

UNIVERSITE DE LIEGE
Centre Wallon de Biologie Industrielle
Service de Technologie Microbienne

**MISE EN EVIDENCE D'UN MECANISME BIOCHIMIQUE
EMPECHANT LA CROISSANCE DE LA SOUCHE
PSYCHROPHILE *RHODOTORULA AURANTIACA* A19
AUX TEMPERATURES MODEREES**

**Dissertation originale présentée par Ahmed SABRI
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

Année académique 2000-2001

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Ph. Thonart qui m'a accueilli dans son service. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour son attention bienveillante, ses suggestions et la patience dont il a fait preuve au cours de ces années de recherches. Je voudrais également le remercier de m'avoir permis de prendre conscience des réalités liées à la biotechnologie moderne et au monde industriel.

J'adresse mes sincères remerciements aux Drs. G. Baré, Ph. Jacques et M. Ongena pour leur disponibilité, leurs suggestions et pour le temps consacré à la correction de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux Drs. A. Jabrane et J-L. Arpigny pour leurs encouragements et pour leurs conseils éclairés lors de la lecture de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance envers les membres de ma commission d'encadrement pour l'attention qu'ils ont portée à ce travail. Et en particulier envers les Profs. C. Gerday et J. Coyette pour leur disponibilité et leurs remarques judicieuses.

Ma gratitude s'adresse également au Prof. J. De Graeve, à Mr. J-C. Van Heugen, du service de Toxicologie industrielle et de l'environnement, au Prof. E. De Pauw et à Mme C. Collette, du service de Chimie physique de l'Université de Liège, pour les analyses spectrales et leurs interprétations.

Je remercie également le Prof. J. Van Beumen, le Dr. B. Devreese et Mme I. Vandenberghe, du service de Biochimie et Ingénierie des Protéines de l'Université de Gand, pour les analyses des séquences internes et la composition en acides aminés de la thioestérase.

Ce travail de thèse a été subsidié partiellement par les fondations Camille Hela et Alice Seghers que je souhaite remercier ici.

Je remercie le personnel du CWBI pour son aide et son amitié et spécialement les Drs. M. Moussaïf, C. Hbid ainsi que Mrs. M. Amrouche, J-L. Belot, Ph. Delfosse, S. Hiligsmann, F. Wekers, K. Rauw, M. Nafil et Mme C. Ek pour leurs encouragements et leur sympathie.

Je ne laisserais passer l'occasion de remercier Mrs. N. El-Aji, F. Rabecki et M. Dejong pour leur contribution à la réalisation de ce travail lors de leurs stages de fin d'études.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à mon épouse pour m'avoir soutenu et supporté dans les périodes les plus difficiles de la réalisation de ma thèse.

Enfin, ma reconnaissance la plus profonde s'adresse à ma mère et à toute ma famille qui ont supporté mon absence et qui n'ont cessé de m'aider durant toutes les années consacrées à la réalisation de ma thèse.

Que toutes les personnes que j'ai oubliées de citer trouvent ici ma reconnaissance et mes remerciements.

A la mémoire de mon père

Le présent travail a fait l'objet des publications suivantes :

Sabri A., Jacques P., Weekers F., Bare G., Hiligsmann S., Moussaif M. and Thonart P. (2000) Influence of temperature on growth of psychrophilic and psychrotrophic members of *Rhodotorula aurantiaca* species. *App. Biochem. Biotech.*, **84-86**, 391-399.

