium symbiosum* [adapté de Sterner & Liebl, 2001 ; et Vieille & Zeikus, 2001].

Caractéristiques	Glutamate déshydrogénase de :	
	<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
T _m	55°C	113°C
Nombre d'II ^a par sous-unité	26	45
Nombre d'II par résidu	0,06	0,11
% de résidus chargés formant des II	40	54
% d'II formées par Arg/Lys/His	46/31/23	64/27/9
% d'II formées par Asp/Glu	46/54	47/53
% des Arg formant des II	55	90
Nombre de résidus formant 2 II	6	17
Nombre de résidus formant 3 II	1	5
Nombre de réseaux d'II à 2/3/4 résidus	72/24/12	54/24/12
Nombre de réseaux d'II à 5/6/18 résidus	0/0/0	12/6/3
% d'II impliquées dans des réseaux de plus de 3 résidus	23	62
Nombre d'II entre sous-unité	30	54
Nombre d'II entre domaine protéique	1	7

^a : II = interaction ionique

En général, l'optimisation des interactions électrostatiques pour une protéine donnée est réalisée en minimisant la fréquence des contacts répulsifs entre résidus. L'analyse statistique de 141 structures protéiques a permis à Karshikoff et Ladenstein (2001) d'en venir à la conclusion que chez les protéines issues d'organismes hyperthermophiles, cette optimisation résulte à la fois d'une augmentation de la teneur en ponts salins et d'une minimisation des contacts répulsifs (tableau I.4 et figure I.14).

Tableau I.4. Nombre d'interactions ioniques dans des protéines issues de micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles^a [Karshikoff & Ladenstein, 2001]

Micro-organisme	Protéine	T _{opt}	N _s	N _r
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Rubredoxine	100°C	4	4,2
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Glutamate déshydrogénase	100°C	42	25,0
<i>Thermotoga maritima</i>	Glutamate déshydrogénase	80°C	30	24,0
<i>Thermus thermophilus</i>	Protéine ribosomiale	75°C	9	6,8
<i>Thermus thermophilus</i>	Superoxyde dismutase (Mn, Fe)	75°C	10	10,1
<i>Thermus flavus</i>	Malate déshydrogénase	75°C	17	16,1
<i>Thermus thermophilus</i>	3-isopropylmalate déshydrogénase	75°C	29	19,5
<i>Thermus aquaticus</i>	Facteur d'élongation Tu	75°C	36	28,3
<i>Thermus thermophilus</i>	Séryl-ARNt synthétase	75°C	36	28,6

^a : T_{opt}, température optimale de croissance du micro-organisme ; N_s, nombre de ponts salins présents dans la structure protéique ; N_r, nombre de ponts salins statistiquement attendus dans la structure protéique.

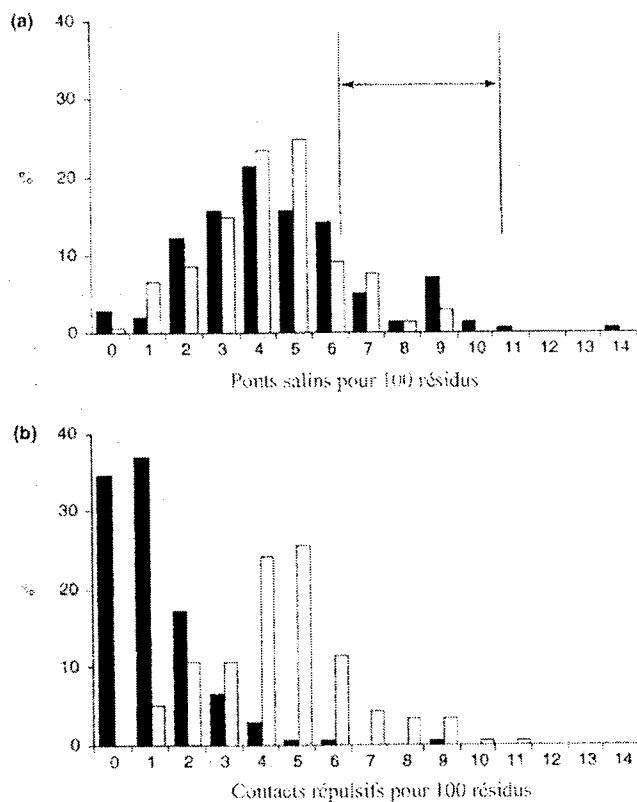


Figure I.14. Fréquences de l'occurrence de protéines contenant 0 à 14 ponts salins pour 100 résidus, obtenues à partir de 141 structures protéiques. (a) Nombre de ponts salins pour 100 résidus dans les structures natives (noir), et, attendus par distribution aléatoire (blanc). Les protéines issues d'organismes hyperthermophiles sont situées dans la zone délimitée par le symbole ↔. (b) Nombre de contacts répulsifs pour 100 résidus dans les structures natives (noir), et, attendus par distribution aléatoire (blanc) [Karshikoff & Ladenstein, 2001].

Toutefois, l'un des points les plus importants, évoqué plus tôt, est le fait que, chez les enzymes thermostables, non seulement les interactions ioniques sont plus fréquentes, mais aussi qu'elles sont organisées en réseaux. Les réseaux de ponts salins sont en effet énergétiquement plus favorables que les ponts salins isolés, dans la mesure où ils minimisent les problèmes de désolvatation induits par les interactions ioniques [Vieille & Zeikus, 2001]. De plus, la stabilité des ponts salins est favorisée à haute température. D'après la loi de Coulomb, l'interaction électrostatique d'un dipôle est donnée par l'équation

$$\text{suivante : } E = \frac{q_1 \times q_2}{D \times r} ;$$

où E est l'énergie d'interaction électrostatique nécessaire pour que la distance entre les charges q_1 et q_2 passe de la valeur r à $+\infty$; et D est la constante diélectrique du milieu. Pour l'eau, D est de 80 à 25°C mais chute à 55 à 100°C. L'augmentation de la température induit donc l'augmentation de l'énergie électrostatique. Etant donné qu'un pont salin peut être assimilé à un dipôle, il est clair que les interactions ioniques des protéines thermostables sont fortement stabilisées par la haute température qu'elles subissent [Karshikoff & Ladenstein, 2001 ; Sterner & Liebl, 2001].

Chez les enzymes thermostables, les interactions ioniques permettent de stabiliser les structures intrapeptidiques mais aussi les interfaces entre sous-unités. L'oligomérisation est une stratégie de thermostabilisation parfois citée. Elle met souvent en jeu des interactions ioniques interfaciales. De plus, des ponts salins stabilisant les segments N- et C-terminaux de certaines protéines ont été mis en évidence. Ces segments sont plus sujets à la déstabilisation thermique que le reste de la protéine et ils peuvent être stabilisés dans le cœur de celle-ci à l'aide d'interactions ioniques [Kumar & Nussinov, 2001 ; Scandurra *et al.*, 1998 ; Sterner & Liebl, 2001 ; Vieille & Zeikus, 2001].

D'autres facteurs intrinsèques de thermostabilisation sont assez répandus chez les protéines issues d'organismes (hyper)thermophiles. Ces facteurs sont : (i) une plus forte teneur en liaisons hydrogène, (ii) une optimisation des liaisons hydrophobes, (iii) des structures plus compactes et plus denses, (iv) une plus forte teneur en hélices α , associée à une meilleure stabilité de ces structures, (v) une présence moindre de boucles exposées au solvant, (vi) une plus forte teneur en résidus Pro et ramifiés en β , (vii) l'association en oligomères [Kumar & Nussinov, 2001 ; Scandurra *et al.*, 1998 ; Sterner & Liebl, 2001 ; Vieille & Zeikus, 2001].

Des facteurs intrinsèques rares sont également régulièrement cités. Loin de s'être avérés comme des stratégies générales de thermostabilisation, ils sont cependant au moins partiellement responsables de la thermostabilité de certaines protéines. Par exemple, la 5'-méthylthioadénosine phosphorylase de *Sulfolobus solfataricus* et la sérine protéase d'*Aquifex pyrophilus* seraient stabilisées par des ponts disulfures enfouis au cœur de la protéine et donc protégés de la destruction thermique [Vieille & Zeikus, 2001]. De plus, il a été montré que certaines protéines issues d'organismes hyperthermophiles sont glycosylées. Les groupements carbohydrates ne sont pas encore bien caractérisés mais il est possible que la glycosylation soit une stratégie de thermostabilisation chez ces micro-organismes [Vieille & Zeikus, 2001]. Enfin, une autre modification post-traductionnelle pourrait être impliquée dans la stabilisation thermique de certaines protéines. Il s'agit de la méthylation de résidus Lys. Ce phénomène a été montré chez plusieurs espèces de l'ordre des *Sulfolobales* [Scandurra *et al.*, 1998 ; Vieille & Zeikus, 2001].

II.3.3.3. Facteurs extrinsèques

Bien que la thermostabilité semble une propriété principalement intrinsèque, des facteurs extrinsèques peuvent intervenir pour stabiliser certaines protéines. Le facteur extrinsèque le plus fréquemment rencontré est la présence d'ions métalliques. La stabilisation par la présence d'un ou plusieurs ions métalliques a été montrée sur plusieurs enzymes thermostables [Vieille & Zeikus, 2001]. Par ailleurs, certaines protéines thermostables contiennent des métaux additionnels que leurs homologues issus d'espèces mésophiles n'ont pas (exemple : la ferrédoxine de *Sulfolobus* sp. souche n°7). De plus, des protéines chaperonnes ou *Heat Shock Proteins* ont été identifiées chez diverses espèces hyperthermophiles telles que *Pyrodictium occultum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Sulfolobus shibatae* [Sternier & Liebl, 2001]. De même, des enzymes de réparations protéiques seraient parfois présentes afin de contrer des dégradations thermiques telles la déamidation des résidus Asn et Gln, la formation de succinimide sur les résidus Glu et Asp, et l'oxydation des résidus His, Met, Cys, Trp, Tyr [Sternier & Liebl, 2001]. Certains composés organiques pourraient également stabiliser les protéines intracellulaires. Ces composés (exemple : diglycérol-phosphate, dérivés de myo-inositol-phosphate, etc...) sont en effet accumulés *in vivo* dans le cytoplasme en réponse à un stress et ont montré un effet stabilisateur sur certaines enzymes thermostables lors de test *in vitro* (exemple : malate déshydrogénase de *Methanothermus fervidus*, formyl transférase de *Methanopyrus kandleri*, glycéraldéhyde-3-phosphate

déshydrogénase de *P. woesei*, etc...). Certains sels inorganiques, notamment NH_4^+ et K^+ , et le substrat, en stabilisant le site actif de l'enzyme, ont un effet positif sur la thermostabilité de certaines enzymes [Vieille & Zeikus, 2001]. Enfin, en marge des facteurs chimiques ou biochimiques, la pression est un paramètre physique dont le rôle sur la stabilité thermique de certaines protéines semble important, en particulier pour les protéines issues de micro-organismes isolés d'environnements à haute pression tels que les sources hydrothermales profondes.

II.3.3.4. Conclusion

L'approche moléculaire de l'étude de la thermostabilité des protéines privilégie grandement les facteurs intrinsèques de thermostabilisation. Ces nombreux et récents travaux associent la comparaison de données génomiques et structurales entre les espèces hyperthermophiles et mésophiles, ainsi que l'analyse de mutants. Ils n'ont toutefois pas permis d'établir de loi générale sur les mécanismes moléculaires mis en jeu. A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes ont été décrits, certains prépondérants, d'autres rares. Il semble cependant que les liaisons ioniques, avec leur optimisation en réseaux, soient considérées comme la stratégie majeure de thermostabilisation des protéines.

PARTIE II

MATERIEL ET METHODES

SOMMAIRE DE LA PARTIE II

<i>Avant-propos</i>	47
I. SOUCHES MICROBIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE	47
I.1. <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i>	47
I.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	48
I.3. <i>PICHIA PASTORIS</i>	49
II. PLASMIDES	51
II.1. PRESENTATION DES PLASMIDES.....	51
II.2. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES.....	52
III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	52
III.1. PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE.....	52
III.1.1. Préparation de petits volumes : miniprep.....	52
<i>III.1.1.1. Solutions</i>	52
<i>III.1.1.2. Protocole</i>	53
III.1.2. Préparation de grands volumes : midi- et maxi-prep.....	54
III.2. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE.....	54
III.2.1. Extraction d'ADN génomique de <i>P. abyssi</i>	54
<i>III.2.1.1. Solutions</i>	54
<i>III.2.1.2. Protocole</i>	54
III.2.2. Extraction d'ADN génomique de <i>Pc. pastoris</i>	55
<i>III.2.2.1. Solutions</i>	55
<i>III.2.2.2. Protocole</i>	56
III.3. TECHNIQUES DE MODIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN.....	57
III.3.1. Digestion.....	57
III.3.2. Déphosphorylation.....	57
III.3.2. Ligature.....	58
III.4. TECHNIQUES DE PURIFICATION ET D'ANALYSE D'ADN.....	58
III.4.1. Purification de fragment d'ADN.....	58
<i>III.4.1.1. Purification par précipitation</i>	58
<i>III.4.1.2. Purification sur colonne de silice</i>	59

III.4.1.3. Purification par excision d'un gel d'agarose.....	59
III.4.2. Analyse de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	59
III.5. AMPLIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	60
III.6. TRANSFORMATION DE CELLULES.....	61
III.6.1. Transformation de souches d' <i>E. coli</i> au CaCl ₂	61
III.6.1.1. Solutions.....	61
III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes.....	61
III.6.1.3. Transformation.....	61
III.6.2. Electrotransformation d' <i>E. coli</i>	62
III.6.1.1. Solutions.....	62
III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes.....	62
III.6.1.3. Transformation.....	62
III.6.3. Electrotransformation de <i>Pc. pastoris</i>	63
III.6.1.1. Solutions.....	63
III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes.....	63
III.6.1.3. Transformation.....	63

IV. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE

SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.....	64
IV.1. ANALYSE EN CONDITIONS DENATURANTES.....	64
IV.1.1. Solutions.....	64
IV.1.2. Protocole.....	65
IV.2. ANALYSE EN CONDITIONS NATIVES.....	66
IV.2.1. Solutions.....	66
IV.2.2. Protocole.....	66
IV.3. ZYMOGRAMME : TEST D'ACTIVITE ENZYMATIQUE SUR GEL.....	66

AVANT-PROPOS

Les pages qui suivent concernent le matériel et les procédures utilisés au cours de ces travaux. Il s'agit d'informations générales destinées à compléter les rubriques « Materials and methods » développées dans les parties IV, V et VI de cette thèse. En effet, pour chacune de ces trois parties, des sections « Materials and methods » visent à détailler les procédures spécifiques des résultats qui y sont développés, abordant peu ou pas du tout les aspects développés ci-dessous.

I. SOUCHES MICROBIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE

I.1. *PYROCOCCUS ABYSSI*

La souche *Pyrococcus abyssi* GE5 [Erauso *et al.*, 1993] a été cultivée en milieu liquide à 95°C en milieu Zobell-Soufre, également appelé milieu 2216S [Belkin & Jannasch, 1985], dont la composition est donnée dans le tableau II.1. Le volume des inocula représente un centième du volume de milieu àensemencer.

Tableau II.1. Composition du milieu Zobell-Soufre

Composant	Quantité (g.L ⁻¹)	Origine
Extrait de levures	1	Difco Lab.
Bacto-peptone	4	Difco Lab.
Sel marin	30	Sigma
Soufre	10	Prolabo
PIPES	6,05	Sigma
Na ₂ S	0,5	Sigma
Résazurine	0,005	Labosi

La résazurine est d'abord préparée sous forme d'une solution mère à 1 g.L⁻¹, puis 5 mL de cette solution sont ajoutés par litre de milieu de culture. Il s'agit d'un indicateur coloré témoignant de la présence d'O₂ dissous dans le milieu. La résazurine est incolore en absence d'O₂ et rouge en présence d'O₂.

Le Na_2S est dans un premier temps préparé sous forme d'une solution mère à 25 g.L^{-1} , puis 20 mL de cette solution sont ajoutés par litre de milieu de culture. Ce composant permet de réduire le milieu jusqu'à décoloration de la résazurine.

L'extrait de levures, la bacto-peptone, le sel marin, le tampon PIPES et la résazurine sont d'abord mélangés dans de l'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté à 7,0 avec quelques gouttes de NaOH 10 N. Parallèlement, la solution mère de Na_2S à 25 g.L^{-1} est préparée et le soufre est réparti dans le récipient de culture (tube ou flacon). Le tout est stérilisé par tyndallisation, deux autoclavages successifs à 100°C pendant 30 min. Ce traitement permet au soufre de ne pas prendre en masse lors de la stérilisation et de rester sous une forme pulvérulente disponible pour les cellules en croissance. La préparation est enfin placée dans une enceinte anaérobie stérile où le milieu à pH 7,0 est réduit par ajout de Na_2S . Le milieu réduit est réparti dans le récipient de culture. L'enceinte anaérobie renferme une atmosphère contrôlée composée d'un mélange $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2$ (90:5:5, vol:vol:vol)

1.2. *ESCHERICHIA COLI*

Trois souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées lors de ces travaux. Elles sont présentées dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Souches d'*E. coli* utilisées.

Souches d' <i>E. coli</i>	Origine	Génotype	Utilisation
DH5 α		<i>F</i> $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$ <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> , <i>m_K</i> ⁺) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$ λ	Stabilisation et amplification de plasmides
HMS174(DE3), pLysS	Novagen	<i>F</i> <i>recA1</i> <i>hsdR</i> (<i>r_{K12}</i> , <i>m_{K12}</i> ⁺) <i>Rif^R</i> (DE3) pLysS (<i>Cm^R</i>) (dérive de la souche <i>E. coli</i> K12)	Expression régulée par le promoteur T7
BL21(DE3), pLysS	Novagen	<i>F</i> <i>OMPT</i> <i>HSDS_B</i> (<i>R_B</i> , <i>M_B</i>) <i>GAL DCM</i> (DE3) <i>PLYSS</i> (<i>CM^R</i>) (dérive de la souche <i>E. coli</i> B834)	Expression régulée par le promoteur T7

Ces souches ont suivi les mêmes conditions de cultures. En milieu liquide, elles ont été cultivées à 37°C sous agitation continue (250 rpm). Les milieux de culture utilisés ont été le 2

× YT (tableau II.3) et le Low Salt LB (tableau II.4), le volume de milieu ne dépassant pas un cinquième du volume total du flacon de culture. Le milieu de culture a été complété par une pression de sélection dans le cas des souches modifiées par intégration d'un plasmide.

Tableau II.3. Composition du milieu 2 × YT

Composant	Origine	Quantité (g.L ⁻¹)
Bactopeptone	Difco	16
Extrait de levures	Difco	10
NaCl	Sigma	10
Agar ^a	Sigma	15

^a : dans le cas du 2 × YT gélosé.

Le milieu 2 × YT est un milieu riche utilisé pour toutes les cultures des différentes souches d'*E. coli*, à l'exception des DH5α transformée à l'aide d'une forme recombinante ou non du plasmide pPICZα, comportant un gène de résistance à la ZéocineTM. Cet antibiotique est en effet inhibé en présence de concentration de NaCl supérieur à 5 g.L⁻¹ et est stable à des pHs voisins de 7,5. La sélection et la culture de souches d'*E. coli* en présence de ZéocineTM est donc réalisée en milieu Low Salt LB.

Tableau II.4. Composition du milieu Low Salt LB

Composant	Origine	Quantité (g.L ⁻¹)
Tryptone	Difco	10
Extrait de levures	Sigma	5
NaCl	Sigma	5
NaOH 10 N	Quantité variable, telle que le pH soit de 7,5	
Agar ^a	Sigma	15

^a : dans le cas Low Salt LB gélosé.

1.3. *PICHIA PASTORIS*

La souche de *Pichia pastoris* utilisée pour ces travaux est *Pc. pastoris* SMD1168H, commercialisée par Invitrogen. Il s'agit d'une souche dérivée de la souche sauvage *Pc. pastoris* X-33. Elle présente un phénotype Mut⁺ (dégradation rapide du méthanol) en ce sens qu'elle comporte le gène *AOX1*. Sa modification principale concerne le gène *pep4*. Elle génère l'inactivation, totale ou partielle, de trois protéases (Protéinase A, Carboxypeptidase Y et Protéinase B). Enfin, rappelons que l'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine est une propriété

souvent utilisée pour sélectionner des transformants de *Pc. Pastoris*. La souche *Pc. pastoris* SMD1168H n'a pas besoin de complément histidine dans son milieu de culture, et la seule pression de sélection utilisée est la ZéocineTM.

Les milieux de culture utilisés pour la culture de *Pc. pastoris* sont présentés dans les tableaux II.5 et II.6. Il s'agit des milieux YPD, YPDS, BMGY et BMMY. Les deux premiers sont des milieux riches voués à la revitalisation de la levure dans le cadre des précultures et des transformations. Les deux derniers sont utilisés pour l'expression de protéines recombinantes par les souches de *Pc. pastoris* modifiées génétiquement. Les cultures de *Pc. pastoris* sont toutes réalisées à 30°C. En milieu liquide, elles ont lieu sous agitation continue (250 rpm) en fiole d'Erlenmeyer bafflée. Les données concernant la culture de *Pc. pastoris* proviennent principalement du document « A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*, version L » [Anonyme, 2000] d'Invitrogen.

Tableau II.5. Composition des milieux YPD et YPDS

Composant	Origine	Quantité (g.L ⁻¹)
Extrait de levures	Sigma	10
Peptone de caséine	Organotechnie	20
D(+) Glucose	Sigma	20
Sorbitol ^a	Sigma	182,2 (1 M)
Agar ^b	Sigma	20

^a : seulement dans le cas du milieu YPDS ; ^b : pour la préparation des milieux YPD gélosé et YPDS gélosé.

Dans un premier temps, l'extrait de levures, la peptone, et, dans le cas du milieu YPDS uniquement, le sorbitol sont dissous dans 900 mL d'eau distillée et autoclavés (120°C, 1 bar, 20 min). Ensuite, 100 mL de glucose 20% (pds:vol) stérilisés par filtration (0,22 µm, Millipore) y sont ajoutés.

Tableau II.6. Composition des milieux BMGY et BMMY

Composant	Origine	Quantité (.L ⁻¹)
Extrait de levures	Sigma	10 g
Peptone de caséine	Organotechnie	20 g
Tampon phosphate de potassium pH 6,0	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (Labosi)	0,1 mol
Yeast Nitrogen Base	Sigma	13,4 g
Glycérol ^a	Sigma	10 mL
Méthanol ^b		5 mL

^a : uniquement pour le milieu BMGY ; ^b : uniquement pour le milieu BMMY

Préparation du milieu BMGY : L'extrait de levures et la peptone sont tout d'abord dissous dans 700 mL d'eau distillée. Le tout est autoclavé (120°C, 1 bar, 20 min). Parallèlement à cela, du tampon phosphate de potassium 1 M à pH 6,0 et du Yeast Nitrogen Base à 13,4 g.L⁻¹ sont préparés et filtrés (0,22 µm, Millipore). Une solution de glycérol 10% (vol:vol) est préparée et stérilisée par autoclave (120°C, 1 bar, 20 min). Lorsque que ces différentes solutions sont froides, 100 mL du tampon phosphate, 100 mL de la solution de Yeast Nitrogen Base et 100 mL de glycérol 10% sont ajoutés aux 700 mL du mélange d'extrait de levures et de peptone.

Préparation du milieu BMMY : La préparation de ce milieu est identique à celle du milieu BMGY, excepté que la solution de glycérol 10% est remplacée par une solution de méthanol 5% (vol:vol) préalablement stérilisée par filtration (0,22 µm, Millipore).

II. PLASMIDES

II.1. PRESENTATION DES PLASMIDES

Les plasmides utilisés au cours de ces travaux sont présentés dans le tableau II.7.

Tableau II.7. Présentation des plasmides utilisés.

Plasmide	Origine/ Références	Utilisation	Résistance
pBSK		Clonage, test de déphosphorylation	Ampicilline
pARHS	Ifremer	Expression en <i>E. coli</i> , promoteur T7	Ampicilline
pET9a	Promega	Expression en <i>E. coli</i> , promoteur T7	Kanamycine
pSJS1240	[Kim <i>et al.</i> , 1998]	Co-expression d'ARNt relatif aux codons rares d' <i>E. coli</i> AGA, AGG et ATA	Spectinomycine
pPICZαa	Invitrogen	Expression en <i>Pc. pastoris</i> , promoteur AOX1	Zéocine™

II.2. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques ayant servi de pression de sélection au cours de ces travaux sont présentés dans le tableau II.8. Sont indiquées également leurs conditions de préparation et d'utilisation. L'ampicilline, la kanamycine et la spectinomycine ont été utilisées pour la sélection de souches d'*E. coli* recombinantes, tandis que la ZéocineTM a permis de sélectionner à la fois des clones recombinants d'*E. coli* et de *Pc. pastoris*. Lors de l'utilisation d'un de ces antibiotiques en complément d'un milieu gélosé, il est additionné au milieu lorsque ce dernier est en surfusion entre 55°C et 60°C.

Tableau II.8. Présentation des antibiotiques.

Antibiotique	Origine	Conditions de stockage	Conditions d'utilisation
Ampicilline	Sigma	100 mg.mL ⁻¹ (-20°C)	100 µg.mL ⁻¹
Kanamycine	Sigma	50 mg.mL ⁻¹ (-20°C)	50 µg.mL ⁻¹
Spectinomycine	Sigma	100 mg.mL ⁻¹ (4°C)	100 µg.mL ⁻¹
Zéocine TM	Invitrogen	100 mg.mL ⁻¹ (-20°C)	25 µg.mL ⁻¹ (<i>E. coli</i>) 100 à 2000 µg.mL ⁻¹ (<i>Pc. pastoris</i>)

III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les techniques de biologie moléculaire décrites dans ce chapitre sont, pour la plupart (à l'exception des kits), adaptées des procédures décrites dans le manuel "Current Protocols in Molecular Biology" [Ausubel *et al.*, 1998].

III.1. PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

III.1.1. Préparation de petits volumes : miniprep

III.1.1.1. Solutions

- *Solution 1* : D(+)-Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, TrisHCl 25 mM, lysozyme 4 mg.mL⁻¹.
Solution filtrée sur 0,22 µm et stockée à 4°C.
- *Solution 2* : SDS 1% (pds:vol), NaOH 0,2 N. Solution stockée à température ambiante.

- *Solution 3* : acétate de potassium 3 M ajusté à pH 4,8 avec de l'acide acétique glaciale. Solution stockée à température ambiante.
- *Phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol)*.
- *Ethanol absolu*.
- *Ethanol 70% (vol:vol)*
- *Solution de TE_{10:1}/RNAse* :
 - TE_{10:1} : TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0. Stockée à température ambiante.
 - Solution stock de RNAse : Ribonucléase A à 5 mg.mL⁻¹ en solution aqueuse. Stockée à -20°C.
 - TE_{10:1}/RNAse : RNAse à 50 µg.mL⁻¹ dans du TE_{10:1}. Stockée à 4°C.

III.1.1.2. Protocole

Les minipreps d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de cultures fraîches ayant atteint la phase stationnaire de croissance. Un volume d'1,5 mL de culture homogénéisée est prélevé et placé en microtube Eppendorf pour être centrifugés (2500 × g, 5 min, 4°C). Le surnageant est jeté et les cellules sont remises en suspension par vortex dans 100 µL de la solution 1. La suspension cellulaire est laissée 5 min à température ambiante. Puis, 200 µL de solution 2 (préchauffée à 37°C) sont ajoutés. Le mélange est agité délicatement pendant 30 sec. Ensuite, l'action de la solution 2 est arrêtée par ajout de 150 µL de solution 3 et homogénéisation. Le mélange est alors laissé 5 à 10 min dans la glace. Puis, un demi volume, soit 250 µL, de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol) est ajouté. La solution biphasique est homogénéisée par vortex pendant 45 sec. Après centrifugation (10000 × g, 2 min, 20°C), la phase aqueuse est prélevée et additionnée d'1 mL d'éthanol absolue à -20°C afin de faire précipiter l'ADN. Pour favoriser la précipitation, le mélange est laissé une nuit à -20°C ou 20 min à -80°C. Puis, l'ADN précipité est récupéré par centrifugation (7000 × g, 30 min, 4°C), le surnageant est jeté et le culot séché. Ce dernier est lavé dans 200 µL d'éthanol 70% (vol:vol) à -20°C, centrifugé (16000 × g, 5 min, 4°C) et séché. Il est enfin repris dans 40 µL de la solution de TE_{10:1}/RNAse. Après incubation (30 min à 45°C), l'ADN plasmidique obtenu est stocké à 4°C ou à -20°C.

III.1.2. Préparation de grands volumes : midi- et maxi-prep

La préparation de quantités plus importantes d'ADN plasmidique, afin d'en obtenir de 1 à 10 µg, a été réalisée à l'aide de kits commerciaux utilisant le principe de la lyse alcaline suivie d'une purification de l'ADN sur colonne de silice. Les références de ces kits sont les suivantes : GenElute Plasmid Midi-Prep Kit (Sigma) ; GenElute Plasmid Maxi-Prep Kit (Sigma) ; QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

III.2. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE

III.2.1. Extraction d'ADN génomique de *P. abyssi*

III.2.1.1. Solutions

- *Solution de lavage* : tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 50 mM à pH 7,5 ; NaCl 0,5 M.
- *Phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol)*.
- *Ethanol absolu*.
- *Ethanol 70% (vol:vol)*.
- *TE_{10:1}* : cf. III.1.1.1.
- *Sarkosyl 10%* (pds:vol) en solution aqueuse.
- *Protéinase K* à 20 mg.mL⁻¹ en solution aqueuse.
- *TE_{10:1}/RNase* : cf. III.1.1.1.

III.2.1.2. Protocole

L'extraction d'ADN génomique de *P. abyssi* est réalisée à partir d'une culture fraîche de 40 mL. La culture est d'abord dégazée et transférée dans un tube à centrifugation de 50 mL (Falcon). Ensuite, la procédure est la suivante :

Lavage des cellules : Afin d'éliminer le soufre du milieu, le tube est agité et laissé à décanter pendant 2 min. Puis, une fois le soufre sédimenté, le surnageant est transvasé dans un nouveau tube de 50 mL. Cette opération est répétée 3 ou 4 fois. Le surnageant est alors centrifugé (6400 × g, 25 min, 4°C) et le culot cellulaire est repris dans 10 mL de solution de lavage. La suspension cellulaire est à nouveau lavée du soufre restant par trois séries de

décantation/transvasement. La suspension finale est centrifugée ($6400 \times g$, 25 min, 4°C) et le culot est repris dans $300 \mu\text{L}$ de $\text{TE}_{10:1}$.

. *Lyse des cellules* : Un volume de $50 \mu\text{L}$ de Sarkosyl 10% (pds:vol) est additionné aux $300 \mu\text{L}$ de suspension cellulaire et le tout homogénéisé. Puis, $20 \mu\text{L}$ de la solution de Protéinase K à 20 mg.mL^{-1} sont ajoutés. Le tout est homogénéisé et mis en incubation à 37°C pendant 2 h en bain d'eau thermostaté.

. *Extraction de l'ADN génomique* : Au lysat cellulaire sont ajoutés $500 \mu\text{L}$ de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol), pH 8,0. La suspension est homogénéisée délicatement et centrifugée ($15000 \times g$, 4 min, 20°C). La phase aqueuse est récupérée et lavée 3 fois avec $500 \mu\text{L}$ de phénol/chloroforme/isoamylalcool pH 8,0. Elle est ensuite additionnée d'1 mL d'éthanol absolu à -20°C afin de faire précipiter l'ADN. Il doit y avoir formation d'une pelote blanche. La suspension est alors placée un quart d'heure à -20°C pour favoriser la précipitation. Elle est ensuite centrifugée ($7000 \times g$, 20 min, 4°C) et le surnageant est jeté. Puis, le culot est lavé dans $500 \mu\text{L}$ d'éthanol à 70% (vol:vol), à -20°C , sans agiter. Le culot est à nouveau récupéré par centrifugation ($7000 \times g$, 5 min, 4°C) et est séché à température ambiante. Enfin, le culot d'ADN est repris sans agitation dans $100 \mu\text{L}$ de $\text{TE}_{10:1}$ RNase et placé en incubation à 37°C pendant 1 h. Il est enfin stocké à 4°C ou à -20°C .

III.2.2. Extraction d'ADN génomique de *Pc. pastoris*

Ce protocole est adapté de la méthode indiquée dans le document d'Invitrogen « A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*, version L » [Anonyme, 2000].

III.2.2.1. Solutions

- *Solution SCED* : Sorbitol 1 M, citrate de sodium 10 mM pH 7,5 ; EDTA 10 mM, DTT 10 mM. A préparer avant la manipulation.
- *Lyticase* : Lyticase (Sigma) à 3 mg.mL^{-1} en solution aqueuse. Stockée à -20°C .
- *SDS 1%* : Sodium dodécyl sulfate à 1% (pds:vol).
- *Acétate de potassium 5 M* à pH 8,9.
- *$\text{TE}_{10:1}$ pH 7,4* : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4.

- *TE_{10:1} pH 8,0* : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- *Acétate d'ammonium 7,5 M* à pH 7,5.
- *Phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol)*.
- *Ethanol absolu*.
- *Ethanol 70% (vol:vol)*.

III.2.2.2. Protocole

L'extraction d'ADN génomique de *Pc. pastoris* est réalisée à partir de 10 mL d'une culture fraîche d'une nuit en milieu YPD ayant atteint une D.O.₆₀₀ entre 5 et 10. La procédure est la suivante :

. *Lavage des cellules* : La culture est centrifugée ($1500 \times g$, 10 min, température ambiante). Le surnageant est jeté et les cellules lavées avec 10 mL d'H₂OmQ stérile par remise en suspension suivie d'une centrifugation dans les mêmes conditions que ci-dessus. Le culot est alors resuspendu dans 2 mL de solution SCED fraîchement préparée.

. *Lyse des cellules* : Un volume de 100 μ L de lyticase est ajouté à la suspension cellulaire. Le tout homogénéisé et mis en incubation à 37°C pendant 50 min. Puis, 2 mL de SDS 1% sont additionnés et mélangés délicatement. Le mélange est laissé 5 min sur la glace.

. *Extraction de l'ADN génomique* : Au lysat cellulaire sont ajoutés 1,5 mL d'acétate de potassium 5 M à pH 8,9. Le tout est homogénéisé délicatement puis centrifugé ($10000 \times g$, 10 min, 4°C). Le surnageant est récupéré et deux volumes, soit environ 11,5 mL, d'éthanol absolu sont ajoutés afin de faire précipiter l'ADN. La précipitation est réalisée à température ambiante pendant 15 min. L'ADN précipité est récupéré par centrifugation ($10000 \times g$, 20 min, 4°C). Le culot est resuspendu délicatement dans 700 μ L de TE_{10:1} à pH 7,4. Un volume, soit 700 μ L, de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1, vol:vol:vol) pH 8,0 est ajouté, mélangé en douceur et le tout centrifugé ($10000 \times g$, 5 min, 4°C). La phase aqueuse est séparée en deux fractions, réparties dans deux tubes. A chacune de ces fractions, 175 μ L d'acétate d'ammonium 7,5 M à pH 7,5 ; et, 700 μ L d'éthanol absolu sont ajoutés. Un fois mélangé, le tout est laissé sur la glace pendant 10 min ou à -20°C pendant 1 h. L'ADN est récupéré par centrifugation ($10000 \times g$, 20 min, 4°C). Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol

70% (vol:vol), séché et resuspendu dans 50 μ L de TE_{10:1} pH 8,0. L'ADN génomique de *Pc. pastoris* peut alors être stocké à 4°C ou à -20°C.

III.3. TECHNIQUES DE MODIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN

III.3.1. Digestion

Pour la réalisation de constructions génétiques, diverses endonucléases de restriction ont été utilisées. Le tableau II.9 présente la composition standard des mélanges réactionnels, les conditions de réaction enzymatiques ainsi que les enzymes utilisées au cours de ces travaux.

Tableau II.9. Composition des mélanges réactionnels de digestion de fragments d'ADN, conditions de réaction enzymatique et enzymes utilisées.