Sabri A., Baré G., Jacques P., Jabrane A., Ongena M., Van Heugen J.C., Devreese B. and Thonart Ph. (2001) Influence of moderate temperatures on myristoyl-CoA metabolism and acyl-CoA thioesterase activity in the psychrophilic antarctic yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12691-12696.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. Adaptation au froid chez les micro-organismes.....	2
1.1. Les micro-organismes psychrophiles, historique et définitions.....	3
1.2. Les difficultés de la croissance aux basses températures	5
1.3. Stratégies d'adaptation au froid.....	6
1.3.1. Production de molécules protectrices	6
1.3.2. Adaptation des enzymes.....	6
1.3.3. Adaptation des membranes cellulaires.....	10
1.4. Incapacité des psychrophiles à se développer aux températures modérées	11
1.4.1. Inhibition de la synthèse des protéines.....	11
1.4.2. Inactivation des protéines fonctionnelles	12
1.4.3. Altération des structures cellulaires.....	12
2. Les acyl-CoAs dans le métabolisme cellulaire.....	14
2.1. Propriétés physico-chimiques des acyl-CoAs.....	15
2.2. Effet inhibiteur des acyl-CoAs lié à leur propriété amphiphile.....	16
2.3. Voies de synthèse des acyl-CoAs.....	17
2.4. Régulation de la concentration cellulaire des acyl-CoAs.....	17
2.4.1. Effet tampon des protéines ACBP et FABP à l'égard des acyl-CoAs.....	18
2.4.2. Rôle des thioestérases dans la régulation de la concentration des acyl-CoAs	19
2.5. Rôles physiologiques des acyl-CoAs.....	20
2.5.1. Rôles dans la régulation des événements membranaires.....	21
2.5.2. Rôle dans la régulation de l'expression génétique	21
2.5.3. Rôle dans l'acylation des protéines	22
3. Objectifs du travail	24

MATERIEL ET METHODES 25

1. Souches utilisées et milieux de culture.....	26
1.1. Souches utilisées.....	26
1.2. Identification des souches.....	26
1.3. Mise en collection des souches.....	27
1.4. Description des milieux de cultures.....	27
2. Cultures cellulaires.....	29
2.1. Cultures en fioles.....	29
2.2. Cultures en fermenteur.....	29
2.3. Régulation de la température des cultures.....	30
3. Récupération et lyse des cellules.....	30
4. Influence de la température de culture sur les paramètres cinétiques de croissance.....	31
5. Influence de la température de culture sur la morphologie cellulaire.....	32
6. Influence de la température de culture sur le protéome de <i>R. aurantiaca</i> A19.....	32
6.1. Séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique.....	33
6.2. Séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire.....	34
7. Influence de la température de culture sur le métabolisme des lipides chez <i>R. aurantiaca</i> A19.....	35
7.1. Influence de l'apport d'acides gras sur la croissance à 18°C.....	35
7.2. Détermination de la concentration intracellulaire des acyl-CoAs.....	35
7.3. Identification des acyl-CoA par spectrométrie de masse.....	38
8. Etude de l'activité thioestérase de la souche psychrophile.....	38
8.1. Méthode de dosage de l'activité thioestérase.....	38
8.2. Fractionnement de l'extrait cellulaire pour la mise en évidence de l'activité thioestérase.....	39
9. Purification de la thioestérase de <i>R. aurantiaca</i> A19.....	40
9.1. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium.....	41
9.2. Chromatographie sur colonne hydrophobe (phényl-Sepharose).....	41
9.3. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (Mono-Q).....	41
9.4. Chromatographie sur colonne hydrophobe (phényl-Superose).....	42
9.5. Dosage des protéines.....	42
10. Caractérisation de la thioestérase.....	43
10.1. Electrophorèse en gel dénaturant.....	43
10.2. Isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide.....	43
10.3. Composition en acides aminés de la thioestérase.....	44
10.4. Séquençage des peptides internes.....	45
10.5. Influence du pH sur la stabilité de l'enzyme.....	45
10.6. Influence du pH sur l'activité enzymatique.....	45