Composition	Composant	Quantité
	ADN	0,01 à 10 μ g
	Tampon commercial enzyme	Selon les recommandations du fournisseur 1 U par μ L de mélange réactionnel
	H ₂ OmQ	10 à 500 μ L q.s.p.
Conditions (temps, température)		2 h, 37°C
Enzymes utilisées (nom, origine[s])	<i>Nde</i> I (Roche, New England Biolabs), <i>Bam</i> HI (Roche, New England Biolabs), <i>Xho</i> I (Roche), <i>Xba</i> I (Roche), <i>Eco</i> RI (Roche), <i>Eco</i> RV (Roche), <i>Sac</i> I (New England Biolabs)	

III.3.2. Déphosphorylation

Des fragments d'ADN linéaires ont été déphosphorylés. Les conditions de déphosphorylation sont présentées dans le tableau II.10. La phosphatase alcaline commerciale de Roche, fournie avec son tampon de réaction enzymatique, a été utilisée.

Tableau II.10. Composition des mélanges de déphosphorylation et conditions de réaction

Composition	Composant	Quantité
	ADN	50 à 100 ng
	Tampon commercial CIAP ^a	Selon les recommandations du fournisseur 0,5 U par μ L de mélange réactionnel
	H ₂ OmQ	20 à 100 μ L q.s.p.
Conditions	Temps, température	2 h, 37°C

^a : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase.

III.3.2. Ligature

Les ligatures de fragments d'ADN ont été réalisées dans les conditions décrites dans le tableau II.11. La ligase commerciale de Roche, fournie avec son tampon de réaction enzymatique, a été utilisée.

Tableau II.11. Composition des mélanges de ligature et conditions de réaction

Composition	Composant	Ligature de bouts cohésifs		Ligature de bouts francs	
		Quantité		Quantité	
	ADN	50 à 100 ng			
	Tampon commercial	Selon les recommandations du fournisseur			
	DNA ligase T4	2 U			
	H ₂ Omq	20 µL q.s.p.			
Conditions	Rapport molaire insert:vecteur	1 à 3		3 à 10	
	Temps, température	Une nuit, 4°C		Une nuit, 15°C	

En fin de réaction, le mélange de ligature est utilisé tel quel dans le cas d'une transformation au CaCl₂. En revanche, s'il doit être utilisé dans le cadre d'une transformation par électroporation, il est préalablement dialysé sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,05 µm (Millipore) afin d'ôter les sels du tampons qui pourraient causer un éventuel arc électrique.

III.4. TECHNIQUES DE PURIFICATION ET D'ANALYSE D'ADN

III.4.1. Purification de fragment d'ADN

Ces techniques ont été utilisées pour séparer l'ADN de diverses enzymes (endonucléases de restriction, phosphatase alcaline, etc...), pour changer de tampon de stockage, pour concentrer les échantillons d'ADN.

III.4.1.1. Purification par précipitation

Pour 20 µL d'ADN en solution, sont ajoutés 10 µL d'acétate de potassium 3 M et 70 µL d'éthanol absolu (stocké à -20°C). Le mélange est homogénéisé puis placé à -80°C pendant 20 min ou -20°C pendant une nuit. Ensuite, il est centrifugé (7000 × g, 30 min, 4°C). Le

surnageant est jeté et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% (stocké à -20°C). Il est récupéré par centrifugation ($16000 \times g$, 5 min, 4°C) et le surnageant à nouveau jeté. Le culot est enfin séché et remis en solution dans de l'eau ultrapure ou du $\text{TE}_{10:1}$.

III.4.1.2. Purification sur colonne de silice

Un kit commercial de purification de fragment d'ADN sur colonne de silice a été utilisé. La référence de ce kit est : QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Il permet de purifier des fragments de taille entre 0,1 et 10 kb par adsorption/désorption sur une matrice de silice.

III.4.1.3. Purification par excision d'un gel d'agarose

Des fragments d'ADN ont été purifiés après migration sur gel d'agarose à l'aide du kit commercial Gene Clean II (Bio101). Le principe de ce kit est le suivant : dissolution du morceau d'agarose en présence de NaI, et purification de l'ADN par adsorption/désorption sur des microbilles de silice.

III.4.2. Analyse de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Des gels d'agarose à 0,8% et 1% ont été préparés par dissolution de, respectivement, 0,8 et 1 g d'agarose (Sigma) dans 100 mL de solution TAE et ajout de 10 μL de bromure d'éthidium à 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sigma). La composition de la solution TAE est : Tris-acétate 40 mM et EDTA 1 mM, à pH 8,3. Les échantillons d'ADN ont été déposés après dissolution dans un tampon de charge. Les migrations de fragments d'ADN ont été réalisées dans un bain de TAE sous une tension constante de 70 à 100 V. Le marqueur de taille (SmartLadder, Eurogentec, Belgique) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les fragments d'ADN ont été visualisés sous lumière ultraviolette.

III.5. AMPLIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Des réactions de PCR ont été réalisées afin d'amplifier des fragments d'ADN à partir de différents substrats : ADN génomique, plasmide ou fragment linéaire. De plus, selon le fragment à amplifier, différentes amorces ont été utilisées.

Les compositions des mélanges réactionnels pour la PCR et les conditions de réactions sont présentées dans les tableaux II.12 et II.13.

Tableau II.12. Composition du mélange réactionnel de PCR.

Composant	Quantité
dNTP	10 nmol
Amorce 1	100 pmol
Amorce 2	100 pmol
Tampon commercial	Dilué selon les recommandations du fournisseur
ADN polymérase ^a	1,5 U
ADN	Quantité variable (0,1 à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
H ₂ Omq	50 μL q.s.p.

^a : *Taq* DNA polymerase ou *Pfu* DNA polymerase

Tableau II.13. Conditions de réaction de PCR

Cycle	<i>Taq</i> DNA polymerase	<i>Pfu</i> DNA polymerase
1	94°C, 5 min	94°C, 5 min
2	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec
	50°C, 30 sec	50°C, 30 sec
	72°C, 1 min/kb	72°C, 2 min/kb
3	72°C, 15 min	
Nombre de cycle 2	8 à 10 ou 20 ^a	25

^a : 8 à 10 dans le cadre d'un fragment à cloner, 20 dans le cas d'une vérification de la présence d'un insert dans une construction.

III.6. TRANSFORMATION DE CELLULES

III.6.1. Transformation de souches d'*E. coli* au CaCl_2

III.6.1.1. Solutions

- *Solution de CaCl_2* : CaCl_2 à 50 mM, stérile et maintenue à 4°C pendant toute la manipulation.
- *Glycérol* : Glycérol 100%, stérile et maintenu à 4°C pendant toute la manipulation.

III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes

Un volume de 100 mL de milieu 2 × YT estensemencé au 100^{ième} (vol:vol) à l'aide d'une préculture fraîche. La culture est laissée en incubation à 37°C sous agitation pendant 3 h à 3 h 30. La croissance des cellules est arrêtée dans la glace lorsque la densité optique à 600nm atteint 0,2 à 0,3. La culture est alors centrifugée (2000 × g, 5 min, 4°C) et le surnageant est jeté. Les cellules sont ensuite reprises délicatement dans un demi volume, soit 50 mL, de solution de CaCl_2 , et, laissées dans la glace pendant 20 min. La suspension cellulaire est à nouveau centrifugée dans les mêmes conditions, le surnageant est jeté et les cellules reprises dans un trentième du volume initial, soit 4 mL, de la solution de CaCl_2 . Enfin, 750 µL de glycérol stérile à 4°C sont ajoutés. La suspension cellulaire est homogénéisée et aliquotée en fraction de 400 µL. Les cellules ainsi rendues compétentes sont utilisées immédiatement ou stockées jusqu'à 6 mois à -80°C.

III.6.1.3. Transformation

A 50 µL de cellules compétentes (cf. III.6.1.2.), préalablement décongelées dans la glace, sont mélangées délicatement à un volume maximal de 10 µL d'ADN en solution. Le mélange est laissé dans la glace pendant 20 min, puis incubé 50 sec à 42°C et à nouveau laissé dans la glace pendant 3 min. Ensuite, 400 µL de milieu 2 × YT sont ajoutés et la suspension cellulaire mélangée délicatement. Cette dernière est ensuite placée en incubation à 37°C pendant 1 h 30. Enfin, 50, 100 et 300 µL sont étalés sur trois boîtes de Petri contenant du milieu 2 × YT gélosé sélectif. Les boîtes sont placées en incubation une nuit à 37°C.

III.6.2. Electrotransformation d'*E. coli*

III.6.1.1. Solutions

- *H₂OmQ* stérile.
- Glycérol 10% (vol:vol) stérile.

III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes

Un volume de 100 mL de 2 × YT estensemencé au 100^{ième} à partir d'une culture fraîche et mis en incubation sous agitation continue (250 rpm) à 37°C. Lorsque la densité optique à 600 nm de la culture atteint 0,5 à 0,7, les cellules sont récupérées par centrifugation (2000 × g, 10 min, 4°C). Elles sont ensuite lavées successivement dans 100 mL, puis 50 mL d'*H₂OmQ* stérile à 0°C, et enfin dans 5 mL de glycérol 10% (vol:vol) stérile à 0°C. Lors de ces lavages successifs, les cellules sont toujours remises en suspension délicatement et les conditions de centrifugation sont identiques à celles citées ci-dessus. Après le dernier lavage, les cellules sont reprises dans 1 mL de glycérol 10% stérile à 0°C. Elles sont enfin aliquotées en fractions de 100 µL et sont stockées dans la glace pour une utilisation immédiate ou à -80°C pour un stockage de plusieurs mois.

III.6.1.3. Transformation

A 100 µL de cellules compétentes fraîchement préparées ou décongelées sont ajoutés un volume maximal de 10 µL de la solution d'ADN. Les cellules et l'ADN sont mélangés délicatement et le mélange placé 5 min sur la glace. Le tout est ensuite transféré dans une cuve d'électroporation stérile (1 mm, Biorad) préalablement refroidie dans la glace. La cuve est alors placée entre les électrodes de l'électro-porateur (Biorad Gene Pulser, Gene Controller). Ce dernier est réglé sur les conditions suivantes : 2500 V, 25 µF, 200 Ω. Le choc électrique est alors donné et la constante de temps relevée. Les cellules sont reprises dans 900 µL de milieu 2 × YT non-sélectif et mises à incuber à 37°C pendant 1 h. Elles sont enfin étalées sur milieu 2 × YT gélosé sélectif. Les boîtes de Petri sont placées à l'incubateur, à 37°C pendant une nuit.

III.6.3. Electrotransformation de *Pc. pastoris*

Ce protocole est adapté de la méthode indiquée dans le document d'Invitrogen « A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*, version L » [Anonyme, 2000].

III.6.1.1. Solutions

- *H₂OmQ* stérile.
- *Sorbitol 1 M* stérile.

III.6.1.2. Préparation des cellules compétentes

Les cellules électro-compétentes sont préparées à partir de 500 mL d'une culture de *Pc. pastoris* en milieu YPD ayant atteint une densité optique à 600 nm entre 1,3 et 1,5. Les cellules sont tout d'abord récupérées par centrifugation ($1500 \times g$, 5 min, 4°C). Elles sont lavées successivement dans 500 mL, puis 250 mL d'*H₂OmQ* stérile à 0°C, et enfin dans 20 mL de sorbitol 1 M stérile à 0°C. Lors de ces lavages successifs, les cellules sont toujours remises en suspension délicatement et les conditions de centrifugation sont identiques à celles citées ci-dessus. Après le dernier lavage, les cellules sont reprises dans 1,5 mL de sorbitol 1 M stérile à 0°C. Elles sont enfin placées dans la glace et utilisées dans les heures qui suivent.

III.6.1.3. Transformation

A 80 μL de cellules compétentes fraîchement préparées sont ajoutés un volume maximal de 10 μL de plasmide linéaire en solution à une concentration de $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans de l'*H₂OmQ*. Les cellules et l'ADN sont mélangées délicatement et placées 5 min sur la glace. Le tout est ensuite transféré dans une cuve d'électroporation stérile (2 mm, Biorad) préalablement refroidie dans la glace. La cuve est alors placée entre les électrodes de l'électroporateur (Biorad Gene Pulser, Gene Controller). Ce dernier est réglé sur les conditions suivantes : 1500 V, 25 μF , 400 Ω . Le choc électrique est alors donné et la constante de temps relevée. Les cellules sont reprises dans 1 mL de sorbitol 1 M à 0°C, sont transférées dans une tube stérile de 15 mL et mises à incuber à 30°C pendant 1 h, sans agitation. Ensuite, 1 mL de milieu YPD

non-sélectif est ajouté et l'incubation à 30°C est prolongée durant 1 h sous agitation (200 rpm). Elles sont enfin étalées sur milieu YPDS gélosé sélectif. Les boîtes de Petri sont placées à l'incubateur, à 30°C pendant deux à quatre jours, jusqu'à formation de colonies.

IV. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les techniques dans ce chapitre sont adaptées de la méthode de Laemmli (1970) et des procédures décrites dans le manuel "Protein Methods" [Bollag & Edelstein, 1991].

IV.1. ANALYSE EN CONDITIONS DENATURANTES

IV.1.1. Solutions

- *Solution A* : Solution d'acrylamide/bis-acrylamide à 40%, ratio 37,5:1 (Sigma). Stockée à 4°C.
- *Solution B* : SDS 0,4% (pds:vol), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. Stockée à 4°C.
- *Solution C* : SDS 0,4% (pds:vol), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8. Stockée à 4°C.
- *APS 10%* : persulfate d'ammonium 10% (pds:vol). Stockée à 4°C.
- *TEMED* : N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (Euromedex)
- *Tampon de migration* : SDS 0,1% (pds:vol), glycine 192 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,3. Stockée à température ambiante.
- *Bleu de dépôt 5X* : SDS 2% (pds:vol), glycérol 25% (vol:vol), 2-mercaptoéthanol 14,4 mM, bleu de bromophénol 1%, Tris-HCl 60 mM, pH 6,8. Stocké à -20°C.
- *Solution de coloration* : Acide acétique 10% (vol:vol), éthanol 30% (vol:vol), bleu de Coomassie 0,1% (pds:vol). Stockée à température ambiante.
- *Solution de décoloration* : Acide acétique 10% (vol:vol), éthanol 30% (vol:vol). Stockée à température ambiante.

IV.1.2. Protocole

Le protocole qui suit est adapté à l'utilisation des systèmes MiniProtean II et MiniProtean III (Biorad), pour la confection de mini-gels (6 mm × 8 mm × 0,75 mm). Les gels sont coulés en deux parties : le gel de séparation et le gel de charge. Le tableau II.14 donne la composition du gel de séparation en fonction de la concentration en acrylamide finale utilisée au cours de ces travaux. Les solutions A et B ainsi que l'H₂O_mQ sont d'abord mélangées. Immédiatement après avoir ajouté l'APS 10% et le TEMED, 3,6 mL du mélange sont coulés par gel à réaliser et laissés à température ambiante jusqu'à ce que la polymérisation soit effective. Le gel de charge est alors préparé et coulé, le peigne y est placé immédiatement, sa composition est présentée tableau II.15. Une fois polymérisé, le gel est placé dans le support pour migration. Le tampon de migration est ajouté et les échantillons déposés dans les puits. Ils sont préparés en diluant cinq fois le bleu de dépôt avec les extraits protéiques à analyser, et, sont incubés 10 min à 95°C. La migration a lieu au voltage constant de 200 V. Après la migration, les protéines sont colorées par incubation du gel dans la solution de coloration pendant 30 min à une nuit, puis incubation dans la solution de décoloration pendant 30 min à quelques heures.

Tableau II.14. Composition d'un gel de séparation.

Solutions	Concentration finale en acrylamide (pds:vol)	
	10%	12%
A	2,5 mL	3 mL
B	2,5 mL	2,5 mL
H ₂ O _m Q	5 mL	4,5 mL
APS 10%	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Tableau II.15. Composition d'un gel de charge.

Solution	Volume
A	0,5 mL
B	1 mL
H ₂ O _m Q	2,5 mL
APS 10%	50 µL
TEMED	10 µL

IV.2. ANALYSE EN CONDITIONS NATIVES

IV.2.1. Solutions

Les solutions pour gel de polyacrylamide en conditions natives sont identiques à celles présentées en IV.1.1. mais sans SDS, ni 2-mercaptoéthanol.

IV.2.2. Protocole

Le protocole de confection des gels en conditions natives est identiques à celui décrit dans le chapitre IV.1.2. à l'exception du fait que les échantillons sont préparés sans incubation à haute température et la migration a lieu à une intensité constante de 17,5 mA.

IV.3. ZYMOGRAMME : TEST D'ACTIVITE ENZYMATIQUE SUR GEL

L'activité phosphatase alcaline d'un échantillon peut être testée après migration de ce dernier sur gel de polyacrylamide en conditions natives. Pour cela, le gel est incubé pendant 15 min à 70°C en présence d'un substrat, le 4-méthylumbellyférylphosphate (4-MUFP), dans la solution décrite tableau II.16. L'activité enzymatique est ensuite révélée sous lumière ultraviolette.

Tableau II.16. Composition des solutions de substrat utilisées pour les zymogrammes

	Composant	Concentration
Solution 1	Tampon Glycine-NaOH pH 10,0	50 mM
	4-MUFP	2,5 mM
	CoCl ₂	1 mM
Solution 2	Tampon Tris-HCl pH 10,0	200 mM
	4-MUFP	2,5 mM
	MgCl ₂	1 mM

PARTIE III

ANALYSE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUE ET PEPTIDIQUE

SOMMAIRE DE LA PARTIE III

<i>Avant-propos</i>	67
I. ANALYSE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE	67
I.1. ENVIRONNEMENT GENOMIQUE.....	67
I.2. SEQUENCES FLANQUANTES ET CODANTES.....	69
I.2.1. Signaux putatifs de transcription.....	69
I.2.2. Signaux putatifs de traduction.....	69
I.3. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES.....	69
I.4. USAGE DES CODONS.....	71
II. ANALYSE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE	73
II.1. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES GENERALES.....	73
II.2. IDENTIFICATION DES SITES INTERESSANTS.....	74
II.2.1. Le site actif.....	76
II.2.2. Sites putatifs de N-glycosylation.....	77
II.2.3. Site putatif de fixation du Ca ²⁺	77
II.3. IDENTITES RELATIVES.....	78
II.4. ELEMENTS DE STRUCTURE SECONDAIRE.....	80
CONCLUSION	82

AVANT-PROPOS

Dans le cadre de la valorisation de la collection de souches thermophiles de l'Ifremer, en collaboration avec le C.N.R.S., le séquençage complet du génome de la souche *Pyrococcus abyssi* a été réalisé au Centre National de Séquençage (C.N.S., Génoscope, Evry). La séquence du génome peut être consultée sur le site web du Génoscope (<http://www.genoscope.fr/Pab/>). Son annotation a mobilisé les équipes de Jacques Dietrich (Ifremer, Brest), Patrick Forterre (Université d'Orsay, Paris) et Jean-Claude Thierry (I.G.B.M.C., Strasbourg). Ces analyses ont permis dans un premier temps de localiser un certain nombre de cadres ouverts de lecture. Parmi les séquences ainsi référencées, une étude complémentaire, a aboutit à la mise en évidence du gène *phoA*, sur la base d'homologie de structures primaires avec d'autres phosphatases alcalines préalablement décrites. Il a été ainsi établi que le gène *phoA*, identifié dans le génome de *P. abyssi*, code hypothétiquement pour une phosphatase alcaline. Ce gène est référencé sous les numéros d'accèsion PAB2366 pour la base de donnée du Génoscope et pir|E75081 pour la base de donnée PIR (Protein Information Ressource).

Une étude bio-informatique du gène *phoA* a été réalisée, en vue d'obtenir des informations relatives aux phases expérimentales de clonage du gène, d'expression et de caractérisation de la protéine d'intérêt. Ces travaux s'attardent tout d'abord sur la séquence nucléotidique avant d'en venir à la séquence peptidique, codée par *phoA*.

I. ANALYSE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE

Le gène *phoA* est situé sur le troisième cadre de lecture dans le sens 5'-3', aux positions [+1001913 ; +1003397] du génome de *P. abyssi*. Sa taille est de 1485 pdb.

I.1. ENVIRONNEMENT GENOMIQUE

Le tableau III.1 présente les gènes environnant le gène *phoA* dans le génome de *P. abyssi*. Il apparaît que la zone [+1000765 ; +1008599] du génome de *P. abyssi* est dédiée à la gestion du phosphate par la cellule. Le gène *phoA* est le seul gène de cette zone lié au métabolisme du phosphate. Son environnement immédiat est constitué, outre les gènes

inconnus, de gènes liés aux processus cellulaires de transport du phosphate. Ces gènes (*phoX*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*) ont de plus leurs spécificités (perméase, régulation,...). Ainsi, cette zone se présente comme un ensemble de gènes organisant la régulation et le métabolisme du phosphate chez *P. abyssi*, ce qui rappelle le modèle du réseau *pho* établi pour *E. coli*, *B. subtilis* (cf. partie I : revue bibliographique). De plus, il est intéressant de noter la présence, dans l'environnement génomique immédiat de *phoA*, de deux copies de gènes codant pour deux protéines non caractérisées, proches des endonucléases de type apurinic/apyrimidinic. Etant donné que la phosphatase alcaline déphosphoryle les fragments d'ADN linéaire, il est possible qu'entre autre, elle agisse de concert avec ces endonucléases putatives pour dégrader l'ADN endommagé dans la cellule [Flament D., communication personnelle].

Tableau III.1. Description des cadres ouverts de lecture environnant *phoA* sur le chromosome de *P. abyssi*

Numéro d'accèsion (Génoscope)	Nom	Début Fin Taille (pdb) Cadre de lecture 5'-3'	Description (d'après http://www.genoscope.fr/pab/)
PAB2365	<i>phoX</i>	+1000765 +1001913 1149 1	Transporteur de phosphate ABC, protéine périplasmique de fixation du phosphate
PAB2366	<i>phoA</i>	+1001913 +1003397 1485 3	Précurseur phosphatase alcaline
PAB0698	<i>pstC</i>	+1004961 +1005872 912 3	Transporteur de phosphate ABC, protéine perméase
PAB0699	<i>pstA</i>	+1005862 +1006692 831 1	Transporteur de phosphate ABC, protéine perméase
PAB0700	<i>pstB</i>	+1006611 +1007450 840 3	Transporteur de phosphate ABC, protéine de fixation d'ATP
PAB0702	<i>phoU</i>	+1008006 +1008599 594 3	Transporteur de phosphate ABC, protéine de régulation

I.2. SEQUENCES FLANQUANTES ET CODANTES

I.2.1. Signaux putatifs de transcription

La séquence consensus de boîte A (ou boîte TATA) des Archaea (5'-T/CTTAT/AA-3' ; Palmer & Daniels, 1995) trouve une séquence similaire en amont du gène *phoA* de *P. abyssi* en [-29 ; -24] du site d'initiation de la traduction (figure III.1). Un autre motif, en [-37 ; -33], est un bon candidat pour faire office de boîte A, étant donné qu'il correspond à un promoteur identifié chez *P. furiosus*, espèce taxonomiquement très proche de *P. abyssi* [van der Oost *et al.*, 1998]. De même, la séquence consensus de la boîte B des Archaea (5'-A/TTGA/C-3' en -10, [Reiter *et al.*, 1990]) trouve une séquence similaire en [-10 ; -7] (figure III.1). Un pentamère de thymine en aval du gène *phoA* pourrait correspondre à un signal de terminaison de transcription [Pülher *et al.*, 1989] (figure III.1).

I.2.2. Signaux putatifs de traduction

Un motif putatif de Shine-Dalgarno est présent en [-6 ; -3] en amont du gène *phoA*, et indiqué sur la séquence [Pülher *et al.*, 1989]. La partie traduite du gène commence par le codon GTG et se termine par le codon stop TAA. D'après van der Oost *et al.* (1998), 15% des gènes d'Archaea ont un triplet GTG comme codon de début de traduction (82%, ATG ; 3%, TTG). Ces motifs sont mis en évidence figure III.1.

Ces signaux putatifs de transcription et de traduction rappellent ainsi des conclusions déjà établies indiquant pour les Archaea un système de transcription inspiré de celui des Eucaryotes et un système de traduction similaire à celui des Bactéries [van der Oost *et al.*, 1998].

I.3. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES

La composition du gène *phoA* en bases nucléotidiques est la suivante : A (475 - 32,0%) , C (267 - 18,0%) ; G (374 - 25,2%) ; T (369 - 24,8%). Le G + C% est ainsi de 43,16, ce qui de l'ordre de la valeur de 44,71%, pour l'ensemble du génome de *P. abyssi*.

-99 AGAAGGACAGAAACCAGAGAACCTAGCTCCAGGGTACGTTGGTCTTCCTAAAGAAGTTGCTGAAATTGGCTTGAAAGCCG -20

A A

-19 TAGAAATGATTGAGAGAGGTCATGAAGATGAAGCTTGCTCGATTTTACTAATTTTATAATCTTCTCTCCATGTTTC 61
M M K M K L A R F L L I F I I F S S M F 20

B SD ←-----peptide signal-----

-----→

62 CATTGCTAACGCACTCCAAGCGGAGTCAGAAACGTCATAATATTAATAGGGGACGGAATGGGATTCTCCAGCTTCAG 141
21 P F A N A S P S G V R N V I I L I G D G M G F S Q L Q 47

*

142 CTAACATAACTAGTTTACGGGCATTTAAACATGGAAGACTTTCATACACGGGAATAGAACTTACTGATTCTTAAGTGG 221
48 L T K L V Y G H L N M E D F P Y T G I E L T D S L S G 74

222 TGAAGTTACAGATTCAGCTGCCGCTGGAACCTGCAATCGCCACTGGGGTTAAAACCTACAACAGGATGATCTCAACAACCA 301
75 E V T D S A A A G T A I A T G V K T Y N R M I S T T 100

302 ACGTTACAGGAAACTCGTGAACCTCAGACTTTGTTGGAATGCTCAAATGCTTGAAAGCGACTGGTTTGGTGACT 381
101 N V T G K L V N L T T L L E I A Q M L G K A T G L V T 127

* *

382 ACAACAAGGATAACCCACGCGACTCCTGCGGTGTTGCATCCCACGTTCCCACAGGGATATGGAAGAAGAAATGCGAG 461
128 T T R I T H A T P A V F A S H V P D R D M E E E I A R 154

462 GCAGTTGATTCTCCACAACGTCACGGTCTTATGGGAGGGGAAGGGAGAAATTCAGTGAGGAGGTACTAAAGCTAGCCG 541
155 Q L I L H N V T V L M G G G R E K F S E E V L K L A 180

*

542 AGGATTATGGGTATAGTATAGTCTACACTAGAGAGGATCTTGAAGGTCAGGATGGAAGGTCCTTGGATTATTCGCC 621
181 E D Y G Y S I V Y T R E D L E K V K D G K V L G L F A 207

622 GAAGGCCATCTCCATACGTCCTAGATAGAAGTGAGGAAGATGTAAGTCTCCTGGAAATGACTAAGAAAGCTATAGAGAT 701
208 E G H L P Y V L D R S E E D V S L L E M T K K A I E I 234

702 ACTGGAGAAGAACCCTAAATGGATTCTTCTAATGATTGAAGGGGTAGAATTGACCATGCATGCCATGCAAATGACGTTG 781
235 L E K N P N G F F L M I E G G R I D H A C H A N D V 260

782 CTTCATAGTTGCAGAAACTAAAGAATTTGACGACGTTGTTGGTTATGTATTAGATTACGCAAGAAGGAGAGGGGACACC 861
260 A S I V A E T K E F D D V V G Y V L D Y A R R R G D T 287

862 CTGTTATAGTTCTTTCGGATCATGAGACTGGAGGCTAGGAATGGATTGAACTATGGACACTCGGTGGATATAGACTC 941
288 L V I V L A D H E T G G L G I G L N Y G H S V D I D S 314

942 TATAAGGAGGATAGACGCAAGCATTGAAGAGATGTCTAAGGAAATTAAGGAGGGGACATAAGGGATGTTATTAGAA 1021
315 I R R I D A S I E E M S K E I K S G G D I R D V I R 340

(figure III.1. : suite page suivante)

```

1022 GGCACACTGGATTAGAGTTAACGGATGAAGAGGTTAAGGAAATAGAAGAAGCGAAGAAGCTCAACAAACAATAACGCATT 1101
341 R H T G L E L T D E E V K E T E E A K N S T N K Y A L 367
*

1102 GGAAACATATAGGAGAGATAATCTCTAAAAAGCTTGGAGTTGGATTTCGTGTCCACAAGCACACTGGTGAACCTGTTCC 1181
368 G N I T I G E T I I S K K L G V G F V S H K H T G E P V P 394

1182 ACTTCTAGCTTACGGACCTGGAGCCGAGAACTTCGTTGGCTTCAAGCACCATGTAGATACTGCAAAGGTCATAGCCAAGC 1261
395 L L A Y G P G A E N F V G F K H H V D T A K V T A K 420

1262 TAATGATATTTGGAGACAGGTCAATATCCTTTACAATCAAGGGAGTAAGCAAGATTAAGGGAGATGTCACGGGAGATTAC 1341
421 L M T I F G D R S T S F T I K G V S K I K G D V T G D Y 447

1342 AGGGTAGATGAAAGGGATGCCTACGCAACTCTAATGTTACTACTAGGAGATCTCGTTGATACGGAACCTAGAGAACATTGC 1421
448 R V D E R D A Y A T L M L L L G D L V D T E L E N I A 474

1422 AGATATGGATAATAACGGTATAATAGACCTTCTTGACGTCATGGCAATACTCCAAGCTTCTTCTTAAACCTTTTGGAGGT 1501
475 D M D N N G T T D L L D V M A T L Q A S S * TTTT 495

```

Figure III.1. Séquences nucléotidique et peptidique du gène *phoA* de *P. abyssi*. Les séquences flanquantes sont également représentées. Les signaux putatifs de transcription (A : boîte A ; B : boîte B ; TT : terminaison de transcription) sont surlignés en jaune. Le site de fixation des ribosomes (SD : motif de Shine-Dalgarno) est surligné en bleu. Les codons d'initiation et de fin de traduction sont signalés (**G**TG et TAA, respectivement). Les séquences nucléotidique et peptidique relatives au peptide signal putatif sont en caractères gras et délimitées par des flèches au dessus de la séquence nucléotidique. Les codons rares chez *E. coli*, relatifs à l'arginine (AGG et AGA) et à l'isoleucine (ATA) sont soulignés. Les sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués par une étoile sous la séquence peptidique.

I.4. USAGE DES CODONS

L'usage des codons du gène *phoA* a été analysé, en prévision de son expression chez *E. coli*. En effet, l'expression d'une protéine recombinante dont la séquence nucléotidique comporte un grand nombre de codons rares chez *E. coli* peut provoquer divers problèmes en raison du faible taux d'ARNt relatifs à ces codons. Les problèmes engendrés aboutissent la plupart du temps à un faible taux d'expression de la protéine recombinante [Kane, 1995]. Le tableau III.2 présente les codons les plus rares chez *E. coli* et permet de comparer leurs fréquences d'utilisation chez *E. coli* et dans le gène *phoA* de *P. abyssi*.

Tableau III.2. Codons utilisés chez *E. coli* à une fréquence inférieure à 1% et fréquence de leur utilisation dans le gène *phoA* de *P. abyssi*.

Codon	Acide aminé	Fréquence chez :		
		<i>E. coli</i> [Kane, 1995]	Gène <i>phoA</i> de <i>P. abyssi</i> gène total	gène sans peptide signal
AGG	Arg	0,14%	2,6%	2,8%
AGA	Arg	0,21%	1,4%	1,5%
CGA	Arg	3,1%	0,2%	0,0%
CTA	Leu	3,2%	3,0%	3,0%
ATA	Ile	4,1%	4,8%	4,9%
CCC	Pro	4,3%	0,2%	0,2%
CGG	Arg	4,6%	0,0%	0,0%
TGT	Cys	4,7%	0,0%	0,0%
TGC	Cys	6,1%	0,2%	0,2%
ACA	Thr	6,5%	1,4%	1,5%
CCT	Pro	6,6%	0,6%	0,6%
TCA	Ser	6,8%	0,8%	0,9%
GGA	Gly	7,0%	5,7%	6,0%
AGT	Ser	7,2%	1,2%	1,3%
TCG	Ser	8,0%	0,2%	0,2%
CCA	Pro	8,2%	1,2%	1,1%
TCC	Ser	9,4%	1,4%	1,3%
GGG	Gly	9,7%	2,0%	2,1%
CTC	Leu	9,9%	1,4%	1,5%

Il apparaît clairement dans la tableau III.2 que les codons les plus rares chez *E. coli*, AGG et AGA, sont fortement représentés dans le gène *phoA* : environ 20 et 7 fois plus, respectivement. Le codon de l'isoleucine ATA est également légèrement surreprésenté. La figure III.1 indique la répartition de ces trois codons dans la séquence du gène *phoA*. Cela permet de mettre en évidence le regroupement de certains de ces codons, formant notamment un triplet AGA-AGG-AGA, un doublet AGG-AGG, et un doublet AGA-AGG. Or, les problèmes causés par la présence de codons rares sont d'autant plus important que ces codons sont groupés [Kane, 1995]. Pour palier à ces problèmes, il est possible de co-exprimer les ARNt relatifs à ces codons et cela est particulièrement intéressant lorsqu'il s'agit d'exprimer des protéines d'Archaea [Kim *et al.*, 1998]. Il se peut ainsi que l'expression du gène *phoA* nécessite une telle co-expression.

II. ANALYSE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE

II.1. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES GENERALES

La séquence peptidique PhoA, déduite de la séquence du gène *phoA*, correspond à une protéine de 495 acides aminés. L'analyse de la partie N-terminale de cette séquence par comparaison avec des peptides signaux connus [Nielsen *et al.*, 1997] montre la présence d'un peptide signal de 25 acides aminés. A l'instar de nombreuses phosphatases alcalines, PhoA semble donc être codée sous forme d'un précurseur de 495 acides aminés qui, après clivage d'un peptide signal de 25 acides aminés, devient une protéine mature de 470 résidus aminés. La figure III.2 montre la séquence de la protéine PhoA, mettant en évidence ces 25 acides aminés présumés être un peptide signal. Le tableau III.3 indique la composition de PhoA, du peptide signal présumé ainsi que de la protéine mature par famille d'acides aminés. Il apparaît dans la composition du peptide signal que celui-ci a un caractère hydrophobe très marqué avec 80% de résidus apolaires. La figure III.2 met en évidence le détail de cette partie N-terminale : de nombreux résidus apolaires, quelques résidus chargés positivement, des petits résidus de part et d'autres du site putatif de clivage. Cette configuration est typique d'un peptide signal.

Tableau III.3. Composition par familles d'acides aminés du précurseur PhoA, du peptide signal putatif et de la forme clivée

Famille d'acides aminés	PhoA (495 aa)		Peptide signal présumé (25 aa)		Précurseur sans peptide signal (470 aa)	
	total	%	total	%	total	%
Petits résidus (CAGSTNDPV)	246	49,7%	7	28,0%	239	50,8%
Résidus aromatiques (FWYH)	46	9,3%	5	20,0%	41	8,7%
Résidus aliphatiques (VIL)	132	26,7%	6	24,0%	126	26,8%
Résidus apolaires (VILMFYWHKCAG)	306	61,8%	20	80,0%	273	58,1%
Résidus polaires (YWHKREDQCTSN)	237	47,9%	6	24,0%	231	49,1%
Résidus chargés (HKRDE)	138	27,9%	3	12,0%	135	28,7%
Résidus chargés positivement (HKR)	64	12,9%	3	12,0%	61	13,0%
Résidus chargés négativement (DE)	74	14,9%	0	0,0%	74	15,7%



Figure III.2. Séquence N-terminale de PhoA, résidus apolaires, polaires chargés, petits, * : site putatif de clivage.

En ce qui concerne la composition du peptide clivé de 470 acides aminés, le tableau III.3 ne permet pas de tirer de conclusion. Il faudrait pouvoir corrélérer ces données avec des éléments de structure secondaire. En revanche, la composition en acides aminés de la protéine mature (tableau III.4) ne compte qu'un seul résidu cystéine. La formation de ponts disulfures intrachaines est donc impossible, contrairement à ce que la littérature indique pour la phosphatase alcaline d'*E. coli* [Kim & Wyckoff, 1989] et les phosphatases alcalines des mammifères [Kozlenkov *et al.*, 2002]. Il est toutefois intéressant de noter que la faible teneur en cystéine semble être une tendance assez générale chez les protéines thermostables [Kumar & Nussinov, 2001].