10.7. Etude de la glycosylation	46
10.8. Spécificité vis-à-vis du substrat	46
10.9. Etude du site actif	48
10.10. Thermodépendance.....	48
RESULTATS ET DISCUSSIONS	50
Chapitre 1 : Sélection d'une levure modèle et étude de sa cinétique de croissance.....	51
1.1. Identification et classification des levures isolées en Antarctique.....	52
1.2. Choix de la levure Rhodotorula aurantiaca A19.....	53
1.3. Comparaison de la cinétique de croissance de la souche psychrophile Rhodotorula aurantiaca A19 et de son homologue psychrotrophe de la même espèce R31345.....	54
1.3.1. Influence de la température sur le rendement en biomasse	55
1.3.2. Influence de la température sur la vitesse spécifique de croissance	56
1.3.3. Influence de la température sur la constante de demi-saturation (K_s) en glucose.....	57
1.3.4. Influence de la température sur les affinités spécifiques vis-à-vis du glucose	58
1.5. Discussion.....	59
Chapitre 2 : Influence des températures modérées (18-20°C) sur le protéome de la souche psychrophile R. aurantiaca A19	61
2.1. Analyse par électrophorèse bidimensionnelle du protéome de la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	61
2.2. Discussion.....	63
Chapitre 3 : Etude de l'effet des températures modérées sur la morphologie de la souche R. aurantiaca A19.....	64
3.1. Influence de la température d'incubation sur la morphologie de la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	64
3.2. Incidence des chocs de hautes températures sur la morphologie cellulaire.....	66
3.3. Discussion.....	68
Chapitre 4 : Influence des températures modérées sur le métabolisme des acyl-CoAs chez la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	69
4.1. Influence de l'addition d'acides gras sur la croissance aux températures supérieures limitant la croissance de la souche R. aurantiaca A19.....	70
4.2. Influence de la température sur la concentration cellulaire des acyl-coAs.....	71
4.2.2. Dosage par HPLC des acyl-CoAs	72
4.2.3. Identification par spectrométrie de masse.....	74

4.3. Discussion.....	75
Chapitre 5 : Production de l'activité thioestérase par la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	79
5.1. Production en fermenteur de la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	80
5.1.1. Production de la biomasse en fermenteur de 20 l.....	80
5.1.2. Production en fermenteur de 400 l.....	82
5.1.3. Discussion.....	82
5.2. Caractérisation de l'activité thioestérase.....	83
5.2.1. Lyse cellulaire et fractionnement de l'extrait	83
Chapitre 6 : Purification de la thioestérase de la souche psychrophile R. aurantiaca A19.....	86
6.1. Extraction et fractionnement des protéines cellulaires.....	86
6.2. Purification par chromatographie.....	87
6.2.1. Chromatographie hydrophobe sur phényl-Sepharose.....	87
6.2.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (Mono-Q)	88
6.2.3. Chromatographie sur colonne hydrophobe phényl-Superose.....	89
6.2.4. Bilan de purification	90
Chapitre 7 : Caractérisation de la thioestérase	91
7.1. Contrôle de la purification de la thioestérase.....	92
7.1.1. Contrôle de la purification par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.....	92
7.1.2. Contrôle de la purification par isoélectrofocalisation.....	93
7.1.3. Discussion.....	94
7.2. Localisation intracellulaire de la thioestérase.....	94
7.2.1. Etude de la glycosylation de la thioestérase	94
7.2.2. Influence du pH sur l'activité et la stabilité de la thioestérase.....	95
7.2.3. Discussion.....	97
7.3. Etude de la spécificité vis-à-vis du substrat et étude du site actif de la thioestérase	98
7.3.1. Spécificité vis-à-vis du substrat.....	98
7.3.2. Caractérisation du site actif	99
7.4. Analyse de la composition en acides aminés.....	100
7.5. Séquençage partiel de la thioestérase	103
7.6. Thermodépendance de la thioestérase.....	105
7.6.1. Thermostabilité des thioestérases	106

7.6.2. Détermination des températures optimales apparentes et des paramètres thermodynamiques d'activation des thioestérases.....	107
7.6.3. Thermodépendance des K_m et des efficacités physiologiques des thioestérases.....	108
7.6.4. Discussion.....	109

CONCLUSION.....	111
------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
--	------------

INTRODUCTION

1. Adaptation au froid chez les micro-organismes

La température est l'un des paramètres environnementaux les plus impliqués dans la régulation de la diversité et de la répartition des espèces. Cette diversité est maximale aux températures modérées (20-40°C) et diminue progressivement de part et d'autre de cet intervalle thermique. Les micro-organismes sont pratiquement les seuls à être capables de se développer aux températures extrêmes et, de ce fait, ont colonisé des niches écologiques où règnent des températures allant de 0 à 110°C.

Selon leurs aptitudes à se développer en dessous de 20°C, entre 20 et 50°C, ou au delà de 50°C, les micro-organismes sont classés respectivement en psychrophiles, mésophiles et thermophiles. Cependant, ces distinctions restent en partie arbitraires étant donné le caractère plus ou moins marqué de la psychrophilie ou la thermophilie.