Tableau III.4. Composition de PhoA en acides aminés.
Entre parenthèses sont indiquées les valeurs concernant la protéine mature.

Acide aminé	Nombre	%	Acide aminé	Nombre	%
A	35	7,1 (6,8)	L	51 (48)	10,3 (10,2)
R	21	3,5 (4,3)	K	29 (27)	5,8 (5,7)
N	18	3,6 (3,6)	M	17 (13)	3,4 (2,8)
D	36	7,3 (7,7)	F	18 (13)	3,6 (2,8)
C	1	0,2 (0,2)	P	10 (9)	2,0 (1,9)
Q	5	1,0 (1,1)	S	28 (26)	5,7 (5,5)
E	38	7,7 (8,1)	T	33	6,7 (7,0)
G	46	9,3 (9,8)	W	0	0,0 (0,0)
H	14	2,8 (3,0)	Y	14	2,8 (3,0)
I	42 (39)	8,5 (8,3)	V	39	7,9 (8,3)

II.2. IDENTIFICATION DES SITES INTERESSANTS

Des alignements entre la séquence PhoA et des séquences peptidiques de différentes phosphatases alcalines connues ont été réalisés. Cela a permis d'identifier des résidus aminés impliqués dans l'activité enzymatique et la structure de la protéine. La figure III.3 montre l'alignement de 16 séquences de phosphatases alcalines avec la séquence PhoA.

<i>Eco</i>	63	AKNIILLIGDGMGDSSEITAAR	121	VTDSAASATFWSTGVK	158	AKAAGLATENVSFAELQDAPPAALVAHVTSR
<i>Pab</i>	30	VRNVIILIGDGMGFSQLQLTK	76	VTDSAAAGTEIATGVK	116	AQMLGKATCLVTTTRITHTATPAVFAHVDPDR
<i>Pfu</i>	30	IKNIIILIGDGMGMSHVQLTK	76	VTDSAAAGTEIATGVK	116	AQVLGKSTCLVTTTRITHTATPAVFAHVDPDR
<i>Tma</i>	21	VKNVIYLIGDGMGLSQVYLTS	68	VTDSAAAGTELASGFK	105	AKTYGVRTTEIVVTCRVTHATPAAFYAHVKSRR
<i>Sgr</i>	41	ARSVILLIGDGMGDAEITAAR	96	VTDSAAAGATFWATGRR	134	ARDRGYATCSVTFA SVADATPAALTAHVTDNR
<i>Bsu</i>	49	IRNVIVMIGDGMGTPYIRAYR	105	ITDSAAAGTELATGVK	142	AKQGGKSTCLVATSEINHATPAAYGAHNESRR
<i>Bli</i>	39	VKNVIMVMGDTSSSATTLAR	86	ITDSAPAATFWATGRK	138	AKQKGKATCIATSEIQHATPAGYSGHHKDR
<i>Sce</i>	65	KKNVIFPVTDGMGPASLSMAR	120	VTDSAAAGATFACALK	157	AKLAGYLTCLVVTTRITDAPASFSSHVDYR
<i>Ant</i>	33	PKNVILLISDAGLSQISSTF	81	VTDSASGATFSCGFK	118	AALNNIKTEVVATSSITHTATPA SFYAHALNR
<i>Hb</i>	47	AANAIAIVDGMGQTQISAAR	112	ITDSAAAATFASGVK	153	ASAQGYATCLITTTTEATHATPAAFAAHVEDR
<i>Tca</i>	38	YRNLI VFVYDGF SWEDYAI AQ	92	VTPSSAAGNFSCGVK	129	AKEAGKAVCLVTTT TVTHATPA SFVINSNPDNR
<i>Rno</i>	50	AKNIIMFLGDGMGVSTVTAAR	107	VPSAGTATAYLCGVK	154	AKDAGKSVGI VTTTRVNHATPSAAYAHSAADR
<i>Mmu</i>	50	AKNVIMFLGDGMGVSTVTAAR	107	VPSAGTATAYLCGVK	154	AKDAGKSVGI VTTTRVNHATPSAAYAHSAADR
<i>Bta</i>	50	AKNVIMFLGDGMGVSTVTAAR	107	VPSAGTATAYLCGVK	154	AKDAGKSVGI VTTTRVNHATPSAAYAHSAADR
<i>Fca</i>	50	VKNVIMFLGDGMGVSTVTAAR	107	VPSAGTATAYLCGVK	154	AKDSGKSVGI VTTTRVNHATPSAAYAHSAADR
<i>Hsa</i>	54	AKNLIIFLGDGMGVSTVTAAR	111	VPSGATATAYLCGVK	158	AKKAGKSVGVTTTRVQHASPAGTYAHTVNR
<i>Bmo</i>	70	AKNVVMFLGDGMVPTLAAAR	127	VPSSTATAYLCGVK	176	ALADGRDVEIVTTTRITHTASPAGTFKAVNR
<i>Eco</i>	336	EKGFFLQVEGASTDKQDF	384	TLVIVTADHHAHASQIVA	433	ETTGSQRLRI AAYGPH
<i>Pab</i>	239	PNGFFLMIEGGRI DHACH	287	TLVIVLADHETGGLGIG	387	KETGEPVPLLAYGPG
<i>Pfu</i>	239	PNGFFLMIEGGRI DHAAH	287	TLVIVLADHETGGLGLG	387	KETGAPVSLLAYGPG
<i>Tma</i>	241	DEPFLLMVEGSQIDWEAH	289	TLVIVTADHETGGLGLS	384	THSGTPVPIFAFGPG
<i>Sgr</i>	313	GRGFFLQVEGASTDDRAH	361	TLVIVTADHGHATQILP	411	ETTGVVPVVAARGPL
<i>Bsu</i>	274	KKGFFLMVEGSQIDWAAH	322	TLVIVTADHETGGLGIG	422	DETGEVVPVYAYGPG
<i>Bli</i>	275	KDGFLLFVEGSKPDWAAH	323	TMVIVSDHGNISIG	429	GETGEDVFLYSYGE
<i>Sce</i>	317	SNGFFLMVEGSRI DHAGH	366	TVLVSTSDHETGGLVTS	483	GHSADVNIYAYANK
<i>Ant</i>	246	NSAFFIMSEGSQIDWGGH	297	TLVIVTSDHETGGFTLA	336	GHSATLIPVFAYGPG
<i>Hb</i>	291	DKGFFLLVSEGRVDHAGH	339	TFLVSTGDHECGGLTLG	434	GHTGTDPVVFAGHPN
<i>Tca</i>	262	RGGFFLQVEAGRIDHANH	310	TLVIVVSDHATGVGGLY	432	QHTASPVMLLLYGQG
<i>Rno</i>	324	PKGFFLLVEGGRI DHGHE	372	TLTVVTADHSHVFTFGG	453	THGGEDVAVFAGKGM
<i>Mmu</i>	324	LKGFFLLVEGGRI DHGHE	372	TLTVVTADHSHVFTFGG	453	THGGEDVAVFAGKGM
<i>Bta</i>	324	PKGFFLLVEGGRI DHGHE	372	TLTVVTADHSHVFTFGG	453	THGGEDVAVFAGKGM
<i>Fca</i>	324	PKGFFLLVEGGRI DHGHE	372	TLTVVTADHSHVFTFGG	453	THGGEDVAVFAGKGM
<i>Hsa</i>	325	PRGFFLLFVEGGRI DHGHE	373	TLVIVTADHSHVFTFGG	453	THAGEDVAVFARGPQ
<i>Bmo</i>	345	ERGFFLLFVEGGRI DHAAH	393	SLVVVTADHTHVMSFNG	475	THGGDDVTVFAGVGH

Figure III.3. Conservation du site actif : alignement de PhoA avec d'autres membres de la famille des phosphatases alcalines. Les séquences ont été obtenues à partir des numéros d'accèsion suivant : *Eco*, *Escherichia coli* (pir|PAECA) ; *Pab*, *Pyrococcus abyssi* (pir|E75081) ; *Pfu*, *Pyrococcus furiosus* (Pf_962748) ; *Tma*, *Thermotoga maritima* (pir|72410) ; *Sgr*, *Streptococcus griseus* (pir|S17780) ; *Bsu*, *Bacillus subtilis* AP IV (pir|B69676) ; *Bli*, *Bacillus licheniformis* (genpept|AAG10093) ; *Sce*, *Saccharomyces cerevisiae* (pir|S69648) ; *Ant*, *Antartic bacterium* (emb|CAB82508.1) ; *Hb*, *Halobacterium* sp. (genpept|AAG20936) ; *Tca*, *Thermus caldophilus* (genpept|AAF13361) ; *Rno*, *Rattus norvegicus* (pir|A28114) ; *Mmu*, *Mus musculus* (pir|A40172) ; *Bta*, *Bos taurus* (pir|A29600) ; *Fca*, *Felis catus* (pir|S66467) ; *Hsa*, *Homo sapiens* placentaire (pir|PAHUA) ; *Bmo*, *Bombyx mori* (pir|S19607). Les résidus strictement conservés ou conservés à plus de 60% sont surlignés respectivement en noir et gris. Les symboles au dessus des séquences indiquent les résidus conservés impliqués dans le site actif. La légende est la suivante : ↓ coordination des métaux (Zn1, Zn2 et ligands primaires de Mg), ⇓ coordination des métaux (ligands secondaires de Mg), ● formation de l'intermédiaire de réaction phosphoséryl, ○ coordination du phosphate. La numérotation des résidus est donnée pour les précurseurs protéiques. Les alignements ont été réalisés à l'aide du programme de comparaison multiple PILEUP (GCG Wisconsin Package).

II.2.1. Le site actif

Le modèle du site actif des phosphatases alcalines est celui de l'enzyme d'*E. coli*. Il est composé d'un motif D101-S102-N103, comprenant la sérine nucléophile, de deux ions Zn^{2+} (Zn1 et Zn2), d'un ion de Mg^{2+} et d'un site de fixation du phosphate du substrat. Il semble que ces caractéristiques soient conservées dans de nombreuses phosphatases alcalines [Kim & Wyckoff, 1989].

La séquence [IV]-x-D-S-[GAS]-[GASC]-[GAST]-[GA]-T est donnée comme motif consensus (motif Prosite : PS00123) des phosphatases alcalines, où la sérine est le site actif. Ce motif est présent dans PhoA, où le résidu S76 est la sérine nucléophile. De plus, il est intéressant d'observer les résidus impliqués dans la fixation des métaux. Dans la phosphatase alcaline d'*E. coli*, Zn1 est pentacoordonné par les éléments His353, His434, Asp349 (impliqué dans deux liaisons) et le phosphate. Zn2 est tetracoordonné par les éléments His392, Asp73, Asp391 et le phosphate. La coordination de Mg est réalisée par Asp73, Glu344, Thr177 et trois molécules d'eau, et indirectement par Asp175 et Lys350. Le tableau III.5 donne les correspondances entre les résidus de la phosphatase d'*E. coli* impliqués dans la fixation des métaux et les résidus de PhoA. Il apparaît que les résidus impliqués dans la fixation des ions métalliques de la phosphatase alcaline d'*E. coli* sont conservés dans la séquence PhoA de *P. abyssi*. Les seuls résidus non-conservés sont Asp175 et Lys350, les ligands secondaires de Mg étant remplacés chez *P. abyssi* par His133 et His253. Cette double substitution des ligands secondaires de Mg en histidine rappelle le site actif caractéristique des phosphatases alcalines mammifères [Kim & Wyckoff, 1989]. Il est intéressant de noter que les trois séquences d'Archaea présentes dans l'alignement partagent cette caractéristique. En ce qui concerne la fixation du phosphate du substrat lors de la catalyse enzymatique, dans l'enzyme d'*E. coli*, le phosphate est coordonné par Zn1, Zn2 et le résidu R188. Ce dernier est conservé dans la protéine de *P. abyssi* et correspond à R146.

Le tableau III.5 résume les résidus aminés de PhoA hypothétiquement impliqués dans la formation du site actif, identifiés par comparaison de séquences de phosphatases alcalines.

Tableau III.5. Résidus^a impliqués dans la fixation des métaux dans la phosphatase d'*E. coli* et correspondance dans la séquence PhoA de *P. abyssi*.

Métal décrit pour la phosphatase d' <i>E. coli</i>	Résidus aminés	
	Impliqués dans la Phosphatase d' <i>E. coli</i>	Correspondant dans la séquence PhoA
Zn1	His353	His255
	His434	His388
	Asp349	Asp251
Zn2	His392	His295
	Asp73	Asp39
	Asp391	Asp294
Mg	Asp73	Asp39
	Glu344	Glu246
	Thr177	Thr135
	Ligand secondaire :	
	Asp175	His133
	Lys350	His252

^a : les résidus sont numérotés selon les séquences des précurseurs.

II.2.2. Sites putatifs de N-glycosylation

La recherche du motif consensus de site putatif de N-glycosylation (N-x-T/S) sur la séquence peptidique PhoA a permis de mettre en évidence cinq sites de ce type : N24 (sur le peptide signal présumé), N101, N108, N160 et N360. Ces sites sont signalés sur la séquence peptidique de PhoA (figure III.1). Il est intéressant de connaître les sites potentiels de N-glycosylation pour deux raisons : d'une part, il a été mis en évidence que certaines protéines d'Archaea sont glycosylées selon un processus similaire à la N-glycosylation chez les Levures [Goldman *et al.*, 1990 ; Burda & Aebi, 1999] ; d'autre part, cela peut apporter des informations dans l'optique d'exprimer PhoA par un système eucaryote.

II.2.3. Site putatif de fixation du Ca²⁺

Une séquence consensus de type Ef-hand a été identifiée du côté C-terminal de la séquence PhoA. Cette séquence est la suivante : H₂N-D475-M476-D477-N478-N479-G480-I481-I482-D483-L484-L485-D486-V487-COOH. Il est intéressant de noter que l'alignement de la séquence de l'enzyme de *P. abyssi* avec 16 autres séquences connues de phosphatases

alcalines a permis de montrer que seule la protéine de *P. abyssi* comporte une telle séquence. Par ailleurs, Ca^{2+} a été à plusieurs reprises trouvé chez des protéines thermostables, ayant un rôle thermostabilisateur [Vieille & Zeikus, 2001].

II.3. IDENTITES RELATIVES

Le tableau III.6 présente les identités relatives, en pourcentage, entre différentes phosphatases alcalines référencées dans les bases de données de séquences à l'aide du programme de comparaison GAP (GCG Wisconsin Package). PhoA partage la plus forte identité, 79%, avec la séquence de *P. furiosus*, ce qui n'est pas surprenant compte-tenu de la proximité phylogénétique des deux espèces. Ensuite, une forte identité, 47%, est observée entre PhoA et la séquence de *Thermotoga maritima*, bactérie thermophile. Une identité de 42% avec la séquence de la phosphatase alcaline IV de *Bacillus subtilis* est également à noter. Enfin, il apparaît que, d'une manière générale, PhoA couvre entre 30% et 40% d'identité avec les autres espèces procaryotes et une espèce eucaryote inférieure (*Saccharomyces cerevisiae*), tandis que 28% à 30% d'identité est obtenue avec les autres espèces eucaryotes. Il est intéressant de noter que, en dehors du domaine des Archaea, PhoA montre la plus forte similarité avec la séquence d'une phosphatase alcaline issue d'une bactérie thermophile, en l'occurrence *T. maritima*.

Tableau III.6. Identités relatives entre les séquences peptidiques de phosphatases alcalines référencées dans les bases de données de séquences (les séquences utilisées pour réaliser ce tableau sont celles cités dans l'alignement figure III.3).

		Archaea			Bacteria							Eucarya						
		<i>Pab</i>	<i>Pfu</i>	<i>Hb</i>	<i>Tma</i>	<i>Tca</i>	<i>Bsu</i>	<i>Bli</i>	<i>Eco</i>	<i>Sgr</i>	<i>Ant</i>	<i>Sce</i>	<i>Bmo</i>	<i>Rno</i>	<i>Mmu</i>	<i>Bta</i>	<i>Fca</i>	<i>Hsa</i>
Archaea	<i>Pab</i>	1,00	0,79	0,36	0,47	0,34	0,42	0,36	0,32	0,33	0,38	0,38	0,28	0,30	0,29	0,29	0,29	0,28
	<i>Pfu</i>		1,00	0,34	0,49	0,34	0,43	0,36	0,31	0,34	0,37	0,38	0,30	0,29	0,28	0,29	0,29	0,29
	<i>Hb</i>			1,00	0,38	0,28	0,37	0,31	0,33	0,33	0,33	0,33	0,28	0,26	0,26	0,27	0,27	0,25
Bacteria	<i>Tma</i>				1,00	0,36	0,42	0,40	0,32	0,32	0,43	0,38	0,32	0,32	0,32	0,33	0,33	0,32
	<i>Tca</i>					1,00	0,33	0,30	0,30	0,30	0,32	0,28	0,27	0,26	0,26	0,25	0,25	0,28
	<i>Bsu</i>						1,00	0,41	0,34	0,33	0,39	0,37	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,28
	<i>Bli</i>							1,00	0,31	0,31	0,37	0,33	0,28	0,26	0,26	0,25	0,26	0,27
	<i>Eco</i>								1,00	0,53	0,37	0,29	0,32	0,31	0,31	0,31	0,30	0,34
	<i>Sgr</i>									1,00	0,30	0,31	0,29	0,30	0,30	0,30	0,29	0,34
	<i>Ant</i>										1,00	0,37	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
Eukarya	<i>Sce</i>											1,00	0,24	0,26	0,26	0,26	0,26	0,24
	<i>Bmo</i>												1,00	0,50	0,49	0,49	0,49	0,47
	<i>Rno</i>													1,00	0,98	0,93	0,94	0,61
	<i>Mmu</i>														1,00	0,92	0,94	0,61
	<i>Bta</i>															1,00	0,95	0,61
	<i>Fca</i>																1,00	0,62
	<i>Hsa</i>																	

II.4. ELEMENTS DE STRUCTURES SECONDAIRES

La figure III.4 montre l'alignement des séquences de la phosphatase alcaline d'*E. coli* et de PhoA de *P. abyssi*. Les éléments de structures secondaires étant connus pour la séquence d'*E. coli*, cela a permis de déterminer si ces structures secondaires sont conservées dans PhoA.

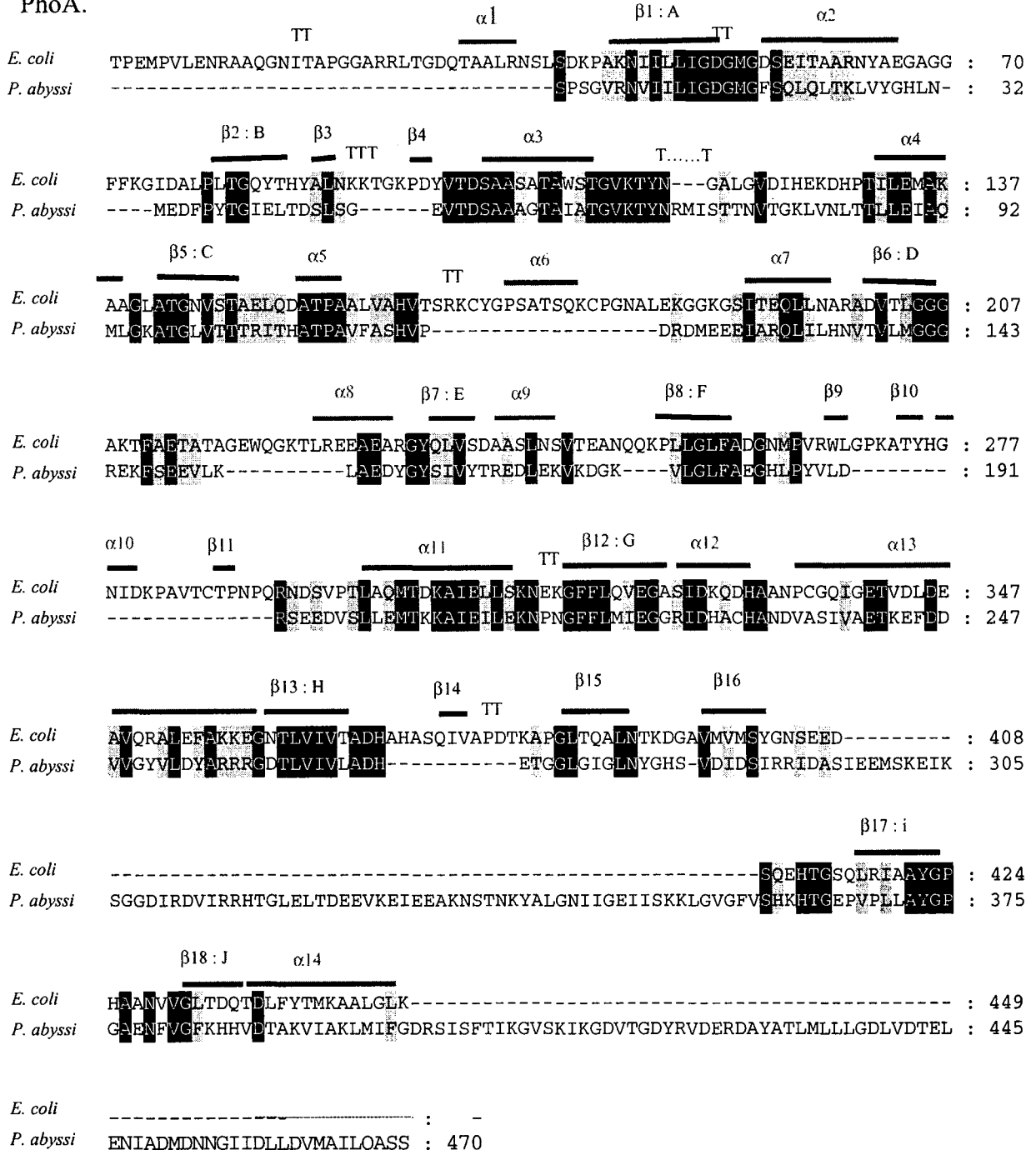


Figure III.4. Alignement des séquences peptidiques de la phosphatase alcaline d'*E. coli* et de la protéine PhoA de *P. abyssi*. Les séquences des formes matures ont été utilisées. Les structures secondaires connues chez *E. coli* sont indiquées au dessus de l'alignement. Les résidus surlignés en noir sont identiques tandis que ceux surlignés en gris sont similaires. α : hélice α ; β : brin β ; T : tour.

Une caractéristique structurale importante de la phosphatase alcaline d'*E. coli* est son feuillet β central à 10 brins. Ces 10 brins (notés de A à J) composent un feuillet organisé selon une topologie précise :

J B i H A G C D F E

Où les brins A et G forment le cœur du feuillet, bien enfoui dans la protéine, alors que, J et E sont ses extrémités, apparaissant en surface de la molécule. Ces brins sont parallèles à l'exception du brin i qui est antiparallèle [Kim & Wyckoff, 1989]. L'alignement des séquences des phosphatases alcalines d'*E. coli* et de *P. abyssi* a permis de déterminer le taux de conservation de ces structures, présenté dans la figure III.5.

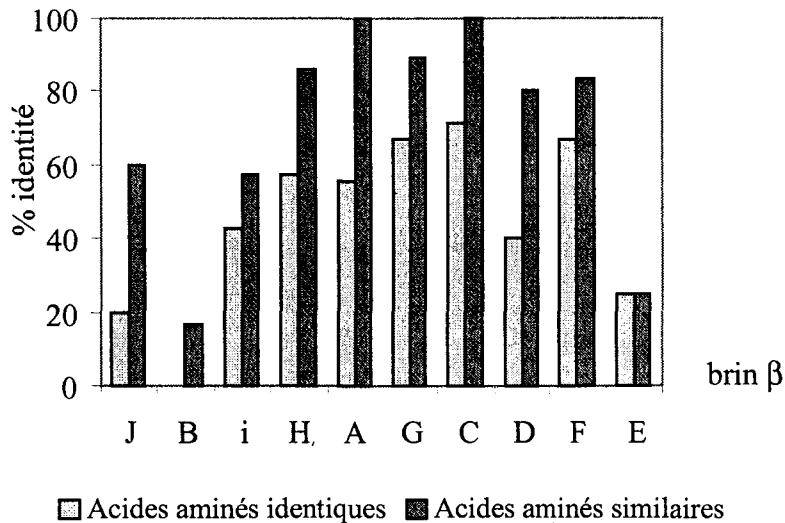


Figure III.5. Pourcentage d'identité, en acides aminés identiques et similaires, entre les brins β du feuillet central de la phosphatase alcaline d' *E. coli* et les motifs correspondant sur la séquence de PhoA de *P. abyssi*. En abscisse, les brins β sont agencés selon la topologie du feuillet β observé chez la protéine d'*E. coli*.

Il ressort de cette comparaison entre les deux séquences que, à l'exception du brin B, les brins formant le feuillet β central semblent bien conservés (figure III.4). Il est donc probable que ce dernier soit conservé chez *P. abyssi* et qu'il montre une structure tertiaire comparable à celle décrite chez *E. coli*. Par ailleurs, ce feuillet β central a été mis en évidence dans d'autres phosphatases alcalines : *B. subtilis* [Hulett *et al.*, 1991], humaine placentaire [Le Du *et al.*, 2001] et crevette arctique [de Backer *et al.*, 2001]. En outre, il est intéressant de noter que le taux de conservation du feuillet apparaît plus important en ce qui concerne les brins centraux que pour les brins périphériques. Ainsi, les brins H, A, G et C, composant le cœur du feuillet et donc de la molécule sont particulièrement bien

conservés, tandis que les brins J, B, i et E, plus exposés en surface de la protéine le sont moins (figure III.5).

Outre le feuillet β central, il faut signaler la zone D123 à G134, comprenant le site actif. Ce brin à structure hélicoïdale dans la phosphatase alcaline d'*E. coli*, est strictement conservé à 66,7% dans la portion D75 à G86 de la séquence PhoA de *P. abyssi*. Cette structure est intéressante dans la mesure où, étant « enfouie » entre le feuillet β central et le reste de la protéine, sous forme d'hélices et de boucles, elle permet l'ancrage et le positionnement du site actif.

CONCLUSION

Ce travail d'analyse bio-informatique des séquences nucléotidique et peptidique a permis d'obtenir un certain nombre d'informations. Parmi ces dernières, il apparaît principalement que la séquence de la protéine codée par le gène *phoA* présente de fortes similitudes avec les phosphatases alcalines décrites dans la littérature. Il en ressort ainsi que la partie N-terminale de PhoA correspond vraisemblablement à un peptide signal, à l'instar des phosphatases alcalines d'*E. coli* et de leurs homologues humaines. De plus, le site actif semble conservé (résidus impliqués dans la fixation d'ions métalliques, sérine nucléophile) et montre une similarité avec celui des phosphatases alcalines issues d'organismes eucaryotes (résidus ligands secondaires de l'ion Mg^{2+}). Enfin, de nombreux éléments de structures secondaires sont conservés, notamment le feuillet β central, laissant supposer que la structure tertiaire de PhoA comporte les caractéristiques générales de phosphatases alcalines dont la structure est connue.

Cependant, ces résultats sont à confirmer expérimentalement. Cette analyse du gène représente donc une première approche, permettant non seulement de définir certaines stratégies à adopter lors des étapes expérimentales (par exemple : l'expression de la protéine avec ou sans peptide signal, l'usage des codons, etc...), mais aussi lors de l'interprétation des résultats expérimentaux (par exemple : la dépendance vis-à-vis d'effecteurs métalliques, etc...).

PARTIE IV

CARACTERISATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE *PYROCOCCUS ABYSSI*

Zappa, S., Rolland, J.-L., Flament, D., Gueguen, Y., Boudrant, J. & Dietrich, J. (2001) Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Phosphatase from the Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4504-11.

SOMMAIRE DE LA PARTIE IV

Avant-propos.....83

ARTICLE : "Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Phosphatase from the Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*".....84

ABSTRACT.....84

INTRODUCTION.....85

MATERIAL AND METHODS.....86

 Organisms and growth conditions.....86

 Cloning of the alkaline phosphatase gene.....86

 Expression and purification of the recombinant AP.....87

 Alkaline phosphatase assay and protein determination.....88

 Quaternary structure analysis.....88

 Temperature and pH optima, thermal stability, kinetic parameters.....88

 Cation and inhibitor effect studies.....89

 DNA dephosphorylation procedure.....89

RESULTS.....90

P. abyssi alkaline phosphatase gene presents classical and unique features.....90

 Expression and purification of *P. abyssi* AP.....92

P. abyssi AP exists in mono- and homodimeric forms.....92

P. abyssi AP presents high pH and temperature activation and high thermostability.....93

P. abyssi AP is strongly dependent on divalent cations.....94

P. abyssi AP catalytic properties: effect of substrate concentration and inhibitors.....95

P. abyssi recombinant AP is effective for DNA dephosphorylation.....96

DISCUSSION.....98

ACKNOWLEDGMENTS.....101

CONCLUSION.....102

AVANT-PROPOS

Les données bibliographiques concernant les phosphatases alcalines montrent que des représentants de cette famille ont été identifiés dans un grand nombre de phyla. Pour cette raison, les phosphatases alcalines sont dites ubiquitaires. Cependant, au début de ces travaux, aucune de ces enzymes n'avait été isolée d'un Archaea hyperthermophile (cf. partie I). Dans le cadre de la valorisation de *Pyrococcus abyssi*, Euryarchaeote hyperthermophile, une analyse de son génome a permis de localiser un cadre ouvert de lecture, *phoA*, codant hypothétiquement pour une phosphatase alcaline (cf. partie III).

La première partie expérimentale de ce travail de thèse a donc consisté à confirmer que le produit du gène *phoA* est effectivement une phosphatase alcaline. Pour cela, la stratégie suivante fut choisie : (i) cloner le gène *phoA*, amputé de la séquence codant pour le peptide signal hypothétique, (ii) exprimer la protéine recombinante, (iii) purifier et (iv) caractériser cette dernière.

Le choix de cloner *phoA* sans la séquence codant pour le peptide signal hypothétique a été fait en tenant compte des travaux préliminaires d'Elisabeth Antoine (L.B.M.H., Ifremer), qui avait montré qu'en exprimant la forme complète de PhoA (avec ses 25 premiers résidus N-terminaux) dans le système *E. coli*, celle-ci était insoluble. En comparant ce résultat avec l'analyse bio-informatique de la séquence de PhoA, il avait été conclu que la partie N-terminale de la protéine correspond effectivement à un peptide signal dont le site de clivage n'est pas reconnu par la signal peptidase d'*E. coli*.

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Biotechnologies des Micro-organismes Hydrothermaux (L.B.M.H., Ifremer, Brest), sous la direction de Jacques Dietrich. Ils ont donné lieu à une publication [Zappa *et al.*, 2001], qui constitue l'essentiel de cette partie IV.

Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Phosphatase from the Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*

Sébastien ZAPPA¹, Jean-Luc ROLLAND², Didier FLAMENT², Yannick GUEGUEN², Joseph BOUDRANT^{1*} and Jacques DIETRICH²

¹ Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

² Laboratoire de Biotechnologie des Micro-organismes Hydrothermaux, IFREMER, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France

* Corresponding author

ABSTRACT

This paper reports the first isolation and characterization of an alkaline phosphatase (AP) from a hyperthermophilic archaeon. An AP gene from *Pyrococcus abyssi*, an euryarchaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent, was cloned and the enzyme expressed in *Escherichia coli*. Analysis of the sequence showed conservation of the active site and structural elements of the *E. coli* AP. The recombinant AP was purified and characterized. Monomeric and homodimeric active forms were detected, with a monomer molecular mass of 54 kDa. Apparent optimum pH and temperature were estimated at 11.0 and 70°C, respectively. Thus far, *P. abyssi* AP has been demonstrated to be the most thermostable AP, with half-lives at 100°C and 105°C of 18h and 5h, respectively. Enzyme activity was found to be dependent on divalent cations : metal ion chelators inhibited activity, whereas the addition of exogenous Mg(II), Zn(II) and Co(II) increased activity. The enzyme was inhibited by inorganic phosphate, but not by molybdate and vanadate. Strong inhibitory effects were observed in the presence of thiol-reducing agents, although cysteine residues of the *P. abyssi* AP were not found to be incorporated within intra- or inter-chain disulfide bonds. In addition, *P. abyssi* AP was demonstrated to dephosphorylate linear DNA fragments with dephosphorylation efficiencies of 93.8% and 84.1% with regard to cohesive and blunt ends, respectively.

INTRODUCTION

Alkaline phosphatases (APs) (orthophosphate monoester phosphohydrolases [alkaline optimum] EC 3.1.3.1.) are classically described as homodimeric non-specific metalloenzymes which catalyze phosphomonoesterase reactions [Trowsdale *et al.*, 1990]. Given that they are widely found in nature, from bacteria to mammals, this indicates that APs are included in fundamental biochemical processes [Posen, 1967]. Despite the fact that their physiological function is not clear, their induced production under inorganic phosphate starvation in many species (especially prokaryotic organisms) indicates that they play a vital role in the phosphate metabolism. In mammals, they are linked with transport mechanisms [McComb *et al.*, 1979]. Many APs have been characterized since the 1960's. The *E. coli* AP has been widely studied in terms of biosynthesis [Derman & Beckwith, 1991; Karamyshev *et al.*, 1998], structure and catalytic properties [Coleman, 1992]. Numerous mammalian AP cDNA have been cloned and the corresponding enzymes characterized [Berger *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1986; Weissig *et al.*, 1993]. Alignments of the deduced protein sequences have shown a strong conservation of the catalytic site, which involves a serine residue and three metal ions per monomer, two Zn(II) and one Mg(II) [Kim & Wyckoff, 1989]. However, mammalian APs differ from their *E. coli* counterpart in terms of Mg(II) secondary ligand [Murphy *et al.*, 1995], membrane-anchoring [Trowsdale *et al.*, 1990], glycosylation [Kim & Wyckoff, 1989], etc... APs represent a large research field as they are good models to study metal ion dependent catalysis and are used in several application fields (molecular biology [Ausubel *et al.*, 1998] and immunodetection [Suzuki *et al.*, 1999]).

Although Archaea have been studied for a few decades, relatively few archaeal APs have been described. All of them are from halophilic species. APs have been isolated and characterized from three species of the genus *Halobacterium* [Bonet *et al.*, 1994; Fitt & Baddoo, 1979; Fitt & Peterkin, 1976]. In 1990, Goldman *et al.* described an AP from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. So far, no APs from hyperthermophilic archaeons have been isolated and characterized. As studying thermostable enzymes appears interesting for the understanding of life at high temperature, as well as for industrial processes, new APs exhibiting this property have been investigated. The following thermostable APs from thermophilic bacteria have been described : *Thermotoga neapolitana* [Dong & Zeikus, 1997], *Thermus caldophilus* [Park *et al.*, 1999], *Thermus thermophilus* [Pantazaki *et al.*, 1998] and *Bacillus stearothermophilus* [Mori *et al.*, 1999].

Pyrococcus abyssi is a heterotrophic hyperthermophilic euryarchaeon isolated from a deep sea hydrothermal vent with an optimal growth temperature of 100°C [Erauso *et al.*, 1993]. As its complete genome sequence is known and is publicly available (<http://www.genoscope.fr>), AP patterns were identified and allowed to isolate an archaeal AP gene. In this report, we describe the first characterization of a thermostable AP isolated from a hyperthermophilic archaeon.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and growth conditions- *Pyrococcus abyssi* (strain Orsay) was used in this study [Erauso *et al.*, 1993]. The strain was grown in 2216S medium [Belkin & Jannasch, 1995] at 95°C. *E. coli* HMS174 (DE3) harboring pLysS, purchased from Novagen, was used as the host strain for the recombinant plasmid of pARHS [de Moerlooze *et al.*, 1992] and *E. coli* DH5 α for the pBSK vector in dephosphorylation studies. *E. coli* strains were grown in 2 \times YT medium (Bactopectone 16 g.L⁻¹, Yeast Extract 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹) on a rotary shaker at 37°C for various times. Ampicillin was added to 2 \times YT to give a final concentration of 100 μ g.mL⁻¹. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to give a final concentration of 0.5 mM to induce gene expression [Ausubel *et al.*, 1998].