1.1. Les micro-organismes psychrophiles, historique et définitions

La capacité de se développer au voisinage de 0°C est décrite pour la première fois par Forster en 1887 quand il isole une bactérie phosphorescente sur des poissons conservés à basse température. Par la suite, en 1892, ce même auteur isole plusieurs autres bactéries à partir de différents biotopes (eau douce, eau de mer, aliments conservés au froid, intestins de poissons...). Schmidt (1902) propose alors le terme 'psychrophile' pour désigner toutes les bactéries pouvant se multiplier à 0°C. Un an plus tard, Müller déclenche une vaste polémique en contestant l'existence de vrais psychrophiles. En effet, découvrant que ces bactéries se développent parfaitement aux températures modérées (20-30°C), il propose de les considérer comme des mésophiles tolérant les basses températures plutôt que comme bactéries psychrophiles 'qui aiment le froid'. Depuis lors, plusieurs autres termes et définitions ont été proposés pour désigner ces micro-organismes (Tableau 1).

Tableau 1. Termes utilisés pour décrire les bactéries capables de se développer aux basses températures d'après Morita (1975) et Inniss (1975).

Terme	Auteur
Bactéries glaciales	Forster (1892)
Rhigophiles	Forster (1892)
Psychrophiles	Schmidt (1902)
Psychrotolérants	Kruse (1910)
Psychrocartericus	Rubentschik (1925)
Psychrobes	Horowitz (1933)
Thermophobes	Edsall (1947)
Cryophiles	Edsall (1947)
Psychrophiles facultatifs	Hucker (1954)
Psychrophiles obligatoires	Hucker (1954)
Psychrotrophes	Eddy (1960)

Ce n'est qu'en 1948 que Borg a pu démontrer, pour la première fois, l'existence de vrais psychrophiles incapables de se développer aux températures modérées, en isolant la bactérie *Citophaga psychrophila*, agent de la maladie "cold water" chez le saumon (Morita, 1975).

Dans cette confusion et en l'absence de certitudes sur l'existence de vrais psychrophiles, plusieurs définitions sont proposées. Par exemple, l'édition de 1957 du dictionnaire de microbiologie définit les psychrophiles comme étant des bactéries ayant un optimum de croissance inférieur à 15°C.

En 1975, après la confirmation de l'existence de plusieurs autres micro-organismes incapables de se développer aux températures modérées, Morita (1975) propose de réserver le terme 'psychrophile' pour désigner uniquement les micro-organismes ayant un optimum de croissance en dessous de 15°C et qui ne se développent pas au delà de 20°C. Il utilise le terme 'psychrotrophe' pour désigner les micro-organismes qui peuvent se développer à basses températures et qui ont un optimum de croissance au delà de 15°C. Le terme 'psychrotolérant' est également adopté, par après, pour distinguer les espèces mésophiles qui peuvent s'acclimater aux basses températures (Feller *et al.*, 1997).

Ces définitions sont actuellement fort contestées car elles se basent uniquement sur la vitesse de croissance pour définir l'optimum thermique. En effet, récemment, des auteurs ont démontré que sur les plans biochimique et physiologique, une vitesse de croissance rapide ne reflète pas nécessairement un bon état physiologique. La figure 1 montre le comportement d'une bactérie antarctique *Alteromonas haloplanctis* A23 face à l'augmentation de la température de culture.