Cloning of the alkaline phosphatase gene- Based on *P. abyssi* genome sequence (<http://www.genoscope.fr/Pab/>, accession number 2366), the *phoAP.abyssi* gene was amplified by polymerase chain reaction on a DNA Thermal Cycler (Stratagene). Genomic DNA extraction was performed on a *P. abyssi* culture as previously described [Ausubel *et al.*, 1998] and the DNA used as a template. The two primers, including *Nde*I and *Bam*HI restriction sites (in bold), were as follows: AP1 (5'-GTTTCCATTTGCT**CATATGTCTCCAAGCGG**-3', sense) and AP2 (5'-CTCACCTCAAGGAT**CCTTAAGAAGAAGC**-3', antisense). By introducing a start codon at the beginning of the putative mature protein gene, AP1 was designed so that the putative signal peptide sequence of the *P. abyssi* alkaline phosphatase would not be amplified. AP2 was targeted to the stop codon of the *phoAP.abyssi* gene, introducing the *Bam*HI restriction site next to the TAA codon. In addition to the template, the 50 μ L reaction mixture contained 100 pmol of each primer, 10 nmol of an equimolar dNTPs

mix (Eurogentec S.A.), *Taq* DNA polymerase buffer containing 5 mM MgCl₂ (Qbiogene), and 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Qbiogene). The mixture was subjected to 8 cycles of amplification (30 s at 94°C, 30 s at 45°C and 1 min 30 s at 72°C). A PCR product with the expected size was digested with *Nde*I and *Bam*HI and cloned in a pARHS vector, producing the recombinant plasmid pPabAP, and transformed into *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS using standard procedures [Ausubel *et al.*, 1998]. Using this strategy, the putative mature enzyme was produced in the cytoplasm of *E. coli*.

Expression and purification of the recombinant AP- An overnight culture of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pPabAP, was diluted in a 1:20 (vol:vol) ratio and grown until the OD₆₀₀ reached 0.8 (Milton Roy Spectronic 401, from Bioblock Scientific). The culture was induced by the addition of IPTG, to give a concentration of 0.5 mM, and incubated for an additional period of 4 h. Cells were harvested by centrifugation, washed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 50 mM NaCl, and then resuspended in 50mM sodium citrate buffer (pH 5.5). After sonication (Vibracell sonifier, 375 W, 40% amplitude), cell debris was removed by centrifugation (10,000 × g for 10 min). The resulting supernatant was heated for 20 min at 80°C and precipitated proteins removed by another centrifugation as described above. As *E. coli* HMS174 (DE3) is not a *phoA*_{*E.coli*} deletion strain, controls were used to evaluate the extent of *E. coli* AP contamination. The supernatant was subsequently dialyzed against sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and loaded on an anion exchange column (ResourceQ, Pharmacia) equilibrated with the same buffer. Bound proteins were eluted by a linear gradient of NaCl (0 to 1 M in sodium phosphate buffer pH 7.5). Active fractions were eluted with 250 mM NaCl. The latter were pooled, loaded on a second anion exchange column (MonoQ, Pharmacia) and eluted by a linear gradient of NaCl (0 to 0.4 M in sodium phosphate buffer pH 7.5). All chromatographic steps were performed at 4°C.

Protein samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the method of Laemmli [Laemmli, 1970]. Proteins samples for SDS-PAGE were prepared by heating them for 10 min at 100°C in a 1:5 ratio volume of sample buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 2% SDS (wt:vol), 14.4 mM 2-mercaptoethanol (MCE), 25% glycerol (vol:vol) and 1% bromophenol blue (wt:vol)). Proteins were observed by staining them with Coomassie brilliant blue. Molecular mass standard was obtained from Pharmacia.

Alkaline phosphatase assay and protein determination- The standard assay for alkaline phosphatase activity was carried out at 70°C, for 2.5 min, using 2.5 mM *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP, Sigma Chemical Co.) as substrate in NaOH-Glycine 50 mM pH 10.0 buffer, containing 0.5 mM CoCl₂, except otherwise indicated. The release of *p*-nitrophenol in the reaction mixture (1 mL) was continuously measured spectrophotometrically at 410 nm using a Uvikon XL spectrophotometer (from BIO-TEK Instruments), over the linear period. Enzyme and substrate blanks were also included. 1 U enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of *p*-nitrophenol from *p*NPP in one minute. Protein concentration was determined by the method of Bradford, using BSA as standard [Bradford, 1976]. For routine enzymatic characterization assays, 252 ng of purified AP was added to the 1 mL reaction mixture. Each value is the mean of at least three assays.

Quaternary structure analysis- Native gel electrophoresis was performed using 4-12% gradient polyacrylamide minigels (Biorad). Samples were added in 4:5 ratio (vol:vol) to native electrophoresis buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 25% glycerol and 1% bromophenol blue). Zymograms were performed by incubation of minigels in NaOH-Glycine 50 mM pH 10.0 buffer, containing 0.5 mM CoCl₂ and 2.5 mM 4-methylumbellyferylphosphate (MUFP, Sigma Chemical Co.) as substrate, for 20 min at 70°C. Active bands were observed under ultraviolet light and proteins visualized after staining them with Coomassie brilliant blue. Molecular mass standard was obtained from Pharmacia.

Temperature and pH optima, thermal stability, kinetic parameters- The apparent optimum temperature was determined by running the standard assay at temperatures ranging from 20°C to 90°C in 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) buffer 0.2 M pH 11.0. The apparent optimum pH of the enzyme was determined by running the standard assay, using Tris-HCl buffer (0.2 M) and CAPS buffer (0.2 M) for the pH range 6.5-10.5 and 9.0-12.5, respectively. Thermostability was determined using a diluted enzyme (0.63 mg.mL⁻¹ purified enzyme was diluted 1:10 (vol:vol) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0) and incubated at 90°C, 100°C, 105°C and 115°C. Samples were taken at time intervals and the residual activity determined by the standard assay. pH was adjusted at room temperature for all the buffers used. Michaelis-Hill constants were determined from data obtained by determining the initial rate of *p*NPP hydrolysis under the assay conditions described above with 1 mM CoCl₂, using a range from 0.1 to 10 mM of substrate.

Cation and inhibitor effect studies- The effect of monovalent and divalent cations were examined for their influence on enzyme activity. Increasing concentrations of NaCl and KCl were added to NaOH-Glycine 50 mM (pH 10.0), 2.5 mM *p*NPP and enzymatic activity measured by standard procedures. Several divalent cations were also tested under similar conditions. All of them were used in their chloride form. The effect of inhibitors was determined by carrying out the same procedure, minus addition of CoCl₂.

DNA dephosphorylation procedure- pBSK was digested using *EcoRI* or *EcoRV* producing, respectively, cohesive and blunt ended linearized vectors. 1.1 µg of linearized vector was incubated in dephosphorylation buffer and 50 units of AP for 2 h. The recombinant AP from *P. abyssi* was used in Tris-HCl 0.2 M buffer (pH 10.0) at 70°C. Commercial calf intestinal AP (CIAP, Roche) was used as a positive dephosphorylation control in its commercial dephosphorylation buffer at 37°C. The number of AP units was determined by carrying out the standard assay procedure under dephosphorylation conditions of buffer and temperature. Following this, 0.55 µg of AP-treated linear vector was ligated in the presence of 2 units of T4 DNA ligase along with its commercial buffer (Roche) to give a final volume of 20 µL incubating overnight at 16°C. Finally, 50 µL of competent *E. coli* DH5α cells were transformed by 1 µL of the ligation mixture. Preparation of the competent cells and transformations were performed using the standard CaCl₂ transformation protocol [Ausubel *et al.*, 1998]. Transformed cells were selected by plating on 2xYT agar medium containing 100 µg.mL⁻¹ ampicillin. After linearization and dephosphorylation, DNA fragments were purified using Spin Column (Qiagen) and resuspended in ultra-pure water. Negative dephosphorylation control was performed by avoiding dephosphorylation step. DE(%), *i.e.* Dephosphorylation Efficiency (%), was calculated from the following equation:

$$DE(\%) = \left(1 - \frac{CFU / mL_{AP}}{CFU / mL_{control}}\right) \times 100$$

Where: CFU/mL: number of colony forming units per mL of transformed cells;
 CFU/mL_{AP}: ligation performed on dephosphorylated vectors;
 CFU/mL_{control}: ligation performed on non-dephosphorylated vectors.

RESULTS

P. abyssi alkaline phosphatase gene presents classical and unique features- Among the 1765 open reading frames deduced from the complete genome sequence of *P. abyssi* (available at: <http://www.genoscope.fr/Pab/>), the *phoA_{P.abys}* gene encoding an alkaline phosphatase was identified as a 1485 bp fragment located between positions +1001913 and +1003397 on the *P. abyssi* chromosome. Its putative genomic environment is composed of five genes encoding various phosphate transporting proteins, suggesting the existence of a *pho* regulon, as previously observed in other species [Hulett, 1996; Tommassen & Lugtenberg, 1982]. The deduced product of *phoA_{P.abys}* is a protein of 495 amino-acids, with a theoretical molecular mass and isoelectric point of 54.5 kDa and 4.90, respectively. Hydropathy analysis of the N-terminus end of the protein revealed a domain with a high hydrophobicity (data not shown), suggesting that it is a signal peptide. In accordance with the « (-3, -1) rule », the most probable cleavage site for the signal peptidase is between A25 and S26 [Nielsen *et al.*, 1997; von Heijne, 1983]. Significant peptide sequence similarities were found with other APs already described, ranging from less than 30% for eucaryotic counterparts to approximately 35% for procaryotic APs, with the exception of *Pyrococcus furiosus* AP, which is 80% similar. In addition, alignment of peptide sequences from various APs with the mature product of the *phoA_{P.abys}* gene (Figure IV.1) shows conservation of well-defined regions which are conserved throughout the entire family. These regions contain the amino-acid residue, S102 (mature *E. coli* AP numbering), which has been shown to be incorporated within the phosphoseryl intermediate, in addition to the residues involved in the coordination of the two Zn(II) and the Mg(II) ions. However, the secondary ligands of the Mg(II), *i.e.* D153 and K328 (mature *E. coli* AP numbering), are replaced by H108 and H228 in the *P. abyssi* AP. These amino-acid substitutions have been shown to be specific to mammalian APs [Murphy *et al.*, 1995]. By comparison of AP sequences from *P. abyssi* and *E. coli*, it was concluded that the 10 strands of central β -sheet are conserved (data not shown). Thus, the topology of the *E. coli* AP central β -sheet is most likely conserved in the archaeal enzyme. Also, a putative Ca(II)-binding domain (Ef-hand) was deduced from the C-terminal sequence analysis and found to be specific to *P. abyssi* and *P. furiosus* AP sequences.

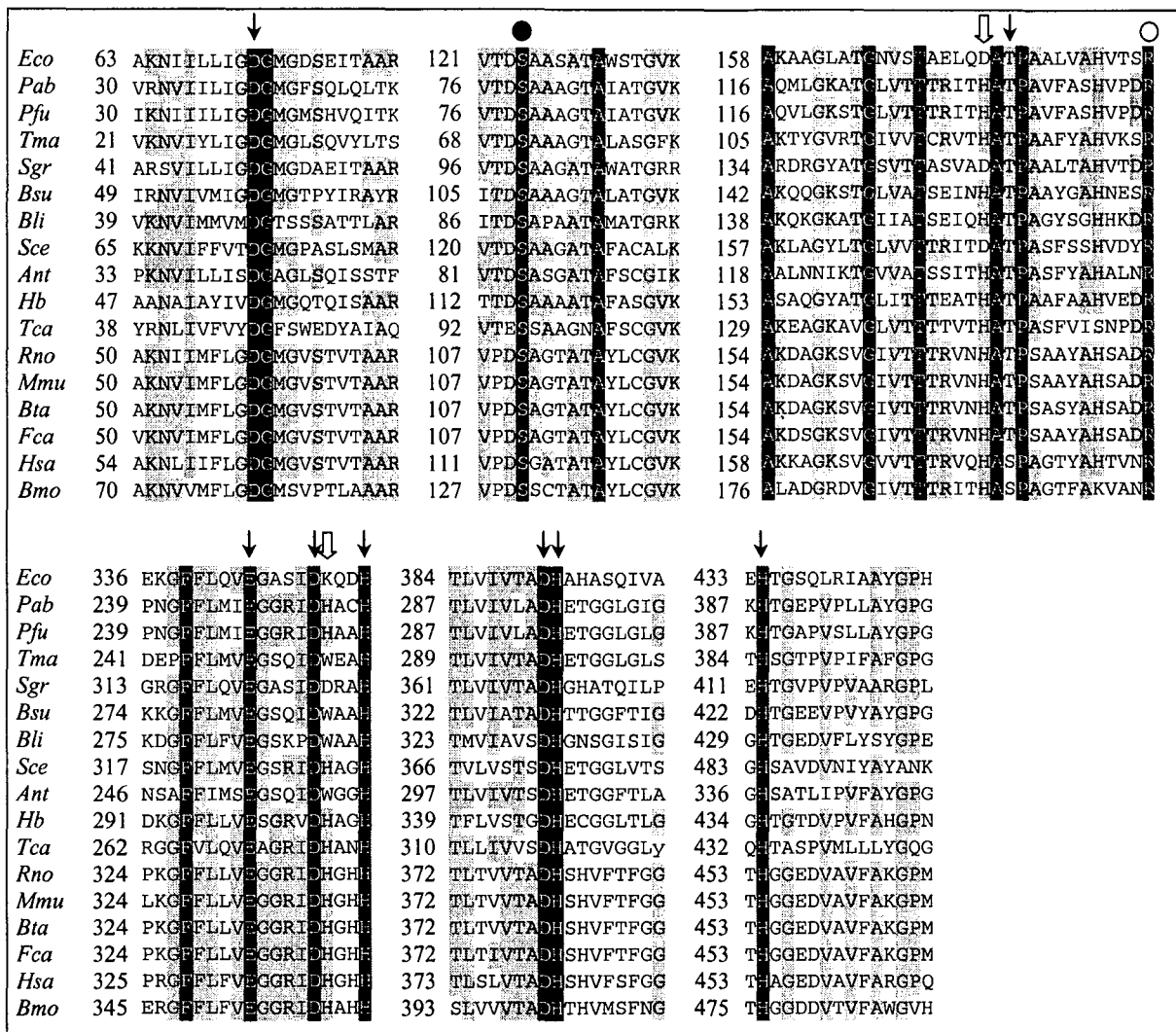


Figure IV.1. Conservation of the active site: Peptide sequence alignment of *P. abyssi* AP with other members of the AP family. Sequences were obtained from the following accession numbers: *Eco*, *Escherichia coli* (pir|PAECA); *Pab*, *Pyrococcus abyssi* (pir|E75081); *Pfu*, *Pyrococcus furiosus* (Pf_962748); *Tma*, *Thermotoga maritima* (pir|72410); *Sgr*, *Streptococcus griseus* (pir|S17780); *Bsu*, *Bacillus subtilis* AP IV (pir|B69676); *Bli*, *Bacillus licheniformis* (genpept|AAG10093); *Sce*, *Saccharomyces cerevisiae* (pir|S69648); *Ant*, *Antartic bacterium* (emb|CAB82508.1); *Hb*, *Halobacterium* sp. (genpept|AAG20936); *Tca*, *Thermus caldophilus* (genpept|AAF13361); *Rno*, *Rattus norvegicus* (pir|A28114); *Mmu*, *Mus musculus* (pir|A40172); *Bta*, *Bos taurus* (pir|A29600); *Fca*, *Felis catus* (pir|S66467); *Hsa*, *Homo sapiens* placental (pir|PAHUA); *Bmo*, *Bombyx mori* (pir|S19607). Strictly and above 60% conserved residues are highlighted in black and gray, respectively. Symbols above the sequences indicate the conserved residues which are involved in the active site, according to the following legend: ↓ metal ion coordination-Zn1, Zn2, Mg primary ligand, ⇓ metal ion coordination-Mg secondary ligand, ● phosphoserine intermediate formation, ○ phosphate coordination. Numbering of the sequences is given for precursors. Alignments were performed using the GAP program (GCG Wisconsin Package) in pairwise comparison.

Expression and purification of *P. abyssi* AP- A 1410 bp fragment was cloned in pARHS vector, encoding a 470 amino-acid protein which corresponds to the putative mature protein. The recombinant AP was expressed in *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS cells, harboring the pPabAP plasmid. The *E. coli* strain harboring the plasmid pPabAP was grown until mid-log phase and induced by IPTG. SDS-PAGE analysis of cell-free heat-treated extract of induced cells revealed an additional band of 52 kDa corresponding to the calculated molecular mass of the *phoAP.abyssi* product without its putative signal peptide (data not shown). The 52 kDa band was absent in extracts of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS (data not shown). A low expression rate was observed (approximately 5% of the soluble cellular protein fraction). Optimization of the expression was attempted. Neither IPTG concentration (0.1 to 2.0 mM) nor induction time (4 h to overnight) variations showed significant changes in the final recombinant enzyme concentration. Negligible AP activity was observed in the insoluble cellular fraction. Moreover, cytotoxicity of the recombinant enzyme was observed as cell lysis after induction of expression. Therefore, an induction time of 4 h was preferred to overnight. Nevertheless, recombinant AP could be easily purified to homogeneity by a three-step purification procedure consisting of heat incubation (80°C, 20 min, pH 5.5) which results in denaturation of the majority of *E. coli* proteins, followed by two anion exchange chromatography steps (data not shown). In particular, it appears that the heat incubation at pH 5.5 completely denatured *E. coli* AP as shown by zymogram and standard assay using MUFP and *p*NPP as substrates, respectively. Purification was estimated at approximately 450-fold and the enzyme was determined to be at least 95% pure by SDS-PAGE (Figure IV.2). Finally, 0.63 mg.mL⁻¹ of purified AP solution was stored in phosphate buffer (pH 7.5) 50% glycerol at -20°C.

***P. abyssi* AP exists in mono- and homodimeric forms-** Electrophoresis of the purified recombinant AP using a 4%-20% gradient polyacrylamide gel in native condition revealed the presence of two active forms (Figure IV.3). Their respective molecular masses were estimated at 54 kDa and 106 kDa. Since the 54 kDa value is consistent with the calculated molecular mass of the cloned gene product, the recombinant *P. abyssi* AP appears to exist in two forms, monomeric and homodimeric, both of which are active (Figure IV.3). As one cysteine residue is present in the deduced amino-acid sequence, the hypothesis of a dimeric form maintained with an interchain disulfide bond was clarified by treating the *P. abyssi* AP with SDS before running the electrophoresis experiment. Treatment of the AP with SDS yielded only the monomeric form (Figure IV.3) and it was therefore concluded that the homodimeric form is

maintained by non-covalent interactions, such as ion-pairs and/or hydrophobic interactions, rather than an interchain disulfide bond.

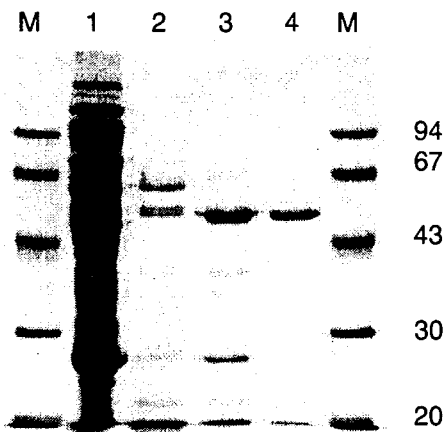


Figure IV.2. Purification of the recombinant *P. abyssi* AP. 12% SDS-PAGE showing the different steps of AP purification. Recombinant AP was purified from soluble cellular fraction of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pPabAP plasmid, induced cells. Lanes M: molecular mass standard. Lane 1: soluble cellular crude extract. Lane 2: crude extract after thermal treatment. Lane 3: ResourceQ pooled active fractions. Lane 4: purified fractions after MonoQ chromatography.

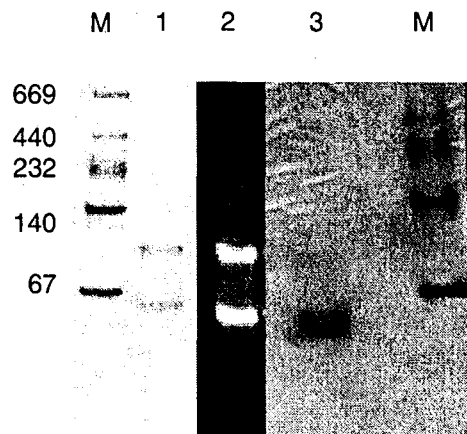
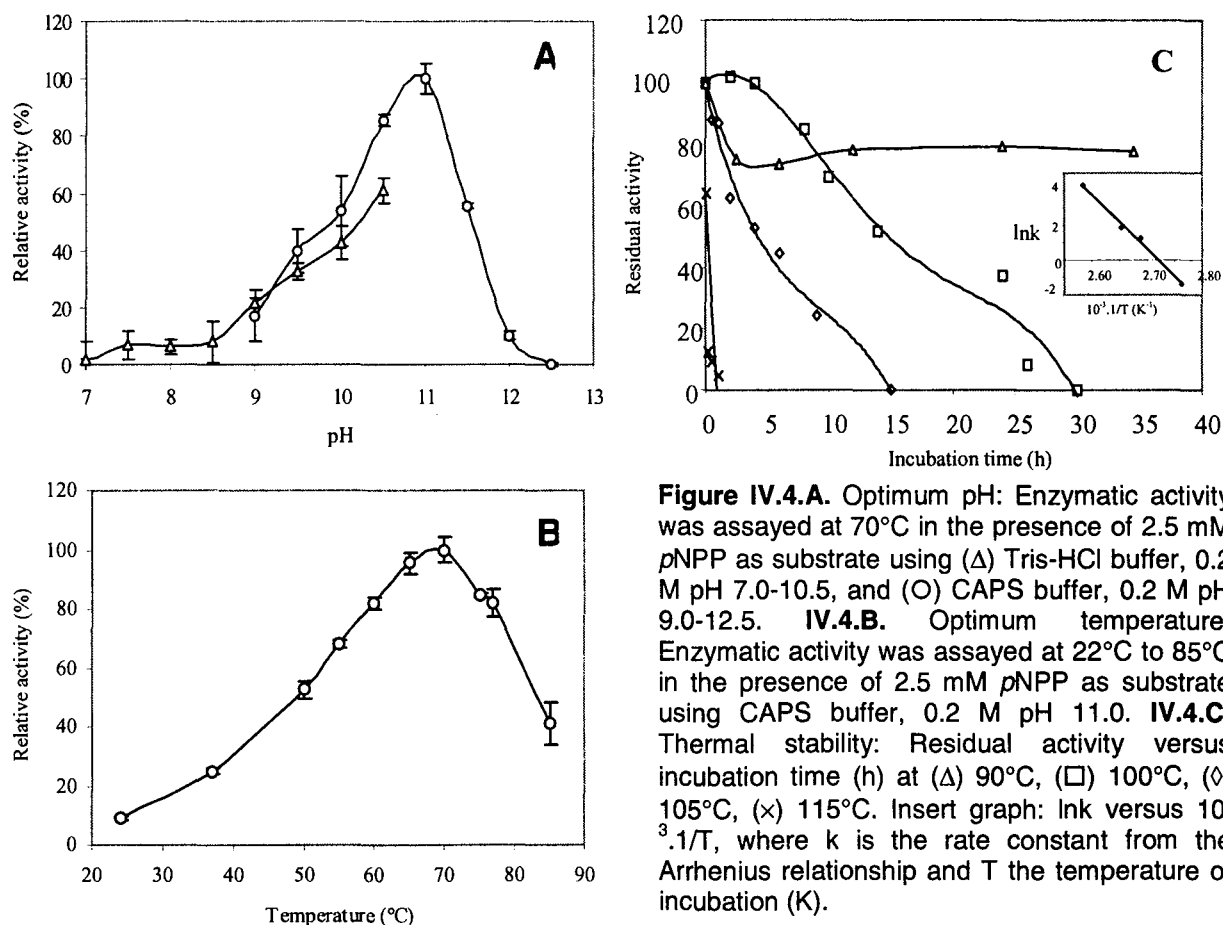


Figure IV.3. Quaternary structure analysis. 4-20% gradient PAGE showing active forms and denaturation studies of the purified recombinant AP. Lanes M: molecular mass standard. Lane 1: purified AP after Coomassie blue staining. Lane 2: purified AP after incubation of the gel under enzymatic reaction conditions, using MUFP as substrate. Lane 3: purified AP after SDS 10% treatment (10 min, 100°C) and Coomassie blue staining.

P. abyssi AP presents high pH and temperature activation and high thermostability- Apparent optimum pH of the AP was determined to be 11.0 in CAPS 0.2 M buffer. The enzyme exhibited at least 60% of its optimal activity over a rather narrow pH range, from 10.0 to 11.5 (Figure IV.4.A). Significant activity was observed over a pH range from 9.0 to 12.0. Furthermore, thermal activation studies enabled the determination of an apparent optimum temperature of 70°C in CAPS 0.2 M buffer pH 11.0 (Figure IV.4.B). 25% of the maximum activity was found at 37°C. Moreover, the enzyme exhibited at least 80% of its optimal activity over a range of temperature from 60°C to 80°C. Thermal stability was determined from enzyme incubation over a range of temperatures (90°C-115°C) (Figure IV.4.C). Half-lives of the *P. abyssi* AP at 100°C and 105°C were estimated at 18 h and 5 h, respectively. 80% of the activity was recovered after incubation at 90°C for 36 h. Denaturation of the enzyme was observed to occur in less than 30 min at 115°C. Activation energy of the thermal denaturation was estimated at 262.1 kJ.mol⁻¹, according to the Arrhenius relationship.



***P. abyssi* AP is strongly dependent on divalent cations-** As APs are classically described as metalloenzymes [Posen, 1967], the effect of divalent cations was examined (table IV.1). A strong inhibition in the presence of 1 mM EDTA in the reaction mixture was observed, whereas the enzyme exhibited a 2-fold activation in the presence of 1 mM Mg(II), Mn(II), Zn(II) or Co(II). Such results are a signature of strong dependency on divalent cations and confirm the metalloenzymatic nature of the *P. abyssi* AP. Increasing concentrations of Mg(II) in the reaction mixture provided a linear activation of the enzyme in the 0-2 mM range followed by a plateau in the 2-10 mM range (data not shown). This is consistent with the presence of a Mg(II)-binding site which has become saturated with the addition of exogenous Mg(II). Despite the elucidation of a Ca(II)-binding site in the deduced peptide sequence, this cation was found to have no significant effect on enzymatic activity. Cu(II) and Ni(II) showed inhibitory effects. The influence of ionic strength was tested. Increasing concentrations of NaCl and KCl had an inhibitory effect on AP activity. At 2 M of NaCl or KCl, 60% and 90% of the enzyme activity respectively was recovered (data not shown).

Table IV.1. Effect of divalent cations

Effector (1 mM)	Relative activity (%)
None	100.0 ^a
Mg(II)	223.1 ^a
Mn(II)	206.1 ^b
Zn(II)	204.0 ^b
Co(II)	186.6
Ca(II)	82.8 ^b
Cu(II)	61.9
Ni(II)	44.5 ^a
EDTA	10.9 ^a

SD < 5%, except ^a: 5% ≤ SD < 10%; ^b: 10% ≤ SD < 15%

P. abyssi AP catalytic properties: effect of substrate concentration and inhibitors- Michealis-Menten kinetic parameters were estimated using the Lineweaver-Burke representation (Figure IV.5). The curve is made up of two linear parts which allowed the calculation two (V_{max} , K_m) doublets. Thus, from 0.1 mM to 0.7 mM, obtained values were: $V_{max1} = 4.07 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ and $K_{m1} = 166.33 \mu\text{M}$; from 0.8 to 10 mM, obtained values were: $V_{max2} = 8.31 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ and $K_{m2} = 1204.98 \mu\text{M}$. Moreover, inhibitors were tested (table IV.2): classical phosphatase inhibitors (inorganic phosphate, molybdate, vanadate), denaturing agents (SDS, urea), metal ion chelators (EDTA, EGTA) and thiol reducing agents (DTT, MCE). Inorganic phosphate inhibited AP activity with only 22.2% of the control activity recovered in the presence of 10 mM Na_2HPO_4 . This is in accordance with the general inhibitory effect of inorganic phosphate on APs. Molybdate and vanadate were shown to have slight inhibitory effects, with 86.3% and 73.4% of the control activity retained, respectively, at an added concentration of 10 mM, respectively. SDS exhibited a strong inhibitory effect, whereas 2 M and 4 M urea did not appear to have any effect. Metal ion chelators greatly inhibited enzymatic activity. Thiol reducing agents (DTT and MCE) showed strong inhibitory effects. Upon addition of 2 mM DTT or MCE to the reaction mixture, residual AP activity was 1.6% and 58.5%, respectively.

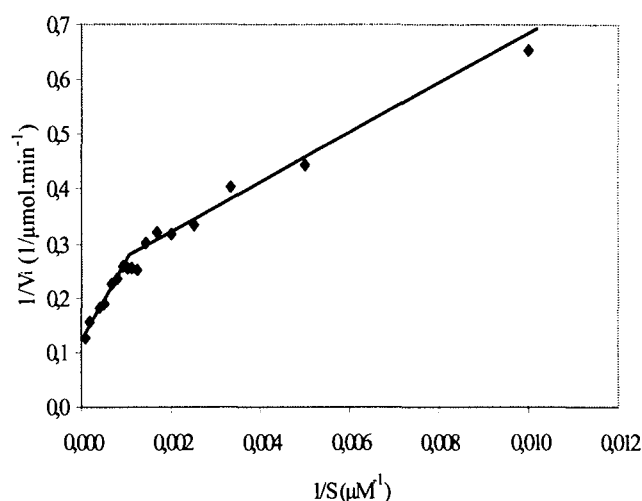


Figure IV.5. Kinetic parameters. $1/V_i$ versus $1/S$. Enzymatic activity was assayed under standard condition with 1 mM CoCl_2 using a range of pNPP concentrations from 0.1 mM to 10 mM. V_i : initial velocity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$); S : pNPP concentration (μM).

Table IV.2. Spectrum of inhibitors

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)	Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100.0 ^a	EDTA	1	10.7
SDS	30 (1%)	16.4 ^a		5	5.6 ^a
Urea	2000	107.8	EGTA	1	17.8
	4000	106.5 ^a		5	4.6
Molybdate	1	101.2 ^a	DTT	0,2	79.7
	10	86.3		1	2.2
Vanadate	1	88.2 ^a		2	1.6
	10	73.4 ^a	MCE	2	58.5 ^a
Inorganic phosphate	1	74.8		5	32.1
	10	22.2		10	14.1

SD < 5%, except ^a: 5% ≤ SD < 10%

***P. abyssi* recombinant AP is effective for DNA dephosphorylation-** APs are classically used in molecular biology to remove 5'-terminal phosphate from DNA fragments. As such, *P. abyssi* AP was tested against cohesive (*EcoRI* linearized pBSK) and blunt ends (*EcoRV* linearized pBSK). The efficiency of dephosphorylation was estimated by comparing transformation rates after ligation of dephosphorylated and non-dephosphorylated plasmids. Complete ligation of non AP-treated fragments was observed when the experiment was

carried out using cohesive ends as observed on agarose gel (Figure IV.6.A, lane 5). However, *P. abyssi* AP- and CIAP-treated fragments were generally found to be non-ligated (Figure IV.6.A, lanes 6 and 7, respectively). Dephosphorylation efficiency [DE(%)] was estimated at 93.8% for *P. abyssi* AP and 99.7% for CIAP. Similar results were observed on experiments using blunt ends, however with partial ligation of non AP-treated fragments (Figure IV.6.B). DE(%) was estimated at 84.1% for *P. abyssi* AP and 98.7% for CIAP. Obtained DE(%) values indicate the ability of *P. abyssi* AP to dephosphorylate linear DNA fragments, thus preventing self-ligation.

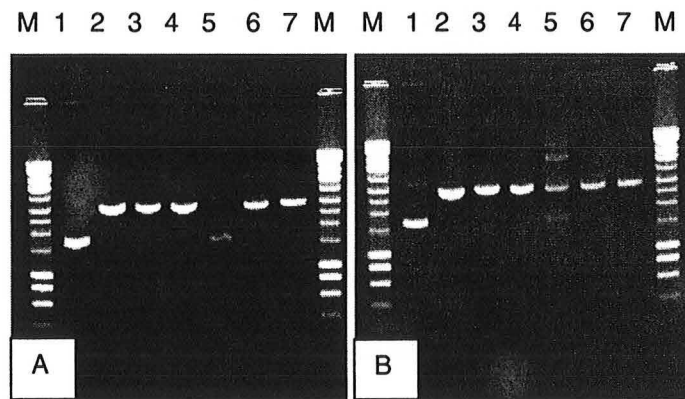


Figure IV.6. DNA dephosphorylation. 0.8% agarose gel electrophoresis analysis of the DNA dephosphorylation procedure. pBSK vector was used as substrate after being digested by *EcoRI* (IV.6.A.) or *EcoRV* (IV.6.B.). Lanes M: DNA ladder (Eurogentec S.A.). Lanes 1: circular pBSK. Lanes 2: linearized pBSK. Lanes 3: *P. abyssi* AP-treated linear pBSK (2 h, 70°C). Lanes 4: CIAP-treated linear pBSK (2 h, 37°C). Lanes 5: Non AP-treated plasmid after ligation reaction. Lanes 6: *P. abyssi* AP-treated plasmid after ligation reaction. Lanes 7: CIAP-treated plasmid after ligation reaction.

DISCUSSION

The *P. abyssi* *phoA* gene encoding an alkaline phosphatase was cloned and the recombinant enzyme expressed in *E. coli*. This present work reports the first characterization of an AP from a hyperthermophilic archaeon. AP activity has already been found in *Pyrococcus horikoshii*, but the enzyme has not been isolated and characterized [González *et al.*, 1998]. In addition, comparison of the *P. abyssi* and *P. horikoshii* genomes was performed and *P. abyssi* AP sequence found no homologue in the *P. horikoshii* genome. Analysis of the deduced peptide primary structure revealed highly conserved patterns with other AP sequences. Comparison with the *E. coli* enzyme enabled identification of the strong conservation of both the catalytic site (metal ion coordination, phosphoseryl intermediate and phosphate coordination) and secondary structure. This is consistent with previous studies on other APs [Hulett *et al.*, 1991; Kim & Wyckoff, 1989]. This enzyme was expressed in *E. coli* HMS174 (DE3), harboring pLysS and recombinant pPabAP plasmids. Low expression levels were obtained and experiments showed cytotoxicity of the recombinant AP. In addition, analysis of *P. abyssi* AP nucleotide sequences showed the presence of rare arginine encoding codons AGG and AGA occurring at 2.8% and 1.5% respectively, whereas in *E. coli* they do so at only 0.14% and 0.21% [Kane, 1995]. Thus, the level of expression might be improved by co-expressing the recombinant AP and tRNA_{UCU} [Kim *et al.*, 1998; Wakagi *et al.*, 1998].