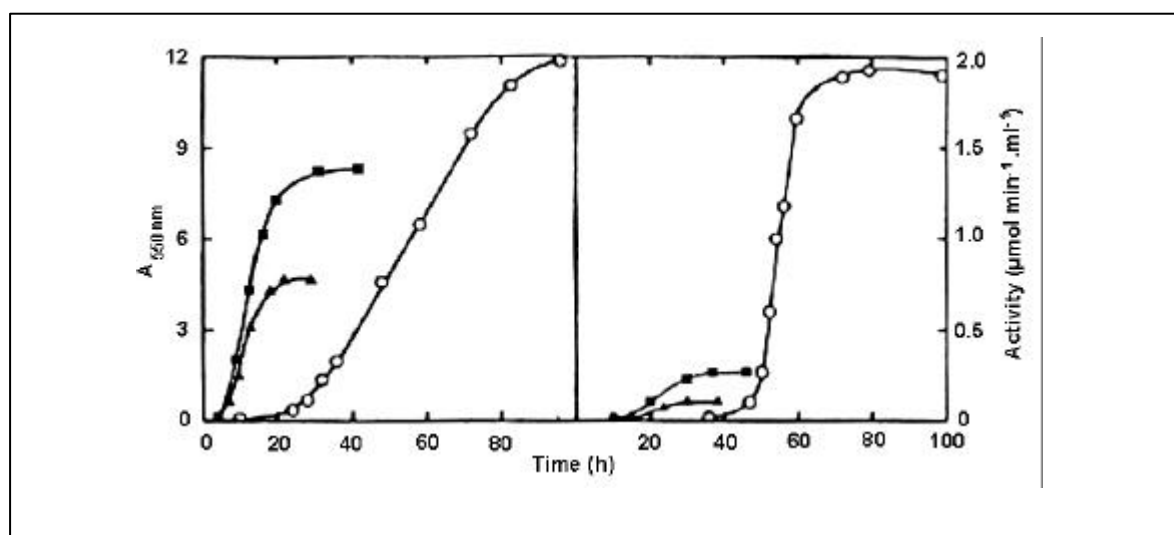


Figure 1. Influence de la température de culture sur la croissance d'une bactérie antarctique *Alteromonas haloplanctis* A23 (à gauche) et sur sa production d'α-amylase (à droite). Les cultures sont réalisées à 4°C (o), 18°C (■) et 25°C (▲) (Feller *et al.*, 1994).

Contrairement à la vitesse de croissance, la production de biomasse et la sécrétion d' α -amylase, par la bactérie adaptée au froid, *Alteromonas haloplanctis* A23, sont nettement défavorisées par l'augmentation de la température de culture. Ce comportement, très répandu chez les micro-organismes adaptés aux basses températures, témoigne d'une dégradation de l'état physiologique des cellules avec l'augmentation de la température (Feller *et al.*, 1994). Pour déterminer l'optimum thermique, il est donc plus judicieux, dans le cas des micro-organismes psychrophiles, de prendre en considération des critères biochimiques et physiologiques plutôt que la seule vitesse de croissance.

Par ailleurs, Gerday *et al.* (2000) considèrent que les limites entre ces différents groupes d'organismes adaptés au froid ne sont pas très franches et que, de ce fait, il existe un continuum dans les comportements thermiques à l'image du continuum de température dans la nature.

1.2. Les difficultés de la croissance aux basses températures

La croissance d'un micro-organisme nécessite une multitude de réactions dont la vitesse dépend de la température de culture. L'ampleur de cette dépendance apparaît clairement lorsqu'on considère l'équation d'Arrhenius :

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

où k est la constante de vitesse de la réaction, E_a est l'énergie d'activation, A est une constante relative à la fréquence de collision et aux facteurs stériques, R est la constante des gaz parfaits et T , la température absolue.

Cette équation montre que la constante de vitesse (k) d'une réaction dépend essentiellement de l'énergie d'activation (E_a) et de la température absolue (T). Il est, dès lors, facile de comprendre les problèmes que pose le déficit d'énergie lors de la croissance aux basses températures.

Outre l'effet négatif sur la vitesse des réactions, le froid affecte également la qualité des échanges avec le milieu ambiant. En effet, la congélation de l'eau et la rigidité des membranes biologiques sont autant d'éléments qui s'opposent à la croissance aux basses températures.

1.3. Stratégies d'adaptation au froid

Malgré toutes les contraintes thermiques, les zones froides ne constituent nullement des déserts écologiques mais sont, au contraire, colonisées par une multitude d'espèces de micro-organismes.

Ceci dit, tout porte à croire que ces organismes ont développé de remarquables stratégies d'adaptations pour compenser le déficit énergétique.

1.3.1. Production de molécules protectrices

Durant les 20 dernières années, de multiples stratégies d'adaptation au froid ont été dévoilées. La première adaptation au froid extrême concerne la composition du cytoplasme qui distingue les organismes psychrophiles de leurs homologues mésophiles et thermophiles. En effet, les psychrophiles produisent des solutés (glycérol, sorbitol, tréhalose...) qui protègent les structures cellulaires et garantissent une osmolarité cellulaire élevée pour lutter contre la déshydratation (Storey et Storey, 1988). De plus les psychrophiles peuvent également produire des protéines spécifiques (cold-shock proteins (csp), protéines de nucléation, protéines antigél...) qui permettent, entre autre, de limiter la croissance des cristaux de glace et évitent la destruction des membranes et des structures macromoléculaires (Storey et Storey, 1988).