Properties of the recombinant enzyme have been elucidated and since the folding conditions and the post-translational modifications are different between the native and the recombinant AP biosynthesis, properties reported here do not allow any conclusions about the native AP. Apparent optimum pH was found to be 11.0 in CAPS 0.2 M buffer. *P. abyssi* AP is amongst the most alkaline characterized. APs from thermophilic bacteria showed high pH optima, e.g.: 9.9 for the *T. neapolitana* enzyme [Dong & Zeikus, 1997], 10.0 and 11.5 for the *T. thermophilus* APs [Pantazaki *et al.*, 1998]. Mammalian APs possess higher pH optima than the *E. coli* enzyme and it has been proposed that substitutions of D153 and K328 residues into corresponding Histidine for the mammalian enzymes are responsible for this increase in pH [Holtz & Kantrowitz, 1999; Murphy *et al.*, 1995]. The high optimum pH observed may be explained by the similarity of *P. abyssi* AP to that found in mammalian APs. The apparent optimum temperature was found to be 70°C in the CAPS 0.2 M pH 11.0 buffer. Because *P. abyssi*'s optimal growth temperature is near 100°C [Erauso *et al.*, 1993], the determined thermoactivation optimum value appeared lower than expected. Nevertheless, other

recombinant proteins from *P. abyssi* present optimum temperature activity far below 100°C. Thermal stability was determined and half-lives at 100°C and 105°C were estimated at 18 h and 5 h, respectively. Approximately 80% of the activity is conserved after a 36 h incubation at 90°C. These results show that the *P. abyssi* AP is the most thermostable AP described so far, in comparison to the *Thermotoga neapolitana* AP that exhibits a half-life of about 4h at 90°C in the presence of CoCl₂ [Dong & Zeikus, 1997]. Catalytic properties of the *P. abyssi* AP were determined. Phosphotransferase activity is commonly observed by using Tris-HCl or ethanolamine buffers [Coleman, 1992; Morales *et al.*, 2000], which increases enzyme activity by promoting the phosphotransferase reaction. A 4-fold increase in activity in Tris-HCl relative to NaOH-Glycine buffer was observed with the *P. abyssi* AP in the same conditions of temperature, pH and substrate. Michaelis constants were found to be ($V_{max1} = 4.07 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, $K_{m1} = 166.33 \mu\text{M}$) and ($V_{max2} = 8.31 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ and $K_{m2} = 1204.98 \mu\text{M}$). *P. abyssi* AP presents K_m values which are consistent with those found for several APs [Murphy *et al.*, 1995]. Lineweaver-Burke representation allowed the observation of two behaviors. V_{max2} is approximately two-fold the V_{max1} value and K_{m2} about 7-fold the K_{m1} value. Since zymogram analysis of *P. abyssi* AP highlighted two active forms, the kinetic observations could correspond to the presence of both the monomer and the homodimer in the enzymatic reaction mixture. However, this hypothesis has to be confirmed by isolating the two enzyme forms and studying them separately. A spectrum of inhibitors was tested on the *P. abyssi* AP, using molybdate and vanadate as phosphotyrosylphosphatase inhibitors [Ansai *et al.*, 1998]. More precisely, vanadate is defined as an inhibitor of phosphoryltransfer reactions, especially if they involve a stable/covalent phosphoseryl-enzyme intermediate [Bonet *et al.*, 1994]. Vanadate appeared to be a weak inhibitor of *P. abyssi* AP. This is not consistent with previous studies on other APs [Ansai *et al.*, 1998; Bonet *et al.*, 1994; Holtz *et al.*, 1999] and may be a result of the experimental conditions (pH 10.0, 70°C) or of an original catalytic mechanism. In contrast, thiol-reducing agents exhibited a strong inhibitory effect on AP activity. Although *P. abyssi* AP contains no intra- or inter-chain disulfide bonds, cysteine residues (one per monomer) seem critically implied in the enzyme activity. Strong inhibition in the presence of 1% SDS and lack of inhibition in the presence of 2 M and 4 M urea are consistent with properties of other APs [Sharipova *et al.*, 1998].

APs are metalloenzymes [Posen, 1967] and they are all inhibited by metal ion chelators such as EDTA. They are classically considered to be Zn(II)/Mg(II) dependent enzymes, especially *E. coli* and mammalian APs [Kim & Wyckoff, 1989]. However, activation following Mn(II), Co(II) or other metal ion addition has already been observed among other APs [Bonet *et al.*,

1994; Chen *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 1990; Morales *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2000; Pantazaki *et al.*, 1998; Sharipova *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 1990]. The *P. abyssi* AP was found to be activated by Zn(II), Mg(II), Mn(II) and Co(II). Increasing concentrations of Mg(II) results in an increase in enzymatic activity followed by a plateau (data not shown). Activation following the addition of Mg(II) has been observed with mammalian APs and largely characterized using *E. coli* AP mutants. Studies of *E. coli* AP concerning the secondary ligands of Mg(II) (D153 and K328, mature *E. coli* AP sequence numbering) have led to the conclusion that substitutions of these residues by Histidine result in the transformation of a Mg(II)-binding site into a Zn(II)-binding site. The affinity between Mg(II) and its binding site became lower for the (D153H, K328H) mutant AP, and optimal activity was recovered by the addition of Mg(II) [Holtz & Kantrowitz, 1999; Janeway *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1993]. The residues D153 and K328 in *E. coli* AP correspond to the residues H108 and H228 in *P. abyssi* AP. Both are similar to corresponding residues found in mammalian APs. This appears to be consistent with *P. abyssi* AP behavior towards Mg(II). Furthermore, the purified enzyme is active when no cations are added and inhibited by metal ion chelators. This may suggest that strong metal-enzyme interactions exist and that the purified AP is partially metalated. Therefore, *P. abyssi* AP may possess several metal binding sites. Such a hypothesis is consistent with the analysis of the sequence and other APs [Goldman *et al.*, 1990; Kim & Wyckoff, 1989; Spencer *et al.*, 1981]. Finally, reactivation of the *P. abyssi* AP apoenzyme was attempted by incubation of the latter in the presence of various divalent cations, at various temperatures. No reactivation was observed under these experimental conditions. Reactivation of AP apoenzymes has already been observed with varied efficiency [Ásgeirsson *et al.*, 1995; Dong & Zeikus, 1997]. However, drastic treatment of the purified *P. abyssi* AP using metal ion chelators appeared irreversible, suggesting important catalytic and structural roles of metal ions. Under present experimental conditions, *P. abyssi* AP presented two active forms: monomer and homodimer. APs are classically described as being homodimeric, which is the case with *E. coli* and mammalian APs. However, many monomeric [Eguchi, 1995; Hauksson *et al.*, 2000; Sharipova *et al.*, 1998] and oligomeric [Goldman *et al.*, 1990] forms have been described. Further studies may provide clarification of the parameters governing the equilibrium between the two forms. APs are commonly used in molecular biology for the construction of recombinant plasmids. APs remove 5'-terminal phosphate from DNA fragments and, as such, AP-treated linearized plasmids are unable to exhibit self-ligation and are more likely to integrate an exogenous gene insert. *P. abyssi* AP was tested under plasmid dephosphorylation conditions using a linear

cohesive or blunt ended pBSK vector. Dephosphorylation efficiency with regard to cohesive and blunt ends was estimated at 93.8% and 84.1%, respectively. Bovine AP was found to be more effective than the *P. abyssi* AP, however dephosphorylation conditions of the latter were not optimized. Although many APs have been isolated and characterized, only commercial *E. coli* AP (Bacterial AP) and CIAP are routinely used in molecular biology. Such properties are rarely reported. DNA dephosphorylation has been performed with the antarctic bacterium strain TAB5 AP [Rina *et al.*, 2000]. As *P. abyssi* AP presented great thermostability and good efficiency in DNA dephosphorylation, further studies may be required to elucidate its potential use in such applications.

Acknowledgments. This work was supported by the Biotechnology Program grant 98 C 0173 from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (M.E.N.R.T.), France.

Conclusion

L'objectif initial de cette première partie expérimentale était de confirmer que le gène *phoA*, identifié sur le génome de *Pyrococcus abyssi*, code pour une phosphatase alcaline. Cet objectif a été atteint. Pour cela, le gène a été cloné et la protéine recombinante exprimée chez *E. coli*, purifiée et caractérisée.

L'expression de cette enzyme, amputée de son peptide signal (cf. partie III et partie IV, « avant-propos »), a permis d'obtenir une protéine intracellulaire soluble.

La purification s'est déroulée en seulement trois étapes. La première a consisté à dénaturer les protéines d'*E. coli* par un choc thermique à pH 5,5. Cette méthode de thermodénaturation sélective est classiquement utilisée lors de la purification de protéines thermostables exprimées chez des hôtes mésophiles [Vieille & Zeikus, 2001]. Lors de cette étape, 90% des protéines intracellulaires ont été précipitées et l'activité phosphatase alcaline thermostable a été multipliée par 1,5. Ceci semble indiquer la nécessité d'un apport énergétique sous forme de chaleur pour améliorer la maturation de la protéine recombinante. Cet aspect a été rapporté en terme de gain de structures secondaires chez la phosphatase alcaline de *Thermotoga maritima* [Wojciechowski *et al.*, 2002].

La protéine purifiée a été caractérisée, permettant de mettre en évidence, notamment, ses optima de température et de pH (respectivement de 70°C et 11,0), sa thermostabilité (demi-vies respectives à 100°C et 105°C de 18 h et 5 h), sa nature de métallo-enzyme (inhibition par les chélateurs de métaux, activation par Mg^{2+} , Co^{2+} et Zn^{2+}) et sa structure quaternaire (mélange de monomère et d'homodimère, tous deux actifs). Cette caractérisation a permis de confirmer que le produit du gène *phoA* est une phosphatase alcaline thermostable.

En terme de connaissances académiques, la phosphatase alcaline de *P. abyssi* est la première phosphatase alcaline issue d'un Archaea hyperthermophile à avoir été isolée et caractérisée. L'un des points abordés dans l'article concerne la dépendance de l'enzyme vis-à-vis des métaux. La figure IV.7 présente le comportement de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* en présence de concentrations croissantes en certains métaux. Cet aspect est évoqué dans l'article mais n'y est pas détaillé. Les profils d'activité enzymatique en présence de $MgCl_2$ et en présence de $ZnCl_2$ observés sont typiques des phosphatases alcalines dont les ligands

secondaires du Mg^{2+} correspondent à deux résidus histidine [Murphy *et al.*, 1993 ; Murphy *et al.*, 1995].

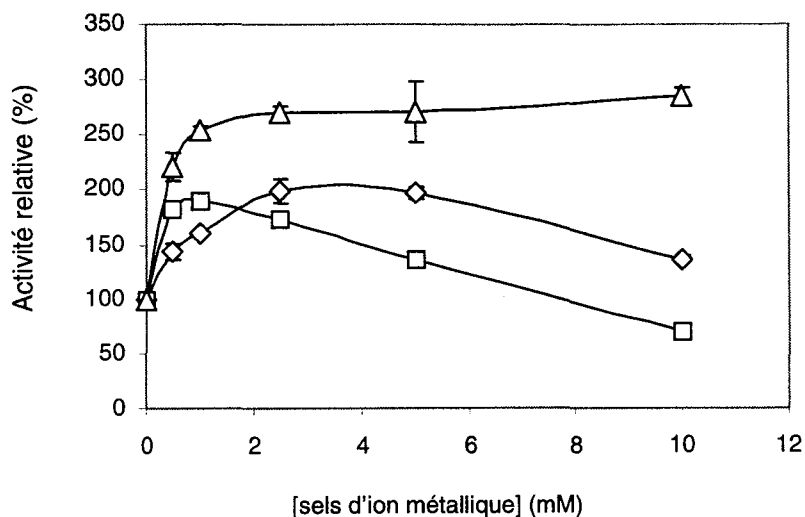
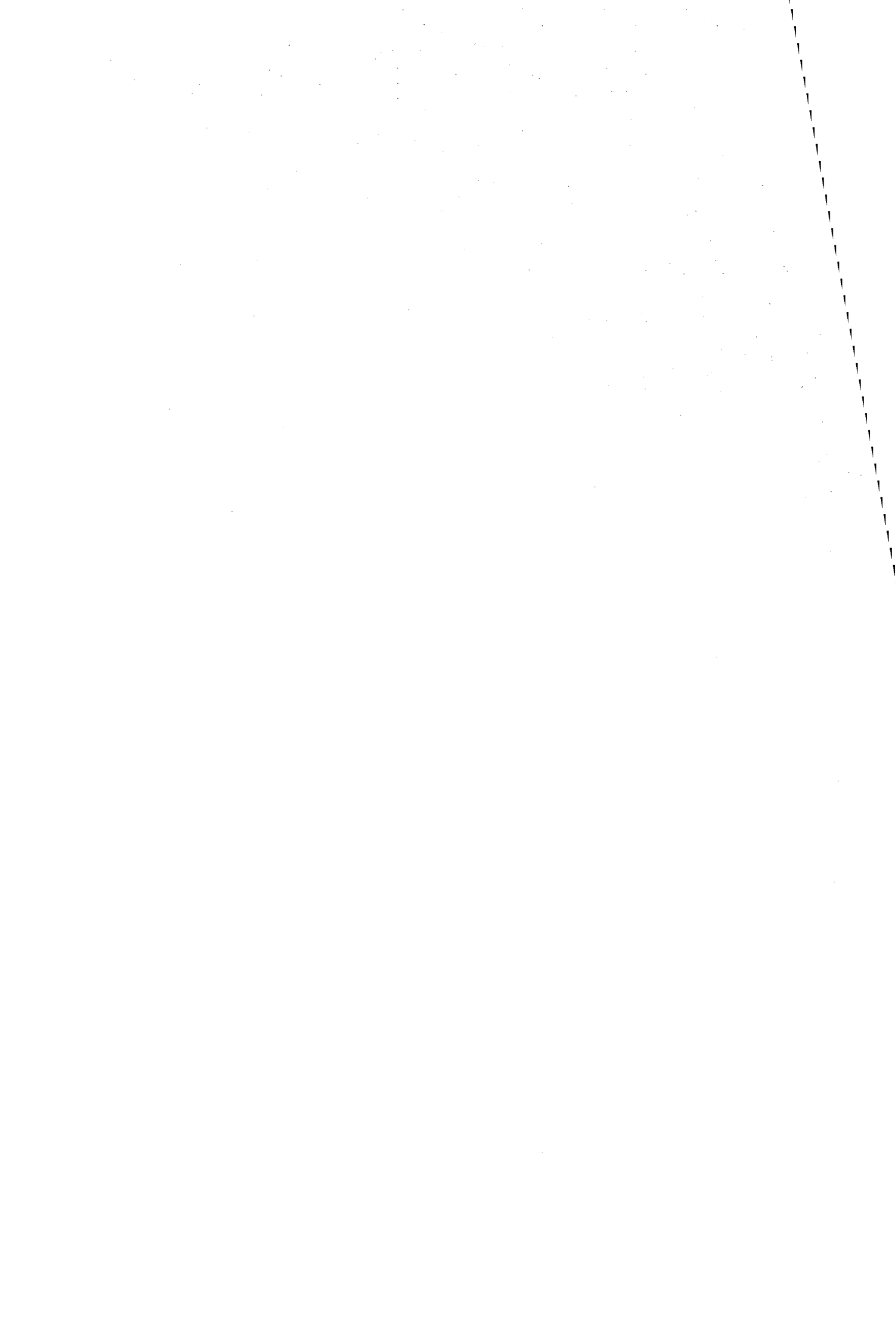


Figure IV.7. Activité de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* en fonction de la concentration en sels d'ion métallique. Δ , $MgCl_2$; \square , $ZnCl_2$; \diamond , $CoCl_2$.

En terme d'application potentielle, ces travaux de caractérisation ont montré que la phosphatase alcaline de *P. abyssi* était capable de déphosphoryler des fragments d'ADN linéaires à extrémités franches ou cohésives. Ce point présente un intérêt particulier dans la mesure où il s'agit de la principale utilisation des phosphatases alcalines en biologie moléculaire, dont le marché actuel est essentiellement constitué par la phosphatase alcaline intestinale de veau.



PARTIE V

STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE *PYROCOCCUS ABYSSI*

Zappa, S., Boudrant, J. & Kantrowitz, E. R. (2002) The Dimer is the Active Form of *Pyrococcus abyssi* Alkaline Phosphatase. Manuscrit soumis pour publication dans *European Journal of Biochemistry* et accepté sous réserve de modifications.

SOMMAIRE DE LA PARTIE V

Avant-propos.....105

ARTICLE : "The Dimer is the Active Form of *Pyrococcus abyssi* Alkaline Phosphatase".....106

ABSTRACT.....106

INTRODUCTION.....107

MATERIALS AND METHODS.....108

 Organisms and growth conditions.....108

 Construction of cells expressing *P. abyssi* AP108

 Expression and purification of the recombinant AP.....109

 Alkaline phosphatase assay and protein determination.....110

 Secondary and quaternary structure analysis.....110

 Metal removal and reactivation of EDTA-treated AP111

RESULTS.....112

 pH and buffer: key parameters for structure stability.....112

 Attempts to separate the two quaternary structures.....113

 Removal of the metals promotes monomer formation.....114

 Metals induce partial reactivation and dimer formation of the EDTA-treated AP.....116

 Secondary structure elements: conservation of the core of the AP117

DISCUSSION.....118

CONCLUSION.....121

ACKNOWLEDGMENTS.....121

CONCLUSION.....122

AVANT-PROPOS

Les travaux rapportés dans la partie précédente ont permis de mettre en évidence certaines caractéristiques de la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi*. Parmi ces propriétés, la structure quaternaire de l'enzyme a attiré notre attention. En effet, les travaux préliminaires ont montré sur gel natif la présence de deux formes, présumées être monomérique et homodimérique, toutes deux actives.

Or, les phosphatases alcalines sont classiquement décrites comme étant des homodimères. De plus, cette structure quaternaire semble être une condition nécessaire à l'activité enzymatique. Bien que chaque monomère dispose d'un site actif a priori complet et intact, l'association de deux monomères identiques permet d'obtenir une phosphatase alcaline fonctionnelle. Ce phénomène est désigné sous le terme de « complémentation intragénique ». Les phosphatases alcalines font partie des rares enzymes à posséder une telle propriété.

L'isolement d'une phosphatase alcaline monomérique active permettrait d'apporter des données structurales importantes pour la compréhension de ce phénomène. C'est pourquoi, les résultats préliminaires concernant la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi* nous ont encouragé dans cette voie et donc à en savoir plus sur la structure quaternaire de cette enzyme. L'objectif de cette partie du travail fut donc de confirmer l'activité du monomère en solution. Pour cela, il a été entrepris de séparer les deux formes mono- et di-mériques afin de vérifier si elles existaient en tant qu'espèces distinctes ou sous forme d'un équilibre. De plus, afin de caractériser ce phénomène, certains paramètres déterminant l'association et la dissociation des deux sous-unités du dimère ont été étudiés.

Les résultats rapportés dans cette partie sont le fruit d'un travail réalisé lors d'un séjour au sein de l'équipe dirigée par Evan R. Kantrowitz, au Département de Chimie de Boston College. Cette collaboration a abouti à la rédaction d'un article, soumis pour publication dans *European Journal of Biochemistry* et accepté sous réserve de modifications. Cet article constitue l'essentiel de cette partie.

The Dimer is the Active Form of *Pyrococcus abyssi* Alkaline Phosphatase

Sébastien ZAPPA¹, Joseph BOUDRANT^{1*} and Evan R. KANTROWITZ²

¹ Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
² Chemistry Center, Boston College, Chestnut Hill, Massachusetts 02467, USA

* Corresponding author

ABSTRACT

Alkaline phosphatases (APs), E.C. 3.1.3.1, are non-specific phosphomonoesterases optimally active under alkaline conditions. They are classically known to be homodimeric metalloenzymes. This quaternary structure has been considered necessary for activity, although the relationship between quaternary structure and activity is not well understood. Recombinant *Pyrococcus abyssi* AP was previously isolated and characterised, appearing to have two active quaternary structures: a monomer and a homodimer. The purpose of the present work was to isolate and confirm that the monomeric form was active and to establish the parameters governing assembly and dissociation of the dimer. Sequence comparisons were made along with studies concerning pH, buffer and metal influence on the *P. abyssi* AP quaternary structure. pH appeared to be an important parameter: in acidic media, the monomer/dimer ratio shifted towards monomer. Buffer composition also affected the quaternary structure: at the same pH, in potassium phosphate buffer, the two quaternary structures were observed, whereas in Tris-HCl, only the dimer was observed. Metals bound to the enzyme were found to be involved in the stability of the quaternary structure. Indeed, the *P. abyssi* AP obtained upon removal of the metals was monomeric. Reactivation of the latter was achieved with variable efficiency. Based on these experiments, the active form of *P. abyssi* AP is the homodimer. The previous observation of the monomer having activity in native gels may be the result of dimerisation of the monomers during the activity measurements.

Keywords: alkaline phosphatase, thermostable enzyme, metalloenzyme, *Pyrococcus abyssi*.

INTRODUCTION

Alkaline phosphatases (APs), E.C. 3.1.3.1, are non-specific phosphomonoesterases optimally active under alkaline conditions [Trowsdale *et al.*, 1990]. Despite the isolation and biochemical characterisation of a number of APs from a broad range of organisms over the past few decades, *Escherichia coli* AP remains the one best studied. Amino acid sequences of APs from a wide variety of species show highly conserved patterns [Kim & Wyckoff, 1989]. *E. coli* AP has been used as a model for the AP family and most of its properties parallel those of other APs, especially of the mammalian enzymes. AP can act as a phosphohydrolase by transferring the phosphoryl group from a phosphomonoester to water, releasing inorganic phosphate, and also as a phosphotransferase by transferring the substrate phosphoryl group to an alcohol acceptor, such as Tris [Coleman, 1992]. The reaction mechanism of AP is known to occur through a covalent phosphoenzyme intermediate, involving a serine residue [Coleman, 1992]. An important feature of its catalytic site is the presence of a metal triad, composed of two atoms of Zn(II) and one atom of Mg(II). It has been established that these metals play a key role in the enzyme reaction [Holtz & Kantrowitz, 1999; Stec *et al.*, 2000]. Structures of the *E. coli*, human placental and arctic shrimp APs have been determined [Kim & Wyckoff, 1989; de Backer *et al.*, 2002; Le Du *et al.*, 2001]. The *E. coli* enzyme comprises two identical subunits of 47 kDa, each having one catalytic site, resulting in a homodimer of 94 kDa. Each monomer is composed of a ten-stranded β -sheet core surrounded by a three-stranded β -sheet on the top and sixteen helices [Kim & Wyckoff, 1989]. Moreover, it has been shown that the homodimeric form is essential for the enzyme activity [McComb *et al.*, 1979]. This phenomenon, the assembly of two identical subunits to create an active enzyme, is known as intragenic complementation. *E. coli* and mammalian APs are among the rare enzymes that exhibit this property. The mechanism of intragenic complementation in the AP system is not as yet understood. Various studies have been carried out to determine the parameters allowing the interaction of the two subunits to create the dimeric form, and to establish why only the homodimer is active [McComb *et al.*, 1979]. To address this question, the investigation of an active monomeric AP would prove advantageous, which is one of the reasons that APs from different sources are of great interest.

Indeed, even though most APs are homodimers, other quaternary structures have been observed: monomeric APs from *Bombyx mori* [Eguchi, 1995], from *Vibrio* sp. [Hauksson *et al.*, 2000], from *Bacillus intermedius* [Sharipova *et al.*, 1998] and *Bacillus subtilis* (APIV)

[Hulett *et al.*, 1990], as well as an oligomeric AP from *Haloarcula marismortui* [Goldman *et al.*, 1990].

Pyrococcus abyssi is hyperthermophilic archaeon, isolated from a hydrothermal vent, that can grow at temperatures up to 105°C [Erauso *et al.*, 1993]. An AP gene was identified from the completely sequenced genome. This gene was cloned, the protein expressed in *E. coli* and the recombinant *P. abyssi* AP purified and characterised [Zappa *et al.*, 2001]. Native PAGE analysis with activity staining identified two active forms presumed to be a monomer and a homodimer [Zappa *et al.*, 2001]. In the present work, we attempt to isolate the monomeric form of the *P. abyssi* AP and to confirm that the monomeric form of the enzyme is active. In order to accomplish this aim, it was necessary to determine whether the AP in solution was a monomer or was in a monomer-dimer equilibrium and, if so, to establish the parameters governing assembly and dissociation of the dimer.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and growth conditions- *E. coli* DH5 α and *E. coli* HMS174 (DE3) cells harbouring pLysS, were used as the host strains for the recombinant plasmid pET9a (Promega). Both cell lines were purchased from Novagen. *E. coli* strains were grown in 2 \times YT medium (Bactotryptone 16 g.L⁻¹, Yeast Extract 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹) on a rotary shaker at 37°C for various times. Kanamycin was added to 2 \times YT to give a final concentration of 50 μ g.mL⁻¹. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM to induce recombinant AP gene expression [Ausubel *et al.*, 1998].

Construction of cells expressing *P. abyssi* AP- The putative mature *P. abyssi* AP encoding gene was removed from pPabAP [Zappa *et al.*, 2001] by a *Nde*I/*Bam*HI double digestion followed by purification of the 1410 bp fragment from an agarose gel. This fragment was cloned in plasmid pET9a, purchased from Promega, using the same restriction sites. The pET9aAP recombinant plasmid was amplified using *E. coli* DH5 α cells and transformed into *E. coli* HMS174 (DE3), harbouring pLysS, for expression experiments. All steps were performed according to standard procedures [Ausubel *et al.*, 1998]. Using this strategy, the putative mature *P. abyssi* AP was produced in the cytoplasm of the host cell.

Expression and purification of the recombinant AP- An overnight culture of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harbouring pET9aAP, was diluted 1:100 (vol:vol) and grown to an Abs₆₀₀ of 1.4. The culture was induced by the addition of IPTG, to a final concentration of 1 mM, and incubated overnight. Using this procedure, 25.2 g of wet cells from 4 litres of culture were obtained. The cells were harvested by centrifugation, washed in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 50 mM NaCl, and then resuspended in 50 mM sodium citrate buffer, pH 5.5. After sonication, cell debris was removed by centrifugation (10,000 × g for 10 min). The resulting supernatant was heated for 20 min at 80°C and precipitated proteins removed by a second centrifugation as described above. The supernatant was subsequently dialysed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and loaded on an anion exchange column (Source 15Q from Pharmacia, size: 1.0 cm ID × 7.5 cm length) equilibrated with the same buffer. Bound proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0 to 0.5 M in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5; 160 mL at 1 mL.min⁻¹). Active fractions were eluted at 0.25 M NaCl. The latter were pooled and dialysed against 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 30% ammonium sulphate. The resulting sample was loaded on a hydrophobic interaction column (Phenyl Sepharose from Pharmacia, size: 1.0 cm ID × 28 cm length) equilibrated with the same buffer and elution was performed using a 30% to 0% linear gradient of ammonium sulphate in 20 mM potassium phosphate buffer (80 mL at 1 mL.min⁻¹) followed by a wash step (160 mL at 1 mL.min⁻¹). The active fractions were pooled, dialysed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and finally loaded on a second anion exchange column (Uno Q1R from Bio-Rad, size: 0.7 cm ID × 3.5 cm length) and eluted with a linear gradient of NaCl (0 to 0.5 M in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5; 20 mL at 0.5 mL.min⁻¹). All chromatographic steps were performed at room temperature. The *P. abyssi* AP purified in that manner was dialysed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, concentrated to approximately 1 mg.mL⁻¹ using an Amicon YM-10 Centricon protein concentrator (Millipore) and stored at 4°C. The purity was checked by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using the method of Laemmli [Laemmli, 1970]. Specific activity of the so obtained AP was found to be 8.2 × 10³ U.mg⁻¹. Protein samples for SDS-PAGE were prepared by heating for 10 min at 95°C in a 4:5 ratio volume of sample buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 2% SDS (wt:vol), 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 25% glycerol (vol:vol) and 1% bromophenol blue (wt:vol)). Proteins were

visualised by staining with Coomassie brilliant blue. Wild-type *E. coli* AP, prepared as previously described [Chaidaroglou *et al.*, 1988], was used as a molecular mass standard.

Alkaline phosphatase assay and protein determination- The standard assay for alkaline phosphatase activity was carried out at 70°C, for 5 min, using 2.5 mM *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP, Sigma Chemical Co.) as substrate in 200 mM Tris-HCl buffer, pH 10.0, containing 1 mM MgCl₂, unless otherwise indicated. The release of *p*-nitrophenol in the reaction mixture was continuously monitored spectrophotometrically at 410 nm using a Beckman DU64 spectrophotometer, over the linear period. Enzyme and substrate blanks were also included. 1 U of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of *p*-nitrophenol from *p*NPP in one minute. A molar absorptivity of 18,300 M⁻¹.cm⁻¹ was used for *p*-nitrophenolate. Protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm. For routine activity assays, 5 to 10 μg of purified AP, contained in a maximum volume of 20 μL, was added to the 1.5 mL reaction mixture. Each value is the mean of at least three determinations.

Secondary and quaternary structure analysis- Native gel electrophoresis was performed using 4-12% gradient polyacrylamide minigels (Bio-Rad) or using regular 12% polyacrylamide minigels, both containing Tris-HCl at pH 8.8. Samples were added in 4:5 ratio (vol:vol) to native electrophoresis buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 25% glycerol (vol:vol) and 1% bromophenol blue (wt:vol)). Native gels were run at 50 mA. The gel profiles were not significantly different whether the gels were run at 4° or 25° C. Proteins were observed after staining with Coomassie brilliant blue. Wild-type *E. coli* AP was used as a standard.

Circular dichroism spectra were collected using an Aviv Circular Dichroism spectrometer Model 202. Data were recorded within the 190-260 wavelength range on 2 mL samples containing 35 μg of protein in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, at 25°C.

Size exclusion chromatography experiments were performed using a Bio-Prep SE100/17 from Bio-Rad, calibrated using a commercial standard mix (from Bio-Rad). The calibration curve showed an R² > 0.95. Samples containing approximately 0.3 mg of purified AP were loaded and eluted using 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5.

The molecular weight was also estimated by sucrose-density gradient sedimentation. 200 μL of protein solution, 1 mg.mL⁻¹ purified AP solution or standards at various concentration (see below), were layered on top of 4.6 mL 6%-25% (wt:vol) sucrose gradients. Buffers used to

form the sucrose gradients were 50 mM potassium phosphate, pH 8.0, or 50 mM Tris-HCl buffer, at the same pH. When the loaded sample was an EDTA-treated AP, EDTA was added to the gradients to a final concentration of 10 mM. Sedimentation was performed using a Beckman L70 ultracentrifuge employing a SW55Ti rotor. The gradients were centrifuged at $167,000 \times g$ for 18 h at 10°C and decelerated with no brake. After centrifugation, each sucrose gradient was fractionated. Briefly, a 40% (wt:vol) sucrose solution, containing 1% (wt:vol) of bromophenol blue was injected at $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ into a Brandel BR-9620 fractionator by pump. The sucrose gradient was pumped from the fractionator to a UV detector (Gilson Model 112) to monitor changes in absorbance at 280 nm. The end of gradient collection corresponded to the increase in absorbance caused by the presence of bromophenol blue. Standards used to analyse the results were: carbonic anhydrase (CA, 29 kDa, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), bovine serum albumin (BSA, 66 kDa, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and wild-type *E. coli* AP (94 kDa, $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Metal removal and reactivation of EDTA-treated AP- Removal of the metals from purified AP was performed using an EDTA procedure. A solution of 0.5 M EDTA, pH 8.0, was added to the purified AP solution to a final concentration of 10 mM; the mixture was heated at various temperatures for 20 min. EDTA was removed from the solution by two 24-hr dialysis steps against the original buffer, namely 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, or 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Each dialysis was performed at 4°C, and the dialysis volume was at least one thousand-fold higher than the sample volume.

EDTA-treated AP in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, was used in reactivation experiments. The EDTA-treated AP was incubated at 70°C for 20 min in the presence of 10 mM of various metals (MgCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2) or a combination of two metals (10 mM/10 mM) of ($\text{MgCl}_2/\text{CoCl}_2$, $\text{MgCl}_2/\text{ZnCl}_2$, $\text{CoCl}_2/\text{ZnCl}_2$). Incubations were performed in a final volume between 25 μL to 50 μL . EDTA-treated AP was incubated without metals as a parallel control. Metal salt ions were purchased from Sigma Chemical Co.

RESULTS

pH and buffer: key parameters for structure stability- Samples of purified *P. abyssi* AP were dialysed against different buffers, extending over a pH range from 4.0 to 10.0, and then analysed by native PAGE (Figure V.1). The sample dialysed in the most acidic buffer (50 mM sodium acetate, pH 4.0) exhibited a majority of the monomeric form (Figure V.1, lane 1). The amount of dimeric form increased with increasing pH (Figure V.1, lanes 2-6).

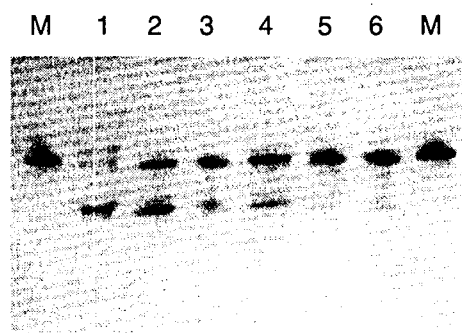


Figure V.1. pH and buffer effects on *P. abyssi* AP. 4%-20% polyacrylamide native PAGE analysis showing purified *P. abyssi* AP after dialysis against various buffers: 1- 50 mM acetate buffer, pH 4.0; 2- 50 mM citrate buffer, pH 5.5; 3- 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5; 4- 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0; 5- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 6- 50 mM Tris-HCl, pH 10.0. Lanes M show *E. coli* AP. Proteins were visualised by staining with Coomassie blue.

The distribution between the monomeric and dimeric form was not dependent exclusively on pH. For example, different quaternary structures were observed in two different buffers at the same pH (50 mM potassium phosphate and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). In potassium phosphate buffer, both the monomeric and dimeric forms were present (Figure V.1, lane 4), whereas in Tris-HCl buffer, only the dimer was observed (Figure V.1, lane 5). In addition, circular dichroism (CD) analysis highlighted differences in the secondary structure depending on the enzyme storage buffer. CD spectra of purified AP in Tris-HCl and potassium phosphate buffers (Figure V.2; traces 1 and 3, respectively) showed significantly different profiles, indicating buffer-induced secondary structure modifications.

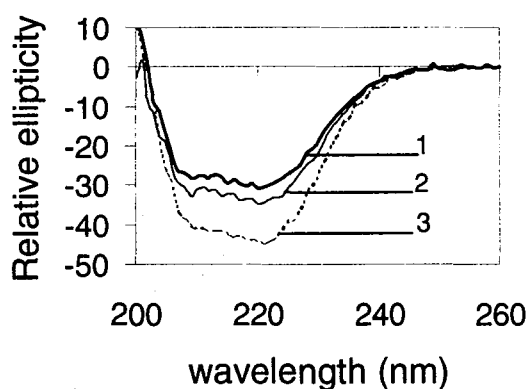


Figure V.2. Circular dichroism spectra of *P. abyssi* AP. 1- purified AP in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, 2- EDTA-treated AP, 3- purified AP in 50 mM potassium phosphate buffer pH 8.0.

Reversibility of the buffer-related phenomenon described above, was tested by dialysing a sample of purified AP in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, against 10 to 250 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0. No monomer formation was observed by a simple switch of buffers, at any concentration of buffer used (Figure V.3A). However, heating these samples at 70°C for 20 min resulted in small amounts of the monomeric form in 100 and 250 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0 (Figure V.3B, lanes 4 and 5). The storage buffer effect appeared irreversible. As a result, the *P. abyssi* AP conformation observed in Tris-HCl, pH 8.0, seemed much more stable than the one observed from the enzyme purification in potassium phosphate buffer.

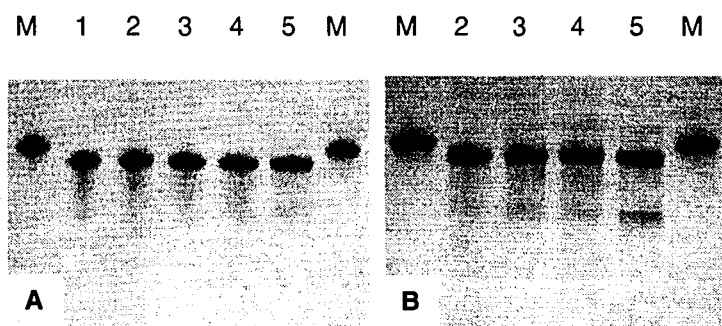


Figure V.3. Reversibility of the Tris-HCl buffer effect. **Gel A:** 4%-20% polyacrylamide native PAGE analysis showing purified *P. abyssi* AP in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, before (lane 1) and after dialysis against various concentrations of potassium phosphate buffer, pH 8.0: 2- 10 mM; 3- 50 mM; 4- 100 mM; 5- 250 mM. **Gel B:** 4%-20% polyacrylamide native PAGE analysis showing samples from gel A after a 20 minute incubation at 70°C. Lanes M show *E. coli* AP. Proteins were visualised by staining with Coomassie blue.

Attempts to separate the two quaternary structures- In order to determine whether the mixture of forms observed by native gel electrophoresis (Figure V.1, lane 4) was the result of two distinct and stable forms in solution or of an equilibrium between the monomer and the dimer, samples were analysed by size-exclusion chromatography and sucrose-density gradient sedimentation. For purified AP in potassium phosphate and in Tris-HCl buffer, size-exclusion chromatography showed single peaks with a molecular weight estimated at 92 kDa and 101 kDa, respectively (data not shown). Sucrose-density gradient sedimentation experiments also showed single peaks (Figure V.4A0 and Figure V.4B0). Molecular weights were calculated from the standard calibration curves: purified AP in potassium phosphate buffer was found to be 92 kDa (Figure V.4A0, trace 4), whereas the molecular weight of purified AP in Tris-HCl was estimated to be 98 kDa (Figure V.4B, trace 4). Moreover, subsequent native PAGE analysis of the active fractions, from the size-exclusion chromatography and sucrose-density

gradient sedimentation, showed that the monomer and the dimer (in the case of purified AP in potassium phosphate buffer) were not separated: both forms eluted or sedimented in the same fractions (Figure V.4A1).

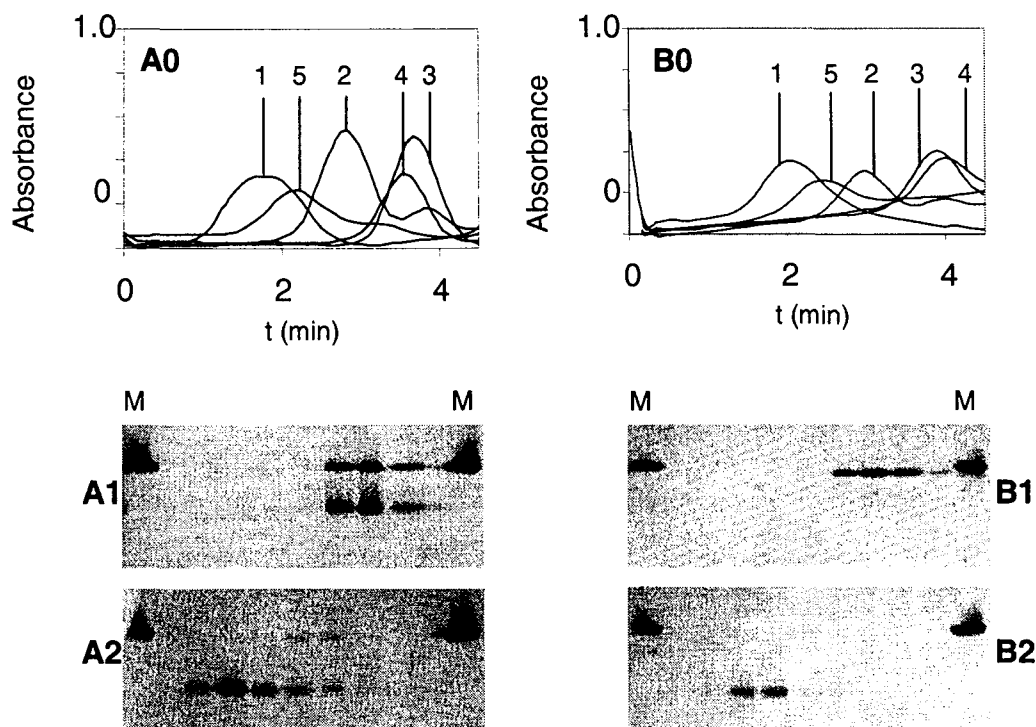


Figure V.4. Traces from the sucrose-density gradient sedimentation experiments. Samples were loaded on 6%-25% sucrose gradients in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0 (A0) or in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 (B0). Standards used are shown in traces: 1- carbonic anhydrase (29 kDa), 2- bovine serum albumin (66 kDa), 3- *E. coli* AP (94 kDa). Analysed samples correspond to traces: 4- *P. abyssi* AP, and 5- EDTA-treated *P. abyssi* AP. Native PAGE profiles are also shown in the samples corresponding to traces 4 (A1, in potassium phosphate buffer; B1, in Tris-HCl buffer) and traces 5 (A2, in potassium phosphate buffer; B2, in Tris-HCl buffer). Proteins were visualised by staining with Coomassie blue.

Removal of the metals promotes monomer formation- Purified AP in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, or in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, was incubated in the presence of 10 mM EDTA at various temperatures for 20 min. Samples were then analysed by native PAGE (Figure V.5). EDTA appeared to have a strong influence on the quaternary structure, promoting monomer formation, in both buffers tested. The rate of monomer formation by EDTA treatment appeared temperature-dependent. As the temperature increased, the dimer disassembled; at 21°C there was a small monomer band while at 70°C almost pure monomer was observed. This phenomenon was more pronounced in Tris-HCl (Figure V.5, lanes 5-8) than in potassium phosphate buffer (Figure V.5, lanes 1-4) where approximately half of the

enzyme was monomeric at 21°C. Comparison of lanes 1 and 2 and of lanes 5 and 6 shows that the monomeric and dimeric forms of EDTA-treated enzyme appeared to migrate a little faster than the native forms of AP, whatever the buffer used. This behaviour may be the result of the metal loss which would alter the charge of both forms.

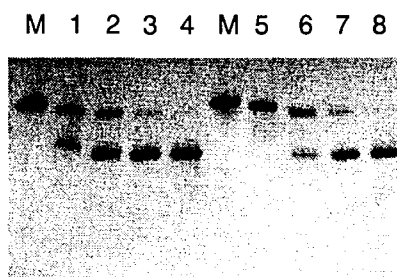


Figure V.5. Influence of EDTA on the *P. abyssi* AP. 4%-20% polyacrylamide native PAGE analysis showing purified *P. abyssi* AP in: lanes 1 to 4, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0; lanes 5 to 8, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. AP was incubated in the presence of 10 mM EDTA for 20 minutes at: lanes 2 and 6, 21°C; lanes 3 and 7, 50°C; lanes 4 and 8, 70°C. Lanes M show *E. coli* AP. Proteins were visualised by staining with Coomassie blue.

EDTA-treated AP was also analysed by sucrose-density gradient sedimentation. Samples were sedimented in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, both containing 10 mM EDTA. In both cases, the EDTA-treated AP sedimented much more slowly than the native *P. abyssi* AP (Figure V.4A0 and Figure V.4B0, traces 5). The molecular weight of EDTA-treated AP was estimated at 47 kDa in potassium phosphate (Figure V.4A0, trace 5) and 39 kDa in Tris-HCl (Figure V.4B0, trace 5). When analysed by native PAGE, the AP from the sucrose gradient fractions migrated identically, whatever the buffer used for the experiment (Figure V.4A2 and Figure V.4B2). Based upon SDS-PAGE, the EDTA-treated AP and native AP exhibited a molecular weight of approximately 52 kDa, whatever the buffer used (data not shown).

Native and EDTA-treated AP was analysed by circular dichroism. Although the data were not good enough to analyze percentage changes in secondary structural types, these data highlight some interesting trends. The CD spectra indicated slight changes in secondary structure when metals were removed (Figure V.2, traces 1 and 2). Indeed, after the EDTA/heating treatment, AP gained some secondary structure. These traces showed that removing the metals did not induce a major change of the secondary structure of the AP. The global structure of the native and EDTA-treated AP were conserved.

Metals induce partial reactivation and dimer formation of the EDTA-treated AP- Metal-free AP produced by EDTA treatment was extensively dialysed against the original buffer (potassium phosphate or Tris-HCl) to remove the metal chelator. A small degree of re-dimerisation was observed and two differently charged monomeric forms appeared (Figure V.6, lane 1). Removal of the metals from *P. abyssi* AP had a strong influence on enzyme activity. Enzyme activity was only 0.1% of the original activity (Table V.1).

Reactivation of the metal-free enzyme was attempted using $MgCl_2$, $CoCl_2$ and $ZnCl_2$, or two-metal combinations, and achieved with variable efficiency (Table V.1). The best reactivation was obtained by incubating the EDTA-treated AP in the presence of $MgCl_2$ or in a combination of $MgCl_2/CoCl_2$ whereupon 71.6% and 72.2% of the original activity were recovered, respectively. The lowest reactivation was found using $ZnCl_2$ alone, with which 32.9% of activity was recovered. Samples of these reactivated enzymes were analysed by native PAGE (Figure V.6). Before incubation in the presence of metals, metal-free AP was almost completely monomeric. No matter which metals were used (single or in combination), partial re-dimerisation occurred. The highest degree of re-dimerisation corresponded to samples that were incubated in the presence of $ZnCl_2$ (Figure V.6, lanes 4, 6 and 7), even though these samples were not the most active (Table V.1).

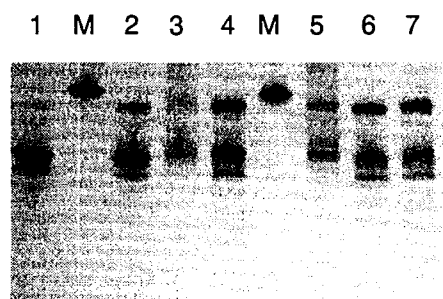


Figure V.6. Reactivation of the EDTA-treated AP. 4%-20% polyacrylamide native PAGE analysis showing the EDTA-treated *P. abyssi* AP after incubation in the presence of various metals. Metal-free AP was produced using the EDTA. Lane 1, EDTA-treated enzyme; lane 2, after incubation in the presence of $MgCl_2$; lane 3, $CoCl_2$; lane 4, $ZnCl_2$; lane 5, $MgCl_2/CoCl_2$; lane 6, $MgCl_2/ZnCl_2$; lane 7, $CoCl_2/ZnCl_2$. Lanes M corresponds to *E. coli* AP. Proteins were visualised by staining with Coomassie blue.

Sample	Relative specific activity (%) ^a
Purified <i>P. abyssi</i> AP	100
EDTA-treated AP	0.09
EDTA-treated AP incubated in the presence of ^b :	
$MgCl_2$	71.6 ^c
$CoCl_2$	44.6
$ZnCl_2$	32.9
$MgCl_2/CoCl_2$	72.2
$MgCl_2/ZnCl_2$	58.1
$CoCl_2/ZnCl_2$	50.1

Each value is the mean of three determinations. ^a: 100% corresponds to the specific activity of the purified AP in Tris buffer assayed with no metals added to the reaction mixture; the value is $2.75 \times 10^3 \text{ U.mg}^{-1}$. ^b: 10mM of each metal ion salts were used in this procedure. ^c: Standard deviations were < 5% except for the value with a ^c (5% ≤ standard deviation < 10%).

Secondary structure elements: conservation of the core of the AP- The deduced amino acid sequences of *P. abyssi* and *E. coli* APs are compared in Figure V.7. The core of *E. coli* AP is composed of a ten-stranded β -sheet. These strands, named A through J, are parallel, except strand i which is antiparallel [Kim & Wyckoff, 1989]. The alignment shows that these secondary structure elements are variably conserved in the *P. abyssi* AP sequence. From 20% to 71% of the amino acid residues are strictly conserved, except in strand i which contains no identical residues. A range from 33% to 100% of amino acid similarity between the two sequences is observed throughout the ten strands. This highlights considerable conservation of the core structure found between the *P. abyssi* and *E. coli* enzymes. Also shown in Figure V.7 are the patterns involved in the *E. coli* dimer interface [Poltorak *et al.*, 1999a; Poltorak *et al.*, 1999b]. Unlike the strands of the central β -sheet, these patterns appear poorly conserved. Most of them are partially or completely deleted on *P. abyssi* AP sequence. One of these patterns contains a 64 amino-acid insertion.

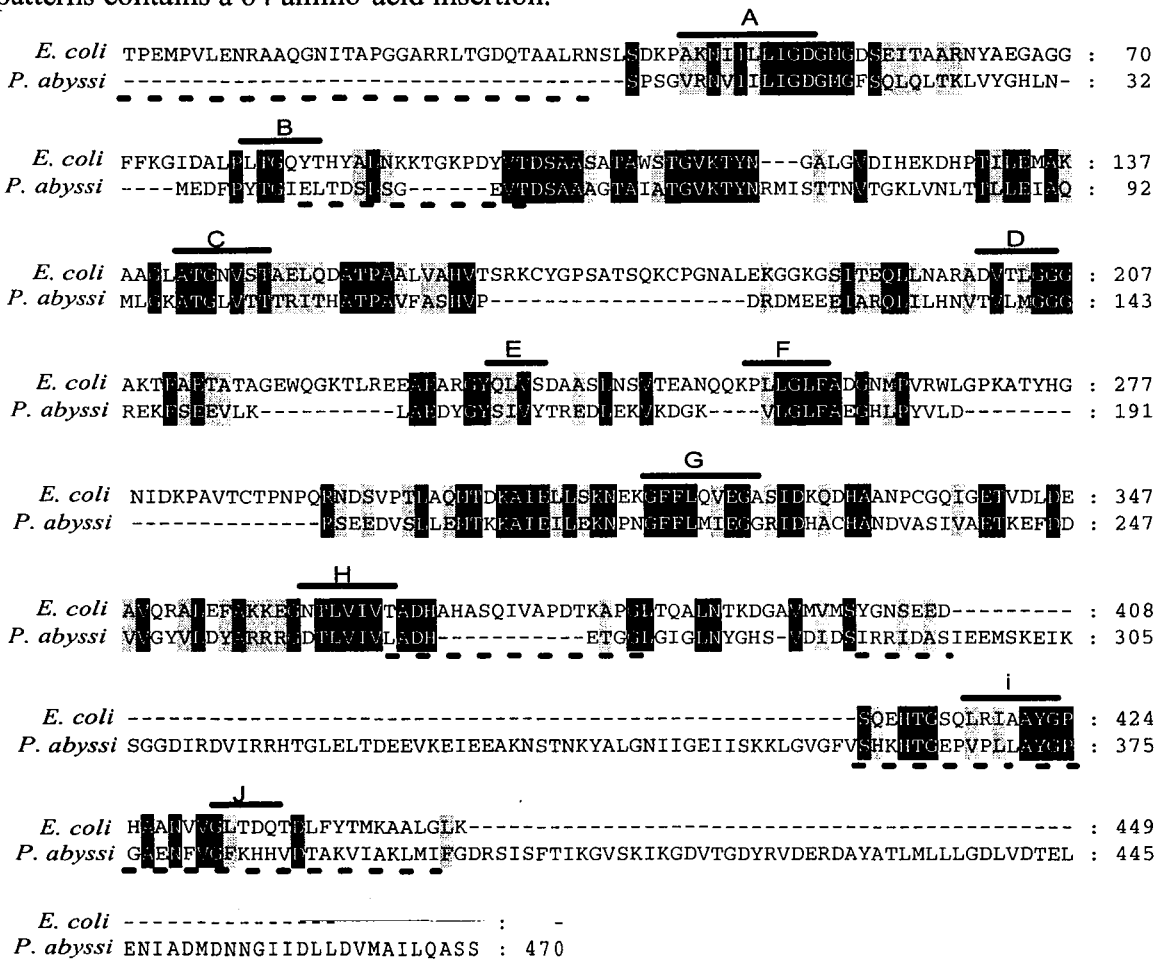


Figure V.7. Alignment of the deduced amino acid sequences of *P. abyssi* AP (pir, E75081) and *E. coli* AP (pir, PAECA). Above the alignment and named A through J are shown the ten strands involved in the central β -sheet of the *E. coli* AP [Kim & Wyckoff, 1989]. Dashed lines below the alignment show the patterns involved in the *E. coli* dimer interface [Poltorak *et al.*, 1999a; Poltorak *et al.*, 1999b]. Strictly conserved and similar residues are highlighted in black and grey, respectively. Numbering of the sequences is given for mature APs. Alignments were performed using the GAP program (Genetics Computer Group Wisconsin Package) in pairwise comparison.

DISCUSSION

In a previous work, *P. abyssi* AP appeared to have two active forms: a monomer and a homodimer [Zappa *et al.*, 2001]. The purpose of the present study was to verify that *P. abyssi* AP can exist as a monomer and to determine whether this monomeric form has catalytic activity. A large part of this work was aimed at determining parameters which govern the stability of the dimer. In fact, the monomeric form was only observed under certain conditions. One of these was at low pH. Influence of the pH on AP quaternary structure has been long known for the *E. coli* enzyme [Schlesinger & Barrett, 1965; Schlesinger, 1965; Applebury & Coleman, 1969]. However, the *E. coli* AP dimer disassembles at pH 3.5 and below, whereas the *P. abyssi* AP was almost completely monomeric at pH 4.0. The lower pH required to destabilise the *E. coli* dimer suggests that the *P. abyssi* AP may have a weaker interface than the *E. coli* enzyme. Moreover, *P. abyssi* AP was found to be inactive at low pH [Zappa *et al.*, 2001].

In addition to the pH influence, the quaternary structure of the AP appeared strongly dependent on the buffer used. The purification procedure involved different concentrations of potassium phosphate buffer. As a result, purified *P. abyssi* AP was obtained in this buffer and appeared on native PAGE as two forms. Switching the storage buffer from potassium phosphate to Tris-HCl resulted in a large change of quaternary structure, promoting dimer formation. CD analysis showed significant differences in secondary structures, depending upon the buffer. Thus, the presence of inorganic phosphate has a global effect on the whole enzyme. Inorganic phosphate bound to the active site may change its conformation. As the active site residue His412 is close to the interface between the two subunits, the local conformational change may weaken the interface between the two monomers.

The last parameter that was found to be strongly involved in dimer stability was the presence of metals. The metal requirement for activity in *P. abyssi* AP was previously shown: EDTA and EGTA, when added to the assay reaction mixture inhibited 95% of the activity, and moreover, addition of MgCl₂, CoCl₂, ZnCl₂ to the assay increased the enzyme activity two-fold [Zappa *et al.*, 2001]. Moreover, metal-binding residues in the active site of *P. abyssi* AP were found to be highly conserved as compared to other APs [Zappa *et al.*, 2001]. However, the metal content of *P. abyssi* AP *in vivo* is not known. In the present study, additional information was obtained about the metal influence on the structure of the enzyme, using an EDTA-treated AP. Loss of metals induced inactive monomer formation, as was established

both by native gel analysis and by sucrose-density gradient sedimentation. A similar result has been reported for bovine intestinal AP [Bortolato *et al.*, 1999], unlike *E. coli* AP which was found to stay dimeric when its metals were removed [Reynolds & Schlesinger, 1967]. Incubation of EDTA-treated AP with various metals resulted in partial reactivation (up to 72.2% of the original activity) and dimer formation. Reactivation of apoAP has already been attempted using APs from other organisms. About 90% of the *Thermotoga neapolitana* apoAP activity was restored by the addition of Mg(II), Zn(II) or Mn(II), and, about 170% of the original activity was obtained using Co(II) or a Co(II)-Mg(II) combination [Dong & Zeikus, 1997]. Reactivation of the apoAP was also achieved with the phylogenetically related AP from *Thermotoga maritima* [Wojciechowski *et al.*, 2002]. Mg(II), Zn(II) and Co(II) were found for reactivation of *Gadus morhua* AP [Ásgeirsson *et al.*, 1995]. Only 5% of the original activity was restored by the addition of Zn²⁺ and Mg²⁺ to metal-depleted bovine intestinal AP [Bortolato *et al.*, 1999]. Reactivation of apoAP has rarely been studied in terms of quaternary structure, but some relevant data are known about *E. coli* AP. Indeed, Zn²⁺ is essential for the assembly of the dimer from folded metal-depleted monomers [Schlesinger & Barrett, 1965; Reynolds & Schlesinger, 1967] and was found to stabilise the quaternary structure of *E. coli* AP [Martin *et al.*, 1999]. In the present work, Zn²⁺ was found to be effective in promoting the formation of the dimeric structure. In terms of catalytic activity, Zn²⁺ did not reactivate *P. abyssi* AP fully. Higher levels of reactivation may have been observed if higher concentrations of metals were used. Indeed, sequence analysis showed a presumed “mammalian active site”, that is to say with two histidine residues as Mg²⁺ secondary ligands [Zappa *et al.*, 2001]. In this type of active site, the Mg²⁺ binding site has more affinity for Zn²⁺ than for Mg²⁺, and Zn²⁺ in excess inhibits AP activity [Murphy & Kantrowitz, 1994]. Thus, a few conditions which promote monomer stability in solution were established. However, these conditions are rather extreme (low pH, no metal) and result in an inactive monomer. This does not provide an answer to the problem that was raised by the observation that the monomer exhibited activity on native PAGE when stained with an enzyme substrate [Zappa *et al.*, 2001]. In order to solve this issue, experiments were carried out to isolate the monomer from the dimer. Neither size-exclusion chromatography nor sucrose-gradient sedimentation were effective in the separation of the two forms. Potassium phosphate and Tris-HCl buffers were used, promoting the mixture of the two forms and the dimeric form, respectively. Both gave a single peak in the vicinity of the dimer molecular size, and these peaks contained active enzyme (data not shown). Indeed, when analysed by native PAGE, purified AP in potassium phosphate buffer appears as a 1:1 ratio of monomer and dimer

forms. By running this sample on size-exclusion chromatography or sucrose-gradient, two peaks, monomer and dimer, were expected in the case of a slow equilibrium between the two forms; whereas one peak between the monomer and the dimer was expected in the case of a rapid equilibrium between the two forms. In the case of the mixture of two distinct and stable species, two separate peaks would be expected. However, the purified AP sample gave a single active peak at 92 kDa, which is close to the dimer size, although its fractions appeared as a 1:1 ratio of the monomeric and dimeric forms by native PAGE. As a result, purified AP in potassium phosphate buffer behaved differently depending upon whether it was in solution or run on a native gel. The electrophoresis seems to induce a monomer formation of the purified AP in potassium phosphate. Therefore, the activity previously observed for the monomer by activity staining may be the result of dimer formation within the gel during activity staining. Indeed, despite the presence of Tris in the electrophoresis process, purified AP in phosphate buffer migrates as two band. This implies that additional factors such as time, temperature and pH are required to achieve maximal dimerisation. Moreover, the activity staining procedure involves utilizes a specific set of conditions (pH 10.0 at 70°C during 20 minutes) that most likely enhances dimer formation and the observation of catalytic activity.

Sequence analysis was used in order to better understand the structure of *P. abyssi* AP. Comparison of the *E. coli* and *P. abyssi* AP sequences showed a global conservation of the core of the enzyme, i.e. the central ten-stranded β -sheet. In addition, these ten strands, named A through J in the sequence order, are actually in the following physical order: J-B-i-H-A-G-C-D-F-E. Thus, it is interesting to notice that the centre of the β -sheet, H-A-G-C strands, shows an average of 69% strictly conserved residues, whereas the outer-strands of the sheet, J-B-i and D-F-E, have only 18% and 47% strictly conserved sites, respectively. The conservation is more pronounced in the centre of the monomer subunit, corresponding to the core of the molecule, than for the outer-strands. Similar data have already been found for other APs from *Bacillus subtilis* [Hulett *et al.*, 1991] and from mammals [Kim & Wyckoff, 1989; de Backer *et al.*, 2002]. This analysis tends to provide evidence that the global secondary structure of *P. abyssi* AP and *E. coli* enzymes are likely to be similar. However, further structural studies are needed to confirm if the topology of the central β -sheet is actually conserved.

The sequence comparisons also revealed that between the H370 and H412 residues, *P. abyssi* AP has 51 more amino acids than *E. coli* AP. *Vibrio* sp. AP has 107 more residues than *E.*

coli AP in the same area. This inserted loop was used as an argument to explain the monomeric nature of *Vibrio* sp. AP [Ásgeirsson & Andrésón, 2001]. The smaller loop observed in *P. abyssi* AP may also weaken the dimer interface.

CONCLUSION

The purpose of the present work was to determine the conditions which stabilise the structure of *P. abyssi* AP and to investigate the possible catalytic activity of the monomeric form, as previously observed using native gel electrophoresis. No monomeric *P. abyssi* AP with catalytic activity could be isolated. We suggest that the activity observed for the monomer in the PAGE gels arises from dimer formation in the monomer band of the gel matrix, when the latter was incubated in the buffer used for the activity measurements. Moreover, the pure dimer obtained by switching the storage buffer from potassium phosphate to Tris-HCl appeared very stable, as the process was irreversible. Therefore, *P. abyssi* AP is likely to be homodimeric, as the large majority of other APs characterised up to now. The results of the present work have determined conditions that stabilise the homodimeric structure of *P. abyssi* AP. These data should be useful for achieving crystallisation of the enzyme in order to accomplish a definitive determination of the structure.

Acknowledgements. This work was supported by the Biotechnology Program grant 98 C 0173 from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, France, and by the grant GM42833 to Evan R. Kantrowitz from the National Institutes of Health, U. S. A. We would like to thank Dr. E. Pastra-Landis for critical reading of the manuscript.

Conclusion

Les résultats préliminaires concernant la structure quaternaire de la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi* avait montré l'existence d'une forme monomérique active. Conscients de l'intérêt que pouvait constituer une phosphatase alcaline monomérique active pour la compréhension de la « complémentation intragénique », nous avons tenté d'isoler cette forme. Au début de ces travaux, l'activité de la forme monomérique n'avait été observée que sur gel natif. Sa séparation de la forme dimérique a été appréhendée par chromatographie d'exclusion de taille et par sédimentation sur gradient de saccharose.

La phosphatase alcaline de *P. abyssi* a été produite sous forme de protéine recombinante chez *E. coli*, et purifiée en présence de tampon phosphate. Malgré la présence de deux formes sur gel natif, les deux techniques de séparation utilisées n'ont permis de mettre en évidence que la forme dimérique en solution. Il semble ainsi que la forme présumée monomérique, observée sur gel, n'apparaisse que lors de l'électrophorèse. De plus, ce phénomène s'est avéré dépendant du tampon d'incubation de l'enzyme. Par un simple changement de tampon, en Tris-HCl, la forme monomérique disparaît et seule le dimère est visible à la fois sur gel natif et en solution. Cette influence du tampon est irréversible : le passage du Tris-HCl vers le tampon phosphate ne permet pas de retrouver la forme monomérique sur gel natif. Il semble ainsi qu'en Tris-HCl la phosphatase alcaline de *P. abyssi* présente une structure quaternaire à la fois homogène et stable. A l'opposé, lors de sa maturation en présence de tampon phosphate, l'enzyme possède une conformation plus sensible aux conditions d'électrophorèse et au changement de tampon d'incubation.

La différence entre les conformations en tampon phosphate et en Tris-HCl n'a pas été précisément déterminée. Cependant, la variation de la valeur du poids moléculaire de la forme dimérique en fonction du tampon indique une mobilité différente dans la matrice de la colonne de chromatographie d'exclusion de taille et dans le gradient de saccharose lors de la séparation par ultracentrifugation. Cette mobilité variable, de la part d'une molécule dont le poids moléculaire est constant, pourrait être la signature d'un volume et d'une forme moléculaires différents selon le tampon d'incubation utilisé. De même, les spectres de dichroïsme circulaire réalisés en fonction du tampon d'incubation montre une organisation des structures secondaires différentes.

Au cours de ces travaux, aucun monomère actif de phosphatase alcaline n'a donc pu être isolé. Seuls des monomères inactifs ont été obtenus : à pH acide, ou après traitement à l'EDTA. Le pH et la présence des métaux se sont en effet avérés être des facteurs de stabilisation à la fois de l'activité enzymatique, mais aussi de la structure dimérique.

A partir de tous ces éléments, nous avons formulé l'hypothèse que l'activité de la forme monomérique observée sur gel était un artefact dû à la dimérisation des monomères dans le gel lors de test d'activité. En effet, ce dernier est réalisé dans des conditions favorisant la structure dimérique. En outre, nous avons été amenés à conclure que, en dépit des travaux préliminaires sur la structure quaternaire de l'enzyme, l'homodimère est l'unique forme active de la phosphatase alcaline de *P. abyssi*.



PARTIE VI

EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE *PYROCOCCUS ABYSSI*

Zappa, S., Hasche, A. & Boudrant, J. (2002) Expression of *Pyrococcus abyssi* Recombinant Alkaline Phosphatase: Influences of *Escherichia coli* Rare Codons and Secretion by the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. Manuscrit soumis pour publication dans *Enzyme and Microbial Technology*.

SOMMAIRE DE LA PARTIE VI

<i>Avant-propos</i>	125
ARTICLE : "Expression of <i>Pyrococcus abyssi</i> Recombinant Alkaline Phosphatase: Influences of <i>Escherichia coli</i> Rare Codons and Secretion by the Methylophilic Yeast <i>Pichia pastoris</i> "	126
ABSTRACT.....	126
INTRODUCTION.....	127
MATERIALS AND METHODS.....	128
Organisms and growth conditions.....	128
Construction of <i>E. coli</i> cells expressing <i>P. abyssi</i> AP.....	129
Expression by <i>E. coli</i> cells and partial purification of <i>P. abyssi</i> AP	129
Construction of <i>Pc. pastoris</i> cells expressing <i>P. abyssi</i> AP	129
Expression of <i>P. abyssi</i> AP by <i>Pc. pastoris</i> cells	130
Alkaline phosphatase assays and protein analysis	131
RESULTS AND DISCUSSION.....	132
<i>P. abyssi</i> AP intracellular expression using <i>E. coli</i> cells.....	132
<i>P. abyssi</i> AP secretion using <i>Pc. pastoris</i> cells.....	134
ACKNOWLEDGMENTS.....	137
CONCLUSION.....	138

AVANT-PROPOS

Les parties IV et V ont permis d'obtenir des données d'ordre biochimiques et enzymologiques sur la phosphatase alcaline de *Pyrococcus abyssi*. Ces travaux ont été menés sur l'enzyme recombinante produite chez *E. coli*. Bien qu'un faible taux d'expression a été observé, les lignées bactériennes obtenues ont pu produire une quantité de protéine recombinante suffisante pour réaliser les expériences souhaitées. Cependant, cette enzyme présente divers intérêts à la fois d'un point de vue fondamental que pour des applications pratiques : (i) elle est la seule phosphatase alcaline issue d'un Archaea hyperthermophile décrite à ce jour, (ii) sa grande thermostabilité laisse supposer une structure intéressante, (iii) elle peut déphosphoryler des fragments d'ADN linéaires. C'est pourquoi, disposer de cette enzyme en plus grande quantité permettrait d'envisager de nouvelles pistes d'étude telles que sa cristallisation ou le développement de sa production dans une optique biotechnologique.

La dernière partie de cette thèse présente une étude de l'expression de la phosphatase alcaline recombinante de *P. abyssi*. Cette étude a été réalisée à l'aide de deux systèmes : la bactérie *E. coli* et la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*.

L'expression chez *E. coli* a été étudiée afin de déterminer l'influence de la co-expression d'ARNt relatifs aux codons rares chez la bactérie, mais qui sont très représentés chez les Archaea. Cet aspect avait été évoqué dans la partie III. La production de la phosphatase alcaline recombinante par *Pc. pastoris* a été envisagée pour plusieurs raisons : (i) possibilité de faire sécréter la protéine recombinante, (ii) usage des codons différents de celui d'*E. coli*, (iii) possibilité d'étudier l'influence de la glycosylation sur l'enzyme, (iv) *Pc. pastoris* est un système d'expression eucaryote très simple à utiliser.

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, au sein du groupe de Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Les résultats sont présentés sous forme d'un article, soumis pour publication dans *Enzyme and Microbial Technology*.

Expression of *Pyrococcus abyssi* Recombinant Alkaline Phosphatase: Influences of *Escherichia coli* Rare Codons and Secretion by the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

Sébastien Zappa, Anja Hasche and Joseph Boudrant*

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

* Corresponding author

ABSTRACT

Alkaline phosphatases (APs) are non-specific phosphomonoesterases which are of interests for basic research as well as for practical applications. So far, *Pyrococcus abyssi* AP is the only AP which was isolated from a hyperthermophilic archaeon. In the present work, expression of this enzyme using mesophilic hosts was investigated. When *P. abyssi* AP was produced by *Escherichia coli* using the regulation of the T7 promoter, only 0.6 mg of recombinant enzyme per liter of culture were obtained. Using the same system with the co-expression of tRNAs related to the rare codons AGA, AGG and ATA, the expression level was 14-fold higher. The methylophilic yeast *Pichia pastoris* was also used to produce *P. abyssi* AP. A recombinant pPICZ α A was constructed in order to have the AP secreted in the culture medium. A *Pc. pastoris* cell line producing *P. abyssi* AP was studied in 1.2 liter working volume fermentor. Secretion was achieved with low expression yield but the recombinant enzyme appeared more active than when produced in *E. coli*.

INTRODUCTION

Thermostable proteins are of great interest for both basic research and industrial purposes. Mesophilic hosts are widely used as expression systems to produce recombinant thermostable proteins [Vieille & Zeikus, 2001]. Indeed, they present several advantages in comparison to their thermophilic counterparts, which these proteins are isolated from: (i) they are easier to cultivate, (ii) the recombinant protein can be purified up to 80% with a simple heat-treatment, (iii) the use of strong promoters can lead to good overexpression yields. Moreover, previous work in this field showed that, most of the time, thermostable proteins are properly folded when expressed in mesophilic hosts [Vieille & Zeikus, 2001]. As most of the hyperthermophilic micro-organisms belong to the third domain of life, the Archaea, most of thermostable proteins are of archaeal origin [Vieille & Zeikus, 2001]. Archaea are not phylogenetically more related to bacteria than to eucaryotes [Woese *et al.*, 1990]. Archaeal synthesis of proteins seems to contain both bacterial and eucaryotic mechanisms [van der Oost *et al.*, 1998]. Expression systems used to produce recombinant proteins have now been diversified (bacterial, yeast, plant, insect and animal cells) but no common archaeal expression system exists. As a result, thermostable proteins of archaeal origin are usually expressed in the mesophilic bacteria *Escherichia coli* [Vieille & Zeikus, 2001].

In the present work, we wanted to investigate the expression of an archaeal thermostable enzyme, namely *Pyrococcus abyssi* alkaline phosphatase (AP) [Zappa *et al.*, 2001], using two expression systems: the bacterium *Escherichia coli* and the yeast *Pichia pastoris*.

E. coli is the most commonly used expression system [Makrides, 1996], as it enables the overexpression of recombinant proteins under the regulation of a strong promoter, such as the T7 promoter. When using this system to express non-bacterial proteins, problems might arise during the translation because of codon usage [Kane, 1995] and after the translation (protein folding) [Makrides, 1996; Imamura *et al.*, 1999]. Previous work showed that *P. abyssi* AP retained its enzymatic function when expressed in *E. coli* [Zappa *et al.*, 2001]. In the present work, studies related to codon usage were performed. *P. abyssi* AP was expressed with or without the co-expression of tRNAs, related to the rare codons AGA, AGG and ATA.

The second expression system used in this work was the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. This had been shown to be an effective expression system, which combines eucaryotic post-translational modifications and requires simple experimental procedures which are similar to genetic manipulations and culture conditions of procaryotes [anonyme, 2000; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000]. Expression of recombinant proteins in *Pc. pastoris* is

generally achieved using the regulation of the AOX1 promoter, which is induced by methanol. *Pc. pastoris* enables the secretion of recombinant proteins in the culture medium and the achievement of various expression levels (from a few mg.L⁻¹ up to several g.L⁻¹) [anonyme, 2000; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000]. In this paper, the study of a *P. abyssi* AP expressing *Pc. pastoris* cell line is described: genetic construction, screening and expression in a 1.2 liter fermentor. To our knowledge, this work is the first example of an archaeal thermostable enzyme expressed by *Pc. pastoris*.

MATERIAL AND METHODS

Organisms and growth conditions- *E. coli* DH5 α and *E. coli* HMS174 (DE3) cells harboring pLysS, were used as the host strains for the recombinant plasmid pET9a (Promega) and for rare codon tRNA carrying plasmid pSJS1240 [Kim *et al.*, 1998]. Both cell lines were purchased from Novagen. *E. coli* strains were grown in 2 \times YT medium (Bactopeptone 16 g.L⁻¹, Yeast Extract 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹) on a rotary shaker at 37°C for various times. Kanamycin and spectinomycin were added to 2 \times YT to give a final concentration of 50 μ g.mL⁻¹ and 100 μ g.mL⁻¹, respectively. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM to induce recombinant AP gene expression [Ausubel *et al.*, 1998].

E. coli DH5 α cells were also used as the host strain for the recombinant plasmid pPICZ α A (Invitrogen) and were grown in Low Salt LB medium (tryptone 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹) on a rotary shaker at 37°C overnight. ZeocinTM (Invitrogen) was added to the medium to give a final concentration of 25 μ g.mL⁻¹. *Pc. pastoris* SMD1168H cells were used as host cells for the recombinant plasmid pPICZ α A. Media used to grow *Pc. pastoris* cells were: (i) YPD (yeast extract 10 g.L⁻¹, casein peptone 20 g.L⁻¹, D(+)glucose 20 g.L⁻¹), (ii) YPDS (YPD containing 1 M of D-sorbitol) containing 100 to 2000 μ g.mL⁻¹ of ZeocinTM, (iii) BMGY (yeast extract 10g.L⁻¹, casein peptone 20 g.L⁻¹, yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids 13.4 g.L⁻¹, 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.0, glycerol 12.5 g.L⁻¹), (iv) BMMY (BMGY with glycerol replaced by 1% methanol, vol:vol). All *Pc. pastoris* cell lines were cultivated at 30°C. Biomass versus OD₆₀₀ correlation used in this work was: biomass [g_{dry weight}.L⁻¹] = 0.4 \times OD₆₀₀.

Construction of *E. coli* cells expressing *P. abyssi* AP- The putative mature *P. abyssi* AP encoding gene was removed from pPabAP [Zappa *et al.*, 2001] by a *NdeI/BamHI* double digestion followed by purification of the 1,410 bp fragment from an agarose gel. This fragment was cloned in plasmid pET9a, purchased from Promega, using the same restriction sites. The pET9aAP recombinant plasmid was amplified using *E. coli* DH5 α cells and transformed into *E. coli* HMS174 (DE3), harboring pLysS, for expression experiments. In order to co-express rare codon tRNAs, pSJS1240 plasmid was transformed to *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pET9aAP. pSJS1240 encodes tRNA_{ATA} and tRNA_{AGA/AGG}, which are related to Ile and Arg, respectively [Kim *et al.*, 1998]. All steps were performed according to standard procedures [Ausubel *et al.*, 1998]. Using this strategy, the putative mature *P. abyssi* AP was produced in the cytoplasm of the host cell.

Expression by *E. coli* cells and partial purification of *P. abyssi* AP- For each clone, an overnight culture of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pET9aAP, was diluted 1:100 (vol:vol) in 50 mL of 2 \times YT medium and grown to an OD₆₀₀ of 1.2 to 1.4. Then, the culture was induced by the addition of IPTG, to a final concentration of 1 mM, and incubated overnight. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 5 mL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. After sonication, cell debris was removed by centrifugation (10,000 \times g for 10 min). The resulting supernatant was heated for 20 min at 80°C and precipitated proteins removed by a second centrifugation as described above. This supernatant, containing partially purified *P. abyssi* AP, was stored at 4°C before enzyme assays and protein analysis.

Construction of *Pc. pastoris* cells expressing *P. abyssi* AP- *P. abyssi* AP gene, of 1,410 bp, was isolated from the pET9aAP plasmid (described above), by a double digestion *NdeI/BamHI* followed by an extraction from an agarose gel. This fragment was used as a template for a polymerase chain reaction (PCR). The two primers, #1 and #2, containing *XhoI* and *XbaI* restriction sites (in bold), were as follows: #1 (5'-CTCTCGAGAAA**AGATCT**CCAAGCGGAGTCAG-3', sense) and #2 (5'-CTCTAGATCAAGAAGA**AGCTT**GGAGTATTGCC-3', antisense). Primer #1 was designed to remove the start codon at the beginning of the AP gene and add the C-terminal part encoding sequence of the α -factor, *Saccharomyces cerevisiae* signal peptide. This primer enabled the PCR product to be cloned in the frame of the α -factor of pPICZ α A plasmid

(Invitrogen) using the *Xho*I restriction site. Primer #2 was targeted to the stop codon of the AP gene, introducing the *Xba*I restriction site next to the stop codon. In addition to the template, the 50 μ L reaction mixture contained 100 pmol of each primer, 10 nmol of an equimolar dNTPs mix (Eurogentec S.A.), *Pfu* DNA polymerase buffer containing a final concentration of 2 mM $MgSO_4$ (Promega), and 1.5 U *Pfu* DNA polymerase (Promega). The mixture was subjected to 25 cycles of amplification (30 sec at 94°C, 30 s at 50°C and 3 min at 72°C), using a PCR device (i-cycler, Bio-Rad). A PCR product with the expected size was digested with *Xho*I and *Xba*I and cloned in the pPICZ α A vector, producing the recombinant plasmid pPICZ α AP, and transformed into *Pc. pastoris* SMD1168H using standard procedures [Ausubel *et al.*, 1998; *anonyme*, 2000]. Transformants were selected on a range from 100 to 2,000 μ g.mL⁻¹ of ZeocinTM to promote the screening of multiple gene insertion containing clones. Using this strategy, *P. abyssi* AP was secreted in the culture medium by the recombinant yeast.

Expression of *P. abyssi* AP by *Pc. pastoris* cells- 10 to 20 transformants were screened for extracellular AP activity and one of them was studied in small scale cultures. Briefly, these small scale cultures consisted of a first overnight culture of *Pc. pastoris* cells in 5 mL of YPD medium. Then, this culture was diluted 1:100 in 100 mL of BMGY medium and incubated at 30°C under continuous agitation (250 rpm) in an Erlenmeyer baffled flask. Cells were then harvested by centrifugation and resuspended in BMMY medium to give an OD₆₀₀ of 1. The culture was maintained for 96 additional hours and 100% methanol was added every 24h to give 0.5% (vol:vol) of the total culture volume.

Expression of recombinant *P. abyssi* AP using *Pc. pastoris* was scaled-up in 1.2 liter working volume fermentor cultures. A *P. abyssi* AP expressing *Pc. pastoris* clone was selected for the screening experiments and stored at -80°C. For fermentor cultures, this clone was first incubated in 5 mL of YPD medium overnight. This culture was diluted 1:100 in a 500 mL baffled flask containing 50 mL of BMGY medium and incubated overnight. Then, 5 mL of this second culture was added to 50 mL of fresh BMGY medium in a 500 mL baffled flask and incubated for 8 hours. Finally, a 2 liters benchtop fermentor (Biolafitte), containing 600 mL of BMGY medium, was inoculated with the last flask culture to give an OD₆₀₀ of 1.0-1.5. When dissolved oxygen concentration (DOC) increased suddenly, indicating that all the glycerol was consumed, 600 mL of BMMY medium were added in the fermentor and induction was maintained by the addition of 2% (vol:vol) of methanol when DOC rapidly

increased. pH was continuously adjusted at 6.0, using 32% ammonium hydroxide. Polypropylene glycol was used as the antifoam. DOC was kept above 20% by modulating agitation, between 800 and 1,000 rpm, and air flow rate, between 20 and 40 L.h⁻¹.

Alkaline phosphatase assays and protein analysis- *P. abyssi* AP activity from *E. coli* cell cultures was assayed using partially purified extract (described above), whereas *P. abyssi* AP activity from *Pc. pastoris* cell cultures was determined from the cell-free culture supernatant. The standard assay for alkaline phosphatase activity was carried out at 70°C, for 5 to 10 min, using 2.5 mM *para*-nitrophenylphosphate (*p*NPP, Sigma Chemical Co.) as substrate in 200 mM Tris-HCl buffer, pH 10.0, containing 1 mM MgCl₂. The release of *p*-nitrophenolate in the reaction mixture was continuously monitored spectrophotometrically at 410 nm using a DU 7500 spectrophotometer (Beckman), over the linear period. Enzyme and substrate blanks were also included. 1 U of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of *p*-nitrophenolate from *p*NPP in one minute. A molar absorptivity of 18,300 M⁻¹.cm⁻¹ was used for *p*-nitrophenolate. Specific activity, in the assay conditions, of *P. abyssi* AP produced by *E. coli* was calculated from previous purification and characterization studies [partie II : Zappa *et al.*, 2002] and found to be 8.2 × 10³ U/mg.

Protein samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the method of Laemmli [Laemmli, 1970]. Protein samples for SDS-PAGE were prepared by heating them for 10 min at 100°C in a 1:5 ratio volume of sample buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 2% SDS (wt:vol), 14.4 mM 2-mercaptoethanol (MCE), 25% glycerol (vol:vol) and 1% bromophenol blue (wt:vol)). Proteins were observed by staining them with Coomassie brilliant blue. Molecular mass standards were obtained from Fermentas.

Native gel electrophoresis was performed using 12% polyacrylamide gels. Samples were added in 4:5 ratio (vol:vol) to native electrophoresis buffer (60 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 25% glycerol and 1% bromophenol blue). Zymograms were performed by incubation of gels in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 10.0, containing 1 mM MgCl₂ and 2.5 mM 4-methylumbellyferylphosphate (MUFPP, Sigma Chemical Co.) as substrate, for 20 min at 70°C. Active bands were observed under ultraviolet light.

Protein concentration was determined by the method of Bradford, using BSA as standard [Bradford, 1976]. Each value is the mean of at least three assays.

RESULTS AND DISCUSSION

P. abyssi AP intracellular expression using *E. coli* cells- The arginine-encoding codons AGG and AGA are 20- and 7-fold more frequent, respectively, on the *P. abyssi* AP gene than on the *E. coli* genome (Table VI.1). The isoleucine-encoding codon ATA does not occur with significantly higher frequency on either sequence (Table VI.1). In any case, the higher occurrence of minor arginine codons has been showed to be a limiting factor in *E. coli* expression efficiency [Makrides, 1996]. Moreover, the *P. abyssi* AP gene sequence shows clusters of the rare arginine codons AGG and AGA (data not shown). Indeed, one triplet and two tandems are observed (AGA-AGG-AGA, AGG-AGG and AGA-AGG), corresponding to the amino acids R282-R283-R284, R316-R317 and R340-R341, respectively. The presence of rare codons in clusters has been proved to be even more limiting for the achievement of high expression yields [Kane, 1995]. In this work, *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS was transformed with the recombinant pET9aAP plasmid. This enabled the collecting of cell lines expressing *P. abyssi* AP with an average yield of $4.9 \times 10^3 \pm 0.9 \times 10^3$ U.L⁻¹, corresponding to approximately 0.6 ± 0.1 mg of *P. abyssi* AP per liter of culture (Table VI.1). The cell line with the highest yield was made competent and transformed with tRNA_{AGA,AGG,ATA} encoding plasmid pSJS1240. This way, *E. coli* cell lines were obtained, which expressed *P. abyssi* AP with an average yield of $68.4 \times 10^3 \pm 8.8 \times 10^3$ U.L⁻¹, corresponding to approximately 8.3 ± 1.1 mg of *P. abyssi* AP per liter of culture. Introduction of the pSJS1240 plasmid in the expression system enabled an almost 14-fold increase of the expression level (Table VI.1). Studies on the expression of archaeal proteins in *E. coli* have previously reported analogous results. The influence of the co-expression of these tRNAs was tested using 6 archaeal proteins and 5- to 20-fold increases in the expression levels of the recombinant proteins were observed [Kim *et al.*, 1998]. By co-expressing only tRNA_{AGA}, *Sulfolobus* sp. strain 7 produced 2-fold higher yields of pyrophosphatase [Wakagi *et al.*, 1998]. A 5-fold increase in the expression level of *Thermococcus littoralis* 4- α -glucanotransferase was achieved by co-expressing tRNA_{AGA,AGG} and GroELS chaperones [Imamura *et al.*, 1999].

Table VI.1. Overexpression of *P. abyssi* AP using *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS cells, harboring pET9aAP plasmid, and influence of tRNA_{AGA,AGG,ATA} co-expression.

Rare codon occurrence (%)	AGG (Arg)	AGA (Arg)	ATA (Ile)
<i>E. coli</i> genome [Kane, 1995]	0.14	0.21	4.1
<i>P. abyssi</i> AP gene	2.8	1.5	4.9
Expression yields of induced cells (U.L ⁻¹) ^a			
Without pSJS1240	4.9 × 10 ³ ± 0.9 × 10 ³		
With pSJS1240	68.4 × 10 ³ ± 8.8 × 10 ³		
Ratio of With/Without pSJS1240	13.9		

^a: 5 to 10 cell lines were tested to determine each value.

Protein profiles of two cell lines were observed by SDS-PAGE (figure VI.1). Lanes 1 and 3 correspond to soluble intracellular heat-treated extracts of non-induced *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pET9aAP and pET9aAP/pSJS1240 plasmids, respectively. Lanes 2 and 4 show such extracts after induction of the same clones. For both cell lines, a more intense band, corresponding to a 52 kDa protein, can be seen after induction with IPTG. This band could not be observed from non-induced or induced cultures of wild-type *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS cells (data not shown). Since *P. abyssi* AP monomer has a calculated molecular size of 52 kDa, this band is likely to be the recombinant AP. Moreover, the higher intensity of the 52 kDa band in lane 4 compared to lane 2 (figure VI.1) confirms the result obtained from activity assays of induced cell line extracts: an approximately 10- to 20-fold increase of *P. abyssi* AP production in the pSJS1240 carrying system. Finally, it is interesting to notice that even without induction, the background expression of *P. abyssi* AP is higher in the presence of pSJS1240 (figure VI.1, lanes 1 and 3).

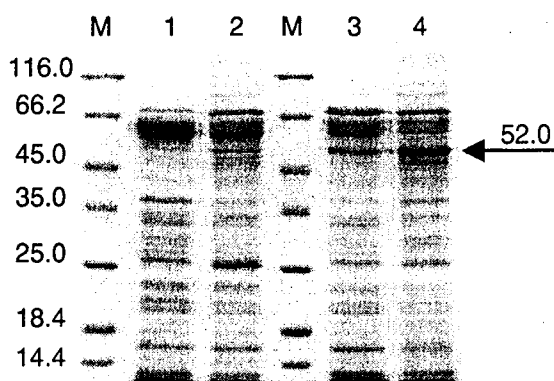


Figure. VI.1. Expression of recombinant *P. abyssi* AP using *E. coli* cells. 12% SDS-PAGE showing intracellular extracts after heat-treatment of *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pET9aAP plasmid (lane 1: non-induced cells; lane 2: induced cells) and *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS, harboring pET9aAP and pSJS1240 plasmids (lane 3: non-induced cells; lane 4: induced cells). Lanes M correspond to molecular size markers (Fermentas). Molecular sizes are indicated in kDa.

***P. abyssi* AP secretion using *Pc. pastoris* cells-** In order to generate *P. abyssi* AP expressing *Pc. pastoris* cells, 10 μg of pPICZ α AP recombinant plasmid were transformed into *Pc. pastoris* SMD1168H and recombinant clones selected on a range of ZeocinTM from 100 to 2,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Approximately 1,300 UFC.mL⁻¹ grew on the 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ plates, whereas 20 UFC.mL⁻¹ were found on the 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ plates and no colonies could be seen on higher ZeocinTM concentrations. Copy numbers of the pPICZ α AP construct within the genome of the different clones were not determined, but a screening for AP activity in the supernatant of different cultures showed that cells selected on 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ plates produced approximately 5-fold more activity than cells selected on 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ plates (data not shown). Most of the screening for AP activity production was performed on clones selected on 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ plates of over 16 clones tested, three showed a doubling of AP activity compared to the clones of lowest AP production. One of these was selected for preliminary expression studies in Erlenmeyer baffled flasks. Using BMGY/BMMY media, biomass did not exceed 8 g.L⁻¹ and AP activity in the supernatant reached 1.5×10^4 U.L⁻¹. Negligible thermostable AP activity was found in the cytoplasm of the cells, showing a good secretion process of the recombinant AP into the culture medium.

In order to improve the production of *P. abyssi* AP by the *Pc. pastoris* expression system, cultures were scaled-up in a 1.2 liter working volume bioreactor. Figure VI.2 shows the results of *P. abyssi* AP production in BMMY medium after the propagation phase in BMGY. A high-density cell concentration was achieved with a final biomass value of 42.8 g.L⁻¹ (figure VI.2.A). For the production of other heterologous proteins by *Pc. pastoris*, greater cell densities have already been reported, 100-130 g.L⁻¹ [Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Files *et al.*, 2001], indicating that the fermentation process used can be improved in the

case. Indeed, it has not been yet optimised. AP activity was released in the culture medium in a two-phase process (figure VI.2.B): a linear increase from 0 up to 3.6×10^4 U.L⁻¹ at t = 85 h, and then a rather regular decrease down to 1.7×10^4 U.L⁻¹ at t = 170 h. This two-phase process appeared correlated with the protein concentration in the supernatant: profiles of specific activity in U.L⁻¹ and protein concentration are rather similar (figure VI.2.B and VI.2.C), and, specific activity in U.mg_{protein}⁻¹ (figure VI.2.C) is relatively consistent throughout the expression process (figure VI.2.C). After 85 h of cultivation (72 h in the expression medium containing methanol), one or several nutrients might be limiting, inducing a metabolic switch, such as the use of extracellular proteases. This could explain the degradation of extracellular proteins and therefore of the recombinant AP.

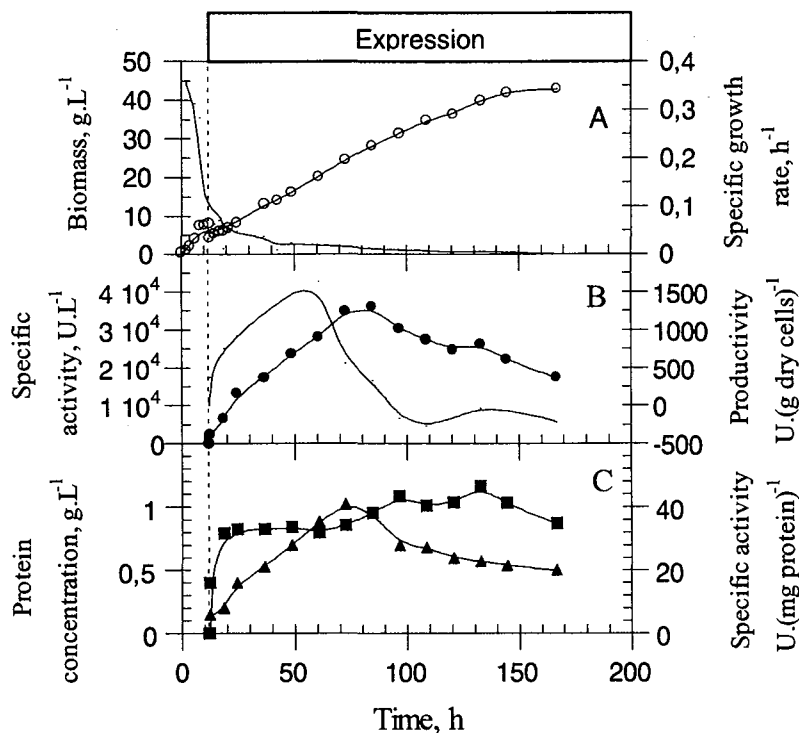


Figure VI.2. Kinetic of *P. abyssi* AP secretion by a modified *Pc. pastoris* strain. **A:** biomass ($\text{g}_{\text{dry cell}} \cdot \text{L}_{\text{culture}}^{-1}$; O) and specific growth rate (h^{-1} ; —); **B:** supernatant specific *P. abyssi* AP activity ($\text{U} \cdot \text{L}_{\text{culture}}^{-1}$; ●) and productivity ($\text{U} \cdot \text{g}_{\text{dry cell}}^{-1}$; —); **C:** supernatant protein concentration ($\text{g}_{\text{protein}} \cdot \text{L}_{\text{culture}}^{-1}$; ▲) and specific *P. abyssi* AP activity related to supernatant protein concentration ($\text{U} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$; □). The "Expression" area corresponds to the methanol feeding phase.

These AP activity and protein concentration profiles were confirmed on gels (figure VI.3). Indeed, supernatant proteins were observed on SDS-PAGE (data not shown). It appeared that the amount of protein increased until 84 h and then decreased. A very slight cluster of bands was observed between the 45.0 and 66.2 kDa molecular size standards. As *P. abyssi* AP has a monomer molecular size of 52 kDa and four Asn-linked glycosylation sites were found on its sequence (data not shown), this band cluster might correspond to the recombinant AP with multiple glycosylated isoforms. The same supernatant samples were analyzed on native gels by AP activity staining (figure VI.3.A). AP activity is visible after only 6 hours of expression ($t = 18.5$ h), underscoring the fact that *P. abyssi* AP production starts quickly after the beginning of induction with methanol. Subsequently, AP activity seems to increase until 84 h and to decrease after this peak, confirming the previous results obtained by activity assay. Moreover, this gel shows the presence of three distinct quaternary forms. The two lowest forms have been already observed [Zappa *et al.*, 2001; partie II : Zappa *et al.*, 2002]. They were identified as a monomer and a dimer. This mixture of quaternary forms was apparent when *P. abyssi* AP is folded in the presence of high concentrations of phosphate buffer. In this case, *P. abyssi* AP is secreted in a culture medium containing 100 mM potassium phosphate. The third quaternary form observed on the gel is the highest and might correspond to an oligomeric form. Finally, the monomer appears to consist in a cluster of several bands. This might also result from the presence of multiple glycosylated isoforms.

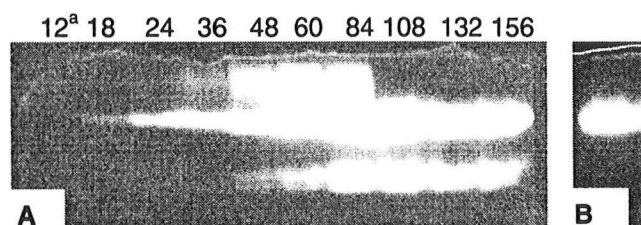


Figure VI.3. Kinetics of *P. abyssi* AP secretion by a modified *Pc. pastoris* strain on gels. **A:** 12% acrylamide native gel showing cell-free supernatant samples as a function of cultivation time (h), a: beginning of recombinant AP expression. 12.5 μ L of supernatant were loaded in each lane. AP activity was observed using MUFP as substrate according to the procedure described in the materials and methods section. **B:** 12% acrylamide native gel showing cell-free supernatant sample of $t = 84$ h transferred in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. 10 μ L were loaded. AP activity was observed as in figure VI.3.A.

The expression level (mg of *P. abyssi* AP produced per liter of culture) could not be estimated in this work. However, the slight intensity of the cluster presumed to be *P. abyssi* AP on SDS-PAGE indicates that the recombinant enzyme was expressed at a low level, such as a few mg.L⁻¹. In addition, a sample of crude cell-free extracts, corresponding to the t = 85h of the growth kinetics, was loaded on a desalting column (PD10, Pharmacia) and proteins eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Activity in this sample was 20-fold higher than in the crude supernatant, reaching 7.2×10^5 U.L⁻¹, and the enzyme appeared completely dimerised (figure VI.3.B). The dimerisation in the presence of Tris was already observed [partie II : Zappa *et al.*, 2002] and glycosylation of the recombinant does not seem to prevent it. The specific activity value (in U.L⁻¹) is approximately 10-fold higher than the yields obtained using the *E. coli* pSJS1240 system. As a result, it would be interesting to purify the recombinant AP from *Pc. pastoris* cultures and to determine the influence of glycosylation on the AP activity and to estimate the expression level. In this work, under the experimental conditions used, the expression seems to be low compared to what has previously been achieved by expressing heterologous proteins with recombinant *Pc. pastoris* strains. Indeed, several proteins were expressed at g.L⁻¹ levels [anonyme, 2000; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000]. However, many heterologous proteins are expressed at levels of a few tens of mg.L⁻¹ [anonyme, 2000; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001; Zani *et al.*, 2001]. So far, the only AP expressed within a recombinant *Pc. pastoris* strain was the human placental one, which shares 28% of sequence identity with *P. abyssi* AP. It was expressed at a level of 2 mg.L⁻¹ [Heimo *et al.*, 1998]. To our knowledge, this work is the first example of an archaeal protein expressed by *Pc. pastoris* cells.

Acknowledgements. This work was supported by the Biotechnology Program grant 98 C 0173 from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, France. We would like to thank Pr. Evan R. Kantrowitz for having kindly provided the pSJS1240 plasmid, Dr. Mohamed Ouzzine for precious advice about *Pichia pastoris* expression, Davin Uy for stimulating discussions about fermentation processes.

Conclusion

L'expression de la phosphatase alcaline recombinante de *Pyrococcus abyssi* a été étudiée dans cette dernière partie. Deux hôtes mésophiles ont été utilisés pour exprimer cette enzyme : la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Pichia pastoris*. L'expression intracellulaire par *E. coli* a permis de produire quelques milligrammes de phosphatase alcaline recombinante par litre de culture, ce qui est proche des niveaux d'expression obtenus pour d'autres protéines d'Archaea [Kim *et al.*, 1998]. L'analyse de la séquence nucléotidique avait mis en évidence la fréquence importante des codons AGG et AGA dans le gène *phoA* (cf. partie III). Ces codons étant les plus rares chez *E. coli*, la co-expression d'ARNt_{AGG,AGA} a été réalisée et a permis d'améliorer le niveau d'expression d'un facteur 14. Connaissant désormais l'influence de l'usage des codons dans l'expression de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* par *E. coli*, il pourrait être envisagé d'introduire des mutations conservatives dans la séquence nucléotidique du gène *phoA* afin d'obtenir un usage des codons identique à celui de la souche hôte. Cela permettrait d'optimiser l'étape de transcription.

La levure *Pichia pastoris* a également permis d'exprimer la phosphatase alcaline de *P. abyssi*. Une cassette d'expression, contenant un cadre ouvert de lecture codant pour cette enzyme munie d'un peptide signal de levure en N-terminal, a permis de générer des souches de *Pc. pastoris* sécrétant l'enzyme recombinante. Lors de ces travaux, il a été montré que cette construction génétique est efficace. De plus, cette cassette étant introduite dans le génome de la levure par recombinaison homologue, les lignées cellulaires ainsi générées sont stables. L'une de ces lignées a été étudiée en fermenteur. Le suivi cinétique de la production de biomasse et d'activité phosphatase alcaline extracellulaire ont apporté des résultats encourageants. En effet, la mise en œuvre en fermenteur de cette souche modifiée de *Pc. pastoris* a permis de sécréter la phosphatase alcaline de *P. abyssi*. Le taux d'expression n'a pas pu être évalué avec précision mais semble de l'ordre de quelques milligrammes par litre de culture. Les conditions de culture n'étant pas optimisées, il est raisonnable de penser que la production de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* peut-être améliorée. Cela peut être appréhendé par la mise au point d'un milieu de culture.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les phosphatases alcalines sont décrites comme ubiquitaires. Cette famille d'enzymes comptent en effet de nombreux représentants dans des taxons aussi divers que les bactéries et les mammifères [McComb *et al.*, 1979]. Cependant, malgré l'intérêt de la communauté scientifique à la fois pour ces enzymes et pour les micro-organismes extrémophiles, aucune phosphatase alcaline n'avait été décrite chez les Archaea hyperthermophiles au début de ces travaux. Seule une activité phosphatase alcaline avait été mise en évidence dans le périplasma de *Pyrococcus horikoshii*, mais l'enzyme n'avait pas été purifiée [González *et al.*, 1998]. L'objectif initial de ce projet de thèse a donc été d'isoler et de caractériser, pour la première fois, une activité phosphatase alcaline chez un Archaea hyperthermophile.

Dans le cadre de la valorisation de l'Euryarchaeote *Pyrococcus abyssi*, un gène codant pour une protéine présentant de fortes homologues avec les séquences de phosphatases alcalines connues a été identifié sur le génome de cette souche. Ceci a constitué le point de départ de ce travail de thèse.

La séquence de ce gène, nommé *phoA*, a été analysée, révélant notamment des informations sur la protéine codée. Le produit de *phoA* correspond à une chaîne peptidique de 495 acides aminés, d'une taille estimée à 54,5 kDa. Dans la partie N-terminale, les 25 premiers acides aminés présentent les caractéristiques d'un peptide signal. La chaîne peptidique mature serait donc constituée de 470 acides aminés et d'une taille de 52 kDa. L'analyse de la séquence peptidique, par comparaison avec celles de phosphatases alcalines connues, a également révélé la forte conservation du site actif. Le site actif des phosphatases alcalines est constitué d'un résidu sérine nucléophile, d'un résidu arginine pour la coordination du groupement phosphate du substrat, d'une triade métallique composée de deux ions Zn^{2+} et d'un ion Mg^{2+} [Kim & Wyckoff, 1989]. La séquence de la chaîne peptidique issue de *phoA* comportent tous les éléments impliqués dans la mise en place d'un tel site actif : le résidu sérine, le résidu arginine ainsi que les résidus nécessaires à la coordination des trois ions métalliques. Tous les résidus constituant le site actif des phosphatases alcalines sont très stables, quelque soit l'origine phylogénétique de l'enzyme. Seuls les résidus ligands secondaires de l'ion Mg^{2+} diffèrent selon que l'enzyme est d'origine bactérienne ou eucaryote. Ces résidus, D153 et

K328 chez *E. coli*, correspondent à deux histidines pour les phosphatases alcalines eucaryotes [Kim & Wyckoff, 1989]. A l'instar de ces dernières, la séquence identifiée chez *P. abyssi* présentent deux résidus histidines à ces positions. Les Archaea, troisième domaine du vivant, partagent des caractéristiques avec à la fois les Bactéries et les Eucaryotes [van der Oost *et al.*, 1998]. L'alignement de séquences de phosphatases alcalines des trois domaines du vivant a montré que le site actif est identique chez les Archaea et les Eucaryotes, tandis qu'il diffère chez les Bactéries au niveau des ligands secondaires de l'ion Mg^{2+} . Hormis la constitution du site actif, des éléments de structure secondaire ont pu être mis en évidence. Les structures des phosphatases alcalines d'*E. coli*, de la crevette arctique et de la forme humaine placentaire sont connues [de Backer *et al.*, 2002 ; Le Du *et al.*, 2001 ; Kim & Wyckoff, 1989]. Celles-ci se présentent sous forme d'un homodimère dont chaque unité est composé d'un feuillet β central à 10 brins entouré de boucles et d'hélices α . La comparaison des séquences montre que les brins β du feuillet central de la phosphatase alcaline d'*E. coli* sont conservés chez *P. abyssi*. Ceci permet d'envisager pour la phosphatase alcaline de ce dernier une structure tertiaire similaire à son homologue bactérien.

L'analyse du gène *phoA* a permis de rassembler des informations permettant d'appréhender la phase d'étude expérimentale de la phosphatase alcaline hypothétique de *P. abyssi*. Ce gène a donc été isolé, amputé de la séquence codant pour le peptide signal putatif. Ce fragment de 1410 paires de bases, codant pour une chaîne peptidique de 470 acides aminés, a été cloné et la protéine exprimée chez *E. coli* sous le contrôle du promoteur T7. La protéine recombinante a été ensuite purifiée et caractérisée. Le *para*-nitrophénylphosphate, phosphomonoester chromogénique, a été utilisé comme substrat pour les travaux de caractérisation. Les conditions optimales d'activité enzymatique ont été déterminées à une température et un pH respectifs de 70°C et 11,0. Les demi-vies de l'enzyme recombinante à 100°C et 105°C sont respectivement de 18 et 5 heures. Ces éléments de caractérisation montre que le produit du fragment cloné, après expression et purification, correspond bien à une activité phosphatase alcaline thermostable. Ceci a donc permis de confirmer expérimentalement que la séquence *phoA*, identifiée lors de l'annotation du génome de *P. abyssi*, est bien celle d'une phosphatase alcaline.

Un travail de caractérisation structurale a fait l'objet d'un intérêt particulier. En effet, les premiers résultats obtenus, concernant la structure quaternaire de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* ont montré la présence de deux formes actives : un monomère et un homodimère. Les phosphatases alcalines sont classiquement décrites comme des homodimères. De plus, cette

structure quaternaire semble être une condition nécessaire à l'activité enzymatique [Kim & Wyckoff, 1989 ; McComb *et al.*, 1979]. En effet, les phosphatases alcalines observent la propriété de « complémentation intragénique » : bien que chaque sous-unité dispose d'un site actif complet, le monomère isolé est inactif et l'obtention de l'activité enzymatique est associée à la dimérisation [Hehir *et al.*, 2000]. Cette propriété, mal comprise, pourrait être mieux appréhendée si l'on disposait d'une phosphatase alcaline monomérique active. C'est pourquoi, les premières données sur la structure quaternaire de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* permettaient d'envisager une telle découverte. Le mélange de formes mono- et dimérique actives avait été observé sur gel d'acrylamide en conditions natives. Il a donc été entrepris de séparer les deux formes et de confirmer leur activité en solution. Les techniques de séparation utilisées, chromatographie d'exclusion de taille et sédimentation par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, n'ont permis de recouvrer les deux formes. Au contraire, seule l'homodimère a été observé. La composition du tampon d'incubation de l'enzyme s'est avérée être la clef pour la compréhension de ces résultats. En effet, lorsque la phosphatase alcaline de *P. abyssi* est purifiée en tampon phosphate, elle se présente sous forme homodimérique en solution mais sous forme d'un mélange mono- et di-mère sur gel natif. En revanche, lorsqu'elle est en tampon Tris-HCl, la forme homodimérique uniquement est observée à la fois en solution et sur gel natif. Au terme de cette analyse, il a été conclu que la purification de l'enzyme en tampon phosphate aboutit à une conformation sensible au changement de tampon et aux conditions d'électrophorèse, tandis que l'incubation de l'enzyme en tampon Tris-HCl semble générer une maturation structurale beaucoup plus stable. Ainsi, la forme active de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* est un homodimère de 104 kDa.

Les phosphatases alcalines étant des métallo-enzymes [McComb *et al.*, 1979], la dépendance de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* vis-à-vis des métaux a été étudiée, afin de vérifier les informations obtenues grâce à l'analyse de la séquence peptidique. L'incubation de l'enzyme en présence de chélateurs de métaux, l'EDTA et l'EGTA, rend celle-ci inactive. En revanche, certains ions métalliques (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) améliorent l'activité enzymatique d'un facteur 2. Ceci indique la présence nécessaire de certains métaux pour que l'enzyme soit active. De plus, l'enzyme purifiée étant active sans ajout de métaux, ceci laisse penser que certains de ces ions sont fixés à la protéine lors de sa maturation et que l'interaction entre ces métaux et la chaîne peptidique est suffisamment forte pour résister aux différentes étapes de purification. Comme cela a été évoqué plus tôt, les phosphatases alcalines eucaryotes disposent de deux résidus histidine comme ligands secondaires de l'ion Mg^{2+} . Cela induit la

formation d'un site de fixation métallique ayant plus d'affinité pour le zinc que pour le magnésium. En conséquence, ces phosphatases alcalines sont activées en présence de Mg^{2+} exogène alors qu'elles sont inhibées en présence de fortes concentrations de Zn^{2+} [Murphy & Kantrowitz, 1993 ; Murphy & Kantrowitz, 1994 ; Murphy *et al.*, 1995]. L'analyse de la séquence de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* avait montré la présence d'un site actif de type eucaryote. Les tests réalisés concernant l'influence du zinc et du magnésium semble confirmer ce fait. Cependant, à l'issue de ces travaux, le contenu métallique de l'enzyme reste inconnu et il est nécessaire d'approfondir cette question pour connaître la véritable nature du site actif de la phosphatase alcaline de *P. abyssi*. L'influence des métaux a également été étudiée en terme de structure quaternaire. Un traitement drastique de l'enzyme à l'EDTA provoque la formation de monomères inactifs. A l'inverse, l'incubation de l'apoenzyme en présence de Mg^{2+} , de Co^{2+} ou de Zn^{2+} permet de restaurer partiellement l'activité enzymatique et la forme dimérique. Connaître le contenu métallique de l'enzyme permettrait de caractériser plus finement la relation entre la présence des métaux dans le site actif et la stabilité de la structure quaternaire. Si la nature et le nombre de cations métalliques par site actif étaient connus, l'activité et la dimérisation de l'enzyme pourraient être étudiées en fonction de gammes de concentration en ces métaux. Cela permettrait de déterminer si certains métaux sont plutôt impliqués dans la stabilité structurale que dans la catalyse enzymatique, si la stabilité de la forme homodimérique est une conséquence directe de la bonne conformation des métaux du site actif.

Comme cela a été exprimé dans l'introduction générale de cette thèse, l'étude des phosphatases alcalines présentent un intérêt à la fois pour la recherche académique que dans le cadre d'applications pratiques. En terme d'applications, la déphosphorylation de fragments d'ADN linéaires constituent une procédure de biologie moléculaire couramment utilisée. La phosphatase alcaline de *P. abyssi* a été testée dans le cadre de la déphosphorylation d'extrémités franches et cohésives de pBSK préalablement linéarisé. Son efficacité de déphosphorylation est de 93,8% sur les bouts cohésifs et de 84,1% sur les bouts francs. Les conditions de déphosphorylation utilisées lors de ce test ne sont pas optimisées, ce qui laisse beaucoup d'espoir de voir ces performances améliorées. Toujours est-il que la phosphatase alcaline de *P. abyssi* nécessite des travaux complémentaires d'ordre fondamental et qu'il peut être envisagé de développer un outil de biologie moléculaire à partir de celle-ci. C'est pourquoi, dans tous les cas, maîtriser sa production est un paramètre important. Son expression sous forme de protéine recombinante dans deux hôtes mésophiles a donc été étudiée : la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Pichia pastoris*. La production intracellulaire

chez *E. coli* a été réalisée sous le contrôle du promoteur T7, inductible à l'IPTG. L'enzyme a été exprimée à raison de quelques milligrammes par litre de culture. Afin de déterminer l'influence de l'usage des codons différentiel entre *E. coli* et *P. abyssi*, la co-expression d'ARNt relatifs aux codons rares AGG, AGA et ATA a été étudiée et a permis de multiplier le taux d'expression par 14. L'usage des codons s'avère ainsi être un facteur à prendre en compte pour améliorer la production de cette enzyme et cela pourrait être réalisé en redessinant la séquence nucléotidique de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* en fonction de l'usage des codons d'*E. coli*. De plus, des essais d'expression chez la levure *Pc. pastoris* ont été menés. Le plasmide pPICZ α a été utilisé de façon à faire sécréter la protéine recombinante par la levure. L'expression a été régulée par le promoteur AOX1, inductible au méthanol. La construction génétique réalisée a effectivement permis la sécrétion de l'enzyme recombinante lors de tests préliminaires en fioles d'Erlenmeyer. Afin d'améliorer les performances de la levure modifiée, cette dernière a été cultivée en fermenteur, ce qui permettait de mieux contrôler différents paramètres tels que l'aération, l'agitation, le pH, ... L'expression de la phosphatase alcaline en fermenteur a permis d'obtenir une meilleure production en biomasse et en enzyme recombinante. Le taux d'expression n'a pas pu être déterminé avec précision mais semble être de l'ordre de quelques milligrammes par litre de culture. Il serait intéressant d'une part d'optimiser les conditions de culture afin d'améliorer le taux d'expression (notamment par la mise au point d'un milieu de culture adéquat), d'autre part de purifier l'enzyme obtenue afin de caractériser cette isoforme recombinante. En effet, à l'opposé de l'isoforme produite par *E. coli*, celle-ci bénéficie des modifications post-traductionnelles de la levure, telle que la glycosylation. Ces travaux d'expression, menés avec *E. coli* et *Pc. pastoris*, ont montré que la phosphatase alcaline de *P. abyssi* pouvait être produite facilement et que les performances de production pouvaient être améliorées. De plus, les premiers travaux de caractérisation avaient nécessité la purification de l'enzyme. Celle-ci avait été réalisée facilement à l'aide d'un choc thermique permettant de dénaturer les protéines thermosensibles, suivi de deux ou trois étapes de chromatographie. La facilité avec laquelle a pu être exprimée et purifiée la phosphatase alcaline de *P. abyssi* est prometteuse pour la produire dans l'optique de travaux fondamentaux de caractérisation et de cristallisation, mais aussi dans un dessein de développement commercial.

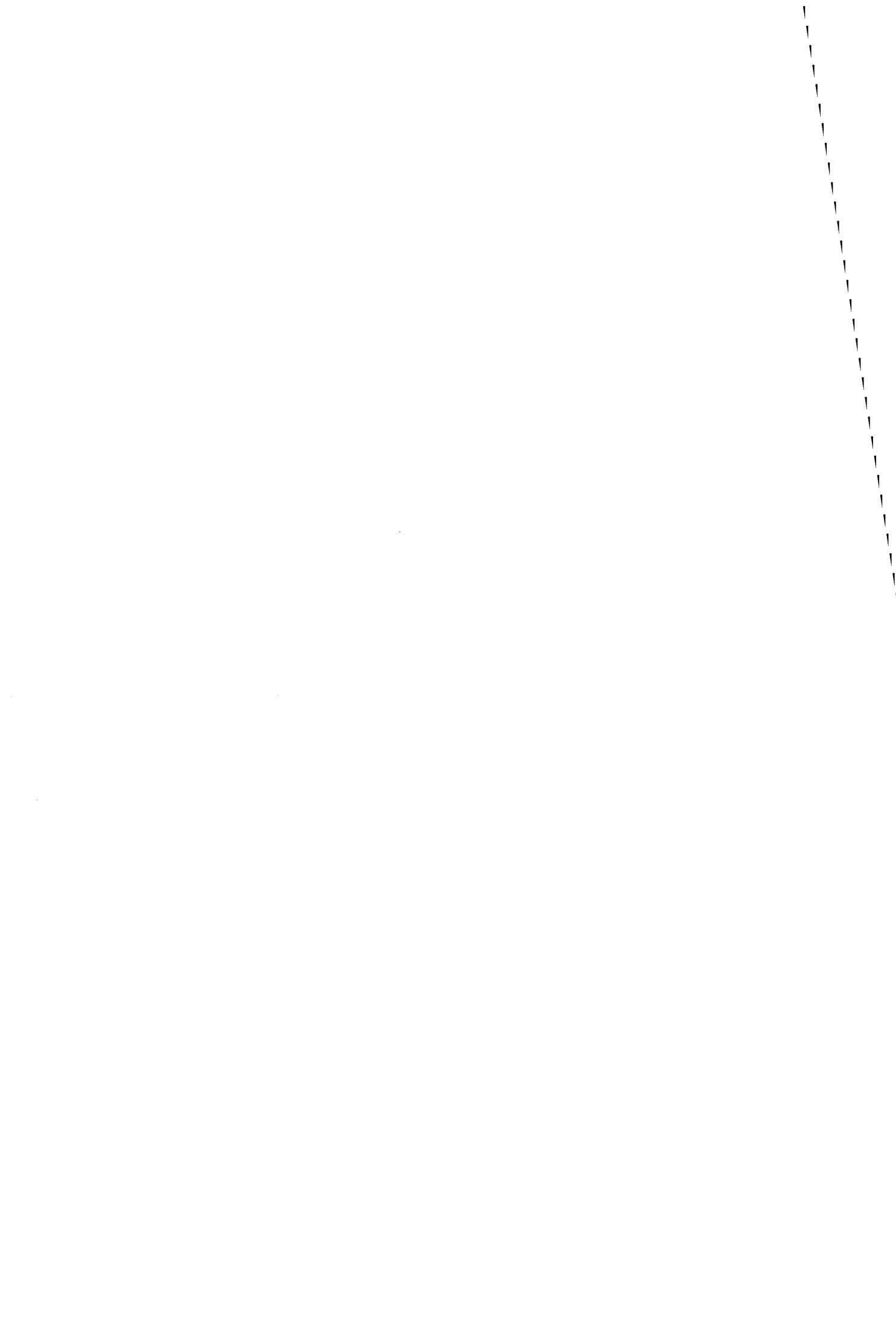
Cette thèse représente à ce jour la seule étude concernant la phosphatase alcaline de *P. abyssi* et le premier travail sur une phosphatase alcaline issue d'un Archaea hyperthermophile. Aussi de nombreux aspects n'ont pas pu être abordés, même si l'objectif initial a été atteint. Certains

de ces aspects restant à développer ont été évoqués dans les paragraphes précédents : le contenu métallique de l'enzyme et son influence sur l'activité et la structure de l'enzyme, l'optimisation des procédures de production. D'autres aspects concernant notamment la caractérisation de l'enzyme peuvent être envisagés. Tout d'abord, la thermostabilité se présente comme un axe d'étude particulièrement intéressant. La phosphatase alcaline de *P. abyssi* est l'enzyme la plus thermostable de cette famille. Elle présente certainement une structure originale qu'il serait intéressant d'élucider. De plus, un site de fixation du calcium a été identifié sur la séquence. Le calcium a déjà été montré comme facteur de thermostabilisation chez des protéines de *P. furiosus* [Vieille & Zeikus, 2001]. L'influence du calcium n'a pas été étudié dans cette thèse. Une autre piste d'étude est la caractérisation de la fonction phosphotransférase de l'enzyme. Certes, il a été observé qu'elle était plus active en tampon Tris-HCl qu'en tampon NaOH-Glycine, mais cette fonction n'a pas été précisément caractérisée. Un dernier aspect de caractérisation enzymatique envisageable est la détermination d'un spectre de substrats. Les phosphatases alcalines sont par définition substrat-aspécifiques. A l'issue de ces travaux, la spécificité de la phosphatase alcaline de *P. abyssi* vis-à-vis de substrats n'est pas connue. De tels données permettraient d'appréhender le type de substrats que l'enzyme dégrade *in vivo* et d'apporter des connaissances sur son rôle dans la physiologie de *P. abyssi*. Cependant, cette tâche peut s'avérer ardue dans la mesure où même pour les phosphatases alcalines très connues (bactériennes et humaines), les substrats *in vivo* ne sont toujours pas connus. Ce point nous amène sur la deuxième grande stratégie d'étude envisageable, après les questions de caractérisation enzymatique et biochimique. Il s'agit de la phosphatase alcaline dans la physiologie de *P. abyssi*. L'annotation du génome de cette souche a permis de mettre en évidence un réseau *pho*. Il serait intéressant de connaître la régulation de la synthèse de la phosphatase alcaline chez cette espèce. Cette synthèse est-elle constitutive ou inductible en conditions limitantes en phosphate inorganique ? De même, son peptide signal a été écarté de ces travaux. L'étude de ce dernier permettrait d'en savoir plus sur la localisation de l'enzyme au niveau de la cellule et sur le transport des protéines chez les Archaea hyperthermophiles.

Ainsi, le travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'apporter quelques connaissances sur cette phosphatase alcaline et ont participé à la valorisation de *P. abyssi*. Les résultats obtenus permettent d'envisager de nombreuses perspectives d'étude de cette enzyme à l'avenir dans le cadre de la compréhension de l'extrémophilie et des écosystèmes hydrothermaux.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



- Anonyme** (2000) A manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, version L. Invitrogen. Cat. n°K1710-01.
- Ansai, T., Awano, S., Chen, X., Fuchi, T., Arimoto, T., Akifusa, S. & Takehara, T.** (1998) Purification and characterization of alkaline phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from the bacterium *Prevotella intermedia*. *FEBS Lett.*, **428**, 157-60.
- Applebury, M. L. & Coleman, J. E.** (1969) *Escherichia coli* alkaline phosphatase. Metal binding, protein conformation, and quaternary structure. *J. Biol. Chem.*, **244**, 308-18.
- Ásgeirsson, B. & Andrésón, Ó. S.** (2001) Primary structure of cold-adapted alkaline phosphatase from a *Vibrio* sp. as deduced from the nucleotide gene sequence. *Biochim. Biophys. Acta*, **1549**, 99-111.
- Ásgeirsson, B., Hartemin, R. & Chlebowski, J. F.** (1995) Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Phys.*, **110B**, 315-29.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** (1998) Current protocols in molecular biology. Published by John Wiley & Sons Inc.
- Barbier, G.** (1994) Micro-organismes thermophiles et enzymes thermostables. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **9**, 13-8.
- Barford, D.** (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 407-12.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N.** (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9188-93.
- Belkin, S. & Jannasch, H. W.** (1985) A new extremely thermophilic sulfur-reducing heterotrophic marine bacterium. *Arch. Microbiol.*, **141**, 181-6.
- Berger, J., Garatini, E., Hua, J. C. & Udenfriend, S.** (1987) Cloning and sequencing of human of human intestinal alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 695-8.
- Bhatti, A. R., Alvi, A. & Chaudhry, G. R.** (2000) Evidence on the presence of two distinct alkaline phosphatases in *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **182**, 131-5.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. & 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.
- Böhm, G. & Jaenicke, R.** (1994) Relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **43**, 97-106.
- Bollag, D. M. & Edelman, S. J.** (1991). Protein Methods (New York: Wiley-Liss).
- Bonet, M. L., Llorca, F. I. & Cadenas, E.** (1994) Kinetic mechanism of *Halobacterium halobium* Mn²⁺-activated alkaline phosphatase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 1109-20.
- Bortolato, M., Besson, F. & Roux, B.** (1999) Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins*, **37**, 310-18.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
- Burda, P. & Aebi, M.** (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 239-57.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M.** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **24**, 445-66.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. Y. & Higgins, D. R.** (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, **16**, 23-52.
- Chaidaroglou, A., Brezinski D. J., Middleton, S. A. & Kantrowitz, E. R.** (1988) Function of Arginine-166 in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochem.*, **27**, 8338-43.

- Chang, C. N.,** Inouye, H., Model, P. & Beckwith, J. (1980) Processing of alkaline phosphatase precursor to the mature enzyme by an *Escherichia coli* inner membrane preparation. *J. Bacteriol.*, **142**, 726-8.
- Chang, C. N.,** Kuang, W. J. & Chen, E. Y. (1986) Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*. *Gene*, **44**, 121-5.
- Chen, Q.-X.,** Zheng, W.-Z., Lin, J.-Y., Shi, Y., Xie, W.-Z. & Zhou, H.-M. (2000) Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**, 879-85.
- Chyba, C. F.** (1993) The violent environment of the origin of life: Progress and uncertainties. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 3351-8.
- Coleman, J. E.** (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 441-83.
- Cox, G.,** Webb, D., Godavan-Zimmerman, J. & Rosenberg, H. (1988) Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J. Bacteriol.*, **170**, 2283-6.
- 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**, 1265-74.
- de Moerlooze, L.,** Struman, I., Renard, A. & Martial, J. A. (1992) Stabilization of T7-promoter-based pARHS expression vectors using the parB locus. *Gene*, **119**, 91-3.
- de Prada, P. &** Brenchley, J. E. (1997) Purification and characterization of two extracellular alkaline phosphatases from a psychrophilic *Arthrobacter* isolate. *Appl. Env. Microbiol.*, **63**, 2928-31.
- Deming, J. W.** (1998) Deep ocean environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 283-7.
- Deming, J. W. &** Baross, J. A. (1993) Deep-sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 3219-30.
- Derman, A. I. &** Beckwith, J. (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.*, **173**, 7719-22.
- Dong, G. &** Zeikus, J. G. (1997) Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 335-40.
- Driessen, A. J. M.,** van de Vossen, J. L. C. M. & Konings, W. N. (1996) Membrane composition and ion-permeability in extremophiles. *FEMS Microbiol. Rev.*, **18**, 139-48.
- Eguchi, M.** (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.*, **111B**, 151-62.
- Erauso, G.,** Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B., Partensky, F., Baross, J. A., Marteinson, V., Barbier, G., Pace, N. R. & Prieur, D. (1993) *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.*, **160**, 338-49.
- Erauso, G.,** Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M.-F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D. & Forterre, P. (1996) Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in hyperthermophile. *J. Bacteriol.*, **178**, 3232-7.
- Fauman, E. B. &** Saper, M. A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 413-7.
- Ferguson, M. A. J. &** Williams, A. F. (1988) Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 285-320.
- Files, D.,** Ogawa, M., Scaman, C. & Baldwin, S. A. (2001) A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 335-40.
- Fitt, P. S. &** Baddoo, P. (1979) Separation and purification of the alkaline phosphatase and a phosphodiesterase from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochem. J.*, **181**, 347-53.
- Fitt, P. S. &** Peterkin, P. I. (1976). Isolation and properties of a small manganese-ion-

- stimulated bacterial alkaline phosphatase. *Biochem. J.*, **157**, 161-167.
- Fujimori-Arai, Y.**, Koyama, I., Hirano, K. & Komoda, T. (1997) Intestinal alkaline phosphatase isoforms in rabbit tissues differ in glycosylation patterns. *Clin. Biochem.*, **3**, 545-51.
- Galperin, M. Y.**, Bairoch A. & Koonin, E. V. (1998) A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci.*, **7**, 1829-35.
- Galperin, M. Y.** & Jedrzejewski, M. J. (2001) Conserved core structure and active site residues in alkaline phosphatases superfamily enzymes. *Proteins*, **45**, 318-24.
- Goldman, S.**, Hecht, K., Eisenberg, H. & Mevarech, M. (1990) Extracellular Ca²⁺-dependent inducible alkaline phosphatase from the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *J. Bacteriol.*, **172**, 7065-70.
- González, J. M.**, Masuchi, Y., Robb, F. T., Ammerman, J. W., Maeder, D. L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J. & Kato, C. (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles*, **2**, 123-30.
- Harris, H.** (1989) The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta*, **186**, 133-50.
- Hauksson, J. B.**, Andrésón, Ó. S. & Ásgeirsson, B. (2000) Heat-labile bacterial alkaline phosphatase from a marine *Vibrio* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 66-73.
- Hehir, M. J.**, Murphy, J. E. & Kantrowitz, E. R. (2000) Characterization of heterodimeric alkaline phosphatases from *Escherichia coli*: an investigation of intragenic complementation. *J. Mol. Biol.*, **304**, 645-56.
- Heimo, H.**, Palmu, K. & Suominen, I. (1998) Human placental alkaline phosphatase: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.*, **12**, 85-92.
- Holtz, K. M.** & Kantrowitz, E. R. (1999) The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.*, **462**, 7-11.
- Holtz, K. M.**, Stec, B. & Kantrowitz, E. R. (1999) A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8351-4.
- Hoylaerts, M. F.**, Manes, T. & Millán, J. L. (1992) Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem. J.*, **286**, 23-30.
- Hoylaerts, M. F.**, Manes, T. & Millán, J. L. (1997) Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22781-7.
- Huang, C.-T.**, Xu, K. D., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. (1998) Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl. Env. Microbiol.*, **64**, 1526-31.
- Huber, R.**, Huber, H. & Stetter, K. O. (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 615-23.
- Huber, H.**, Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63-7.
- Hulett, F. M.** (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 933-9.
- Hulett, F. M.**, Bookstein, C. & Jensen, K. (1990) Evidence for two structural genes for alkaline phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **172**, 735-40.
- Hulett, F. M.**, Kim, E. E., Bookstein, C., Kapp, N. V., Edwards, C. W. & Wyckoff, W. (1991) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatases III and IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1077-84.
- Imamura, H.**, Jeon, B. S., Wakagi, T. & Matsuzawa, H. (1999) High level expression of *Thermococcus littoralis* 4- α -glucanotransferase in a soluble form in *Escherichia coli* with a novel expression system involving minor

- arginine tRNAs and GroELS. *FEBS Lett.*, **457**, 393-6.
- Inouye, H.**, Barnes, W. & Beckwith, J. (1982) Signal sequence of alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **149**, 434-9.
- Inouye, H.** & Beckwith, J. (1977) Synthesis and processing of an *Escherichia coli* alkaline phosphatase precursor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1440-4.
- Itoh, M.**, Kanamori, Y., Takao, M. & Eguchi, M. (1999) Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 121-9.
- Janeway, C. M. L.**, Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A. & Kantrowitz, E. R. (1993) Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry*, **32**, 1601-9.
- Jedrzejewski, M. J.** & Setlow, P. (2001) Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: Their mechanism of catalysis via a phosphoserine intermediate. *Chem. Rev.*, **101**, 607-18.
- Kam, W.**, Clauser, E., Kim, Y. S., Kan, Y. W. & Rutter, W. J. (1985) Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8715-9.
- Kane, J. F.** (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 494-500.
- Kaneko, Y.**, Hayashi, N., Toh-e, A., Banno, I. & Oshima, Y. (1987) Structural characteristics of the *PHO8* gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **58**, 137-48.
- Karamyshev, A. L.**, Karamysheva, Z. N., Kajava, A. V., Ksenzenko, V. N. & Nesmeyanova, M. A. (1998) Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: Role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. *J. Mol. Biol.*, **277**, 859-70.
- Karshikoff, A.** & Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: A 'traffic rule' for hot roads. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 550-6.
- Kim, R.**, Sandler, S. J., Goldman, S., Yokota, H., Clark, A. J. & Kim, S. H. (1998) Overexpression of archaeal proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 207-10.
- Kim, E. E.** & Wyckoff, H. W. (1989) Structure and function of alkaline phosphatases. *Clin. Chim. Acta*, **186**, 175-88.
- Kim, E. E.** & Wyckoff, H. W. (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.*, **218**, 449-64.
- Kozlenkov, A.**, Manes, T., Hoylaerts, M. F. & Millán, J. L. (2002) Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 22992-9.
- Kristjánsson, J. K.** & Hreggvidsson, G. O. (1995) Ecology and habitats of extremophiles. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 17-25.
- Kumar, S.** & Nussinov, R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1216-33.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-85.
- Lange, S.**, Schmitt, J. & Schmid, R. D. (2001) High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods*, **255**, 103-14.
- Le Du, M. H.**, Stigbrand, T., Taussig, M. J., Ménez, A. & Stura, E. A. (2001) Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution: Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9158-65.
- Lecompte, O.**, Ripp, R., Puzos-Barbe, V., Duprat, S., Heilig, R., Dietrich, J., Thierry, J.-C. & Poch, O. (2001) Genome evolution at the genus level: Comparison of three complete genomes of hyperthermophilic Archaea. *Genome Res.*, **11**, 981-93.
- Lee, M. H.**, Nittayajarn, A., Ross, R. P., Rothschild, C. B., Parsonage, D., Claiborne, A. & Rubens, C. E. (1999) Characterization of *Enterococcus faecalis* alkaline phosphatase

and use in identifying *Streptococcus agalactiae* secreted proteins. *J. Bacteriol.*, **181**, 5790-9.

McComb, R. B., Bowers, G. N. & Posen, S. (1979) Alkaline phosphatase. Plenum Press, New York, NY.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2000) Brock Biology of Microorganisms. Ninth edition. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.

Makino, K., Shinagawa, H., Anemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. & Nakata, A. (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.*, **210**, 551-9.

Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **60**, 512-38.

Marhuenda-Egea, F. C., Piera-Velázquez, S., Cadenas, C. & Cadenas, E. (2001) Stability of an extreme halophilic alkaline phosphatase from *Halobacterium salinarum* in non-conventional medium. *J. Biotechnol.*, **87**, 255-61.

Martin, D. C., Pastra-Landis, S. C. & Kantrowitz, E. R. (1999) Amino acid substitutions at the subunit interface of dimeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase cause reduced structural stability. *Protein Sci.*, **8**, 1152-9.

Mavromatis, K., Tsigos, I., Tzanodaskaladis, M., Kokkinidis, M. & Bouriotis, V. (2002) Exploring the role of a glycine cluster in cold adaptation of an alkaline phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2330-5.

Millán, J. L. (1986) Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 3112-5.

Morales, A. C., Nozawa, S. R., Thedei Jr., G., Maccheroni Jr., W. & Rossi, A. (2000) Properties of a constitutive alkaline phosphatase from strain 74A of the mold *Neurospora crassa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 905-12.

Mori, S., Okamoto, M., Nishibori, M., Ichimura, M., Sakayama, J. & Endo, H. (1999) Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 235-9.

Morita, N., Nakazato, H., Okuyama, H., Kim, Y. & Thompson Jr., G. A. (1996) Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**, 53-62.

Morris, H., Schlesinger, M. J., Bracha, M. & Yagil, E. (1974) Pleiotropic effects of mutations involved in the regulation of *Escherichia coli* K12 alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.*, **119**, 583-92.

Muda, M., Rao, N. & Torriani, A. (1992) Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *J. Bacteriol.*, **119**, 583-92.

Murphy, J. E. & Kantrowitz, E. R. (1994) Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases? *Mol. Microbiol.*, **12**, 351-7.

Murphy, J. E., Tibbitts, T. T. & Kantrowitz, E. R. (1995) Mutations at positions 153 and 328 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase provide insight towards the structure and function of mammalian and yeast alkaline phosphatases. *J. Mol. Biol.*, **253**, 604-17.

Murphy, J. E., Xu, X. & Kantrowitz, E. R. (1993) Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by a single amino acid substitution in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21497-500.

Nakazato, H., Okamoto, T., Nishikoori, M., Washio, K., Morita, N., Haraguchi, K., Thompson Jr., G. A. & Okuyama, H. (1998) The glycosylphosphatidylinositol-anchored phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* is a purple acid phosphatase. *Plant Physiol.*, **118**, 1015-20.

Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C. & Fraser, C. M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, **399**, 323-9.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. & Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a

source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 711-29.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, **10**, 1-6.

Palmer, J. R. & Daniels, C. J. (1995) *In vivo* definition of an Archaeal promoter. *J. Bacteriol.*, **177**, 1844-9.

Park, T., Lee, J.-H., Kim, H.-K., Hoe, H.-S. & Kwon S.-T. (1999) Nucleotide sequence of the gene for alkaline phosphatase of *Thermus caldophilus* GK24 and characteristics of the deduced primary structure of the enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**, 133-9.

Pantazaki, A. A., Karagiorgas, A. A., Liakopoulou-Kyriakides, M. & Kyriakidis, D. A. (1998) Hyperalkaline and thermostable phosphatase in *Thermus thermophilus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **75**, 249-59.

Politino, M., Brown, J. & Usher, J. J. (1996) Purification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase from *Penicillium chrysogenum*. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **26**, 171-81.

Poltorak, O. M., Chukhrai, E. S., Kozlenkov, A. A., Chaplin, M. F. & Trevan, M. D. (1999a) The putative common mechanism for inactivation of alkaline phosphatase isoenzymes. *J. Mol. Cat. B:enz.*, **7**, 157-63.

Poltorak, O. M., Chukhrai, E. S., Torshin, I. Y., Atyaksheva, L. F., Trevan, M. D. & Chaplin, M. F. (1999b) Catalytic properties, stability and the structure of the conformational lock in the alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Cat. B:enz.*, **7**, 165-72.

Posen, S. (1967) Alkaline phosphatase. *Ann. Int. Med.*, **67**, 183-203.

Pülher, G., Lottspeich, F. & Zillig, W. (1989) Organization and nucleotide sequence of the genes encoding the large subunits A, B and C of the DNA-dependent RNA polymerase of the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucl. Ac. Res.*, **17**, 4517-34.

Reiter, W. D., Hüdepohl, U. & Zillig, W. (1990) Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection

in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9509-13.

Reynolds, J. A. & Schlesinger, M. J. (1967) Conformational states of the subunit of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry*, **6**, 3552-9.

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**, 1230-8.

Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. & Engel, P. C. (1998) Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, **80**, 933-41.

Schlesinger, M. J. (1965) The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. II. Properties of the subunit. *J. Biol. Chem.*, **240**, 4293-8.

Schlesinger, M. J. & Barrett, K. (1965) The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Formation and reactivation of subunits. *J. Biol. Chem.*, **240**, 4284-92.

Scholten, M., Janssen, R., Bogaarts, C., van Strien, J. & Tommassen, J. (1995) The *pho* regulon of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, **15**, 247-54.

Scholten, M. & Tommassen, J. (1993) Topology of the PhoR protein of *E. coli* and functional analysis of the internal deletion mutants. *Mol. Microbiol.*, **8**, 269-75.

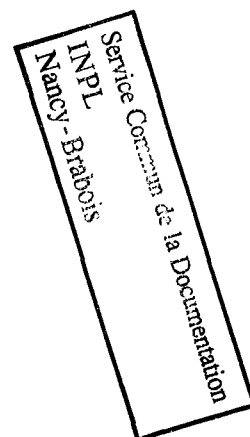
Sharipova, M. R., Balaban, N. P., Mardanova, A. M., Nekhotyaeva, N. V., Demytyev, A. A., Vershinina, O. A., Garusov, A. V. & Leshchinskaya, I. B. (1998) Isolation and properties of extracellular alkaline phosphatase from *Bacillus intermedius*. *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 1178-82.

Sharipova, M. R., Balaban, N. P., Nekhotyaeva, N. V., Mardanova, A. M., Demytyev, A. A. & Leshchinskaya, I. B. (1996) A novel *Bacillus intermedius* extracellular alkaline phosphatase: Isolation, physico-chemical and catalytic characteristics. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 753-61.

Spencer, D. B., Chen, C. P. & Hulett, F. M. (1981) Effect of cobalt on synthesis and

- activation of *Bacillus licheniformis* alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.*, **145**, 926-33.
- Stec, B.**, Hehir, M. J., Brennan, C., Nolte, M. & Kantrowitz, E. R. (1998) Kinetic and X-ray structural studies of three mutant *E. coli* alkaline phosphatases: Insights into the catalytic mechanism without the nucleophile Ser102. *J. Mol. Biol.*, **277**, 647-62.
- Stec, B.**, Holtz, K. M. & Kantrowitz, E. R. (2000) A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.*, **299**, 1303-11.
- Sterner, R.** & Liebl, W. (2001) Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 39-106.
- Stetter, K. O.** (1996) Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **18**, 149-58.
- Stetter, K. O.** (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.*, **452**, 22-5.
- Stock, J.**, Ninfa, A. & Stock, A. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**, 450-90.
- Sun, L.**, Martin, D. C. & Kantrowitz, E. R. (1999) Rate-determining step of *Escherichia coli* alkaline phosphatase altered by the removal of a positive charge at the active center. *Biochemistry*, **38**, 2842-8.
- Surin, B. P.**, Rosenberg, H. & Cox, G. B. (1985) Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationship. *J. bacteriol.*, **161**, 189-98.
- Suzuki, C.**, Ueda, H., Tsumoto, K., Mahoney, W. C., Kumagai, I. & Nagamune, T. (1999) Open sandwich ELISA with V_H-V_L-alkaline phosphatase fusion proteins. *J. Immunol. Methods*, **224**, 171-84.
- Tibbitts, T. T.**, Xu, X. & Kantrowitz, E. R. (1994) Kinetics and crystal structure of a mutant *Escherichia coli* alkaline phosphatase (Asp-369→Asn): a mechanism involving one zinc per active site. *Protein Sci.*, **3**, 2005-14.
- Tomassen, J.** & Lugtenberg, B. (1982) PHO-Regulon of *Escherichia coli* K12: A minireview. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **133A**, 243-9.
- Trowsdale, J.**, Martin, D., Bicknell, D. & Campbell, I. (1990) Alkaline phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 178-80.
- Tuleva, B.**, Vasileva-Tonkova, E. & Galabova, D. (1998) A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* with protein phosphatase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **161**, 139-44.
- van de Vossenberg, J. L. C. M.**, Driessen, A. J. M. & Konings, W. N. (1998) The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*, **2**, 163-70.
- van der Oost, J.**, Ciaramella, M., Moracci, M., Pisani, F. M., Rossi, M. & de Vos, W. M. (1998) Molecular biology of hyperthermophilic Archaea. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **61**, 87-115.
- Vetriani, C.**, Maeder, D. L., Tolliday, N., Yip, K. S.-P., Stillman, T. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Klump, H. H. & Robb, F. T. (1998) Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12300-5.
- Vieille, C.** & Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1-43.
- Vincent, J. B.**, Crowder, M. W. & Averill, B. A. (1992) Hydrolysis of phosphate monoesters: A biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 105-10.
- von Heijne, G.** (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 17-21.
- Wakagi, T.**, Oshima, T., Imamura, H. & Matsuzawa, H. (1998) Cloning of the gene for inorganic pyrophosphatase from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7, and overproduction of the enzyme by coexpression of tRNA for arginine rare codon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2408-14.
- Weiss, M. J.**, Cole, D. E., Ray, K., Whyte, M. P., Lafferty, M. A., Mulivor, R. A. & Harris, H. (1988) A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7666-9.

- Weiss, M. J.**, Henthorn, P. S., Lafferty, M. A., Slaughter, C., Raducha, M. & Harris, H. (1986) Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7182-6.
- Weissig, H.**, Schildge, A., Hoylaerts, M. F., Iqbal, M. & Millán, J. L. (1993) Cloning and expression of the bovine intestinal alkaline phosphatase gene: Biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. J.*, **290**, 503-8.
- Woese, C. R.**, Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-9.
- Wojciechowski, C. L.**, Cardia, J. P. & Kantrowitz, E. R. (2002) Alkaline phosphatase from the hyperthermophilic bacterium *T. maritima* requires cobalt for activity. *Protein Sci.*, **11**, 903-11.
- Xie, Q.** & Alpers, D. H. (2000). The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes. *Physiol. Genomics*, **3**, 1-8.
- Xu, X.**, Qin, X.-Q. & Kantrowitz, E. R. (1994) Probing the role of histidine-372 in zinc binding and the catalytic mechanism of *Escherichia coli* alkaline phosphatase by site-specific mutagenesis. *Biochemistry*, **33**, 2279-84.
- Yamashita, Y.**, Toyoshima, K., Yamazaki, M., Hanada, N. & Takehara, T. (1990) Purification and characterization of alkaline phosphatase of *Bacteroides gingivalis* 381. *Infect. Immun.* **58**, 2882-7.
- Zani, M. L.**, Brillard-Bourdet, M., Lazure, C., Juliano, L., Courty, Y., Gauthier, F. & Moreau, T. (2001) Purification and characterization of active recombinant rat kallikrein rK9. *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 387-96.
- Zappa, S.**, Rolland, J.-L., Flament, D., Gueguen, Y., Boudrant, J. & Dietrich, J. (2001) Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**, 4504-11.



**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur PASTRA-LANDIS Styliani C, Professeur, Wheaton College, Norton USA

Monsieur DUCHIRON Francis, Professeur, Université de Reims-Champagne-Ardenne, Reims

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur ZAPPA Sébastien

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**«Expression et caractérisation de la phosphatase alcaline de l'Euryaechaete
hyperthermophile pyrococcus abyssi».**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **«PROCEDES BIOTECHNOLOGIQUES & ALIMENTAIRES»**

Fait à Vandoeuvre le, 19 novembre 2002

Le Président de l'IN.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

A handwritten signature in black ink, appearing to be "L. Schuffenecker", written over a circular stamp or seal.

Expression et Caractérisation de la Phosphatase Alcaline de l'Euryarchaeote Hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*

Résumé

Les phosphatases alcalines (E.C. 3.1.3.1.) sont par définition des phosphomonoestérases aspécifiques, actives de façon optimale à pH alcalin. Décrites comme ubiquitaires, elles n'ont cependant jamais été étudiées chez les Archaea hyperthermophiles. La première étape de ces travaux a été l'isolement de la première phosphatase alcaline d'un tel organisme: *Pyrococcus abyssi*, Euryarchaeote issu d'une source hydrothermale, dont la température optimale de croissance est de 96°C. Le gène *phoA*, identifié sur génome de *P. abyssi*, a été cloné et la protéine recombinante exprimée chez *Escherichia coli*. Celle-ci a été purifiée, permettant de confirmer l'activité phosphatase alcaline codée par ce gène. La température et le pH permettant son activité optimale sont respectivement de 70°C et 11,0. L'enzyme a montré une grande thermostabilité, avec des demi-vies respectives à 100°C et 105°C de 18 heures et 5 heures. Une étude sur l'influence d'effecteurs métalliques a révélé sa nature de métallo-enzyme, caractéristique des phosphatases alcalines. Dans un second temps, ces travaux ont consisté à déterminer la structure quaternaire de la phosphatase alcaline de *P. abyssi*. Plusieurs tests ont permis d'identifier la forme homodimérique comme unique forme active. Cette structure quaternaire, deux sous-unités de 52 kDa chacune, s'est avérée dépendante du pH, de la composition du tampon et du contenu métallique de l'enzyme. Enfin, la troisième partie de cette thèse concerne l'étude de l'expression de la phosphatase alcaline recombinante de *P. abyssi*. Une étude a été réalisée en utilisant le système *Escherichia coli* et la régulation du promoteur T7, avec ou sans co-expression des ARNt relatifs aux codons rares. La protéine recombinante a également été exprimée dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* par sécrétion, dans un fermenteur d'1,2 litres.

Mots-clés : phosphatase alcaline, *Pyrococcus abyssi*, thermostable, structure quaternaire, expression

Expression and Characterization of the Alkaline Phosphatase from the Hyperthermophilic Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*

Abstract

Alkaline phosphatases (E.C. 3.1.3.1.) are defined as aspecific phosphomonoesterases, optimally active under alkaline conditions. Despite these enzymes are considered as ubiquitous, no alkaline phosphatase have been studied from a hyperthermophilic archaeon. The first step of the present work was to isolate the first alkaline phosphatase from such an organism: *Pyrococcus abyssi*, an euryarchaeon discovered in a deep-sea hydrothermal vent which grows optimally at 96°C. The *phoA* gene was identified on *P. abyssi* genome, cloned and the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*. This protein was purified, confirming *phoA* product was an alkaline phosphatase. Optimum temperature and pH were found to be 70°C and 11.0, respectively. The enzyme showed a high thermostability with half-lives at 100°C and 105°C of 18 hours and 5 hours, respectively. Metal dependancy was investigated, revealing its metalloenzyme nature, which is a general property of alkaline phosphatases. The second part of this project consisted in determining the quaternary structure of *P. abyssi* alkaline phosphatase. Several experiments, showed that the homodimer is the only active form. This quaternary structure, two subunits of 52 kDa each, appeared to be dependant of pH, buffer composition and enzyme metal content. The last part of this thesis deals with the expression of recombinant *P. abyssi* alkaline phosphatase. Investigation was performed about the expression of the enzyme by the *Escherichia coli* system using the T7 promoter regulation, with or without the co-expression of tRNA, related to rare codons. Recombinant *P. abyssi* alkaline phosphatase was also performed using the methylo-trophic yeast *Pichia pastoris* by secretion, in a 1.2 liters working volume fermentor.

Keywords : alkaline phosphatase, *Pyrococcus abyssi*, thermostable, quaternary structure, expression