1.3.2. Adaptation des enzymes

D'après l'équation d'Arrhenius, toute baisse de la température entraîne une diminution exponentielle de la vitesse de réaction. Cet effet est souvent exprimé par le rapport des constantes de vitesse mesurées à 2 températures séparées de 10°C : $Q_{10} = k_{T+10} / k_T$.

La valeur du Q_{10} est en moyenne proche de 3, par conséquent, la réaction peut être jusqu'à 80 fois plus lente à 0°C qu'à 40°C. Cependant, des adaptations moléculaires affectant en particulier les enzymes, permettent le maintien des flux métaboliques adéquats. Différentes études ont démontré que les organismes psychrophiles produisent des enzymes dont l'efficacité est accrue entre 0 et 30°C (Arpigny *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1996, 1997 ; Gerday

et al., 1997). Deux paramètres essentiels doivent être pris en considération pour mettre en évidence les stratégies d'adaptation au niveau enzymatique : d'une part, la constante catalytique k_{cat} qui reflète le nombre d'événements catalytiques qu'effectue une enzyme par unité de temps et, d'autre part, l'affinité pour le substrat qui est en relation avec la constante de Michaelis-Menten, K_m .

Le comportement catalytique d'une enzyme et sa liaison avec le substrat dépendent des interactions non covalentes de type hydrophobe ou électrostatique. Les premières se forment en absorbant de l'énergie et sont défavorisées par les basses températures ; les secondes, par contre, s'établissent de façon exothermique et sont favorisées par une température faible. Dès lors, il est concevable que l'adaptation aux basses températures d'une enzyme fasse appel à de fins ajustements dans les proportions et la localisation de ces liaisons (Feller *et al.*, 1997).

1.3.2.1. Optimisations structurales

De ce qui précède, on peut dire que l'évolution d'une enzyme est le résultat d'un compromis moléculaire entre la flexibilité, indispensable à son activité, et la nécessité de stabiliser son architecture par un réseau d'interactions assez ferme.

L'un des caractères les plus souvent rencontrés chez les enzymes d'organismes psychrophiles est certainement leur activité spécifique élevée. En effet, grâce à un affaiblissement du réseau d'interactions moléculaires, ces enzymes réussissent à abaisser suffisamment le seuil d'énergie libre d'activation de la réaction (ΔG^*) et à accélérer la vitesse de la catalyse (Low *et al.*, 1973 ; Hochachka et Somero, 1984 ; Arpigny *et al.*, 1994).

Différents facteurs structuraux pouvant assouplir la chaîne polypeptidique ont été recensés dans les quelques structures tridimensionnelles disponibles. La tendance générale se résume dans la substitution de certains résidus d'acides aminés pour diminuer les interactions ioniques et aromatiques, minimiser l'hydrophobicité et l'encombrement stérique dans le cœur de la protéine et accentuer le caractère hydrophile de sa surface (Feller *et al.*, 1997).

La flexibilité qui en résulte se manifeste par des changements assez spectaculaires de la thermodépendance de l'activité et de la stabilité de l'enzyme même si les éléments de structure principaux ne s'en trouvent généralement pas modifiés (figures 2A et 2B). A titre d'exemple, la figure 2A montre la thermodépendance de la xylanase d'une levure antarctique, *Cryptococcus adeliae*, qui adopte le profil type d'une enzyme psychrophile. En effet, en

comparaison avec la xylanase de son homologue mésophile *Cryptococcus albidus*, cette enzyme a une courbe de thermodépendance décalée d'environ 10°C vers les basses températures et une activité spécifique plus élevée entre 4 et 45°C et ce, malgré le fait que les modèles tridimensionnels restent identiques, comme on peut le constater dans la figure 3.

Par ailleurs, la thermosensibilité de ces enzymes représente une autre conséquence de la grande flexibilité structurale. Cette caractéristique est aussi souvent observée avec les enzymes d'organismes psychrophiles que leur grande efficacité aux basses températures (figure 2B).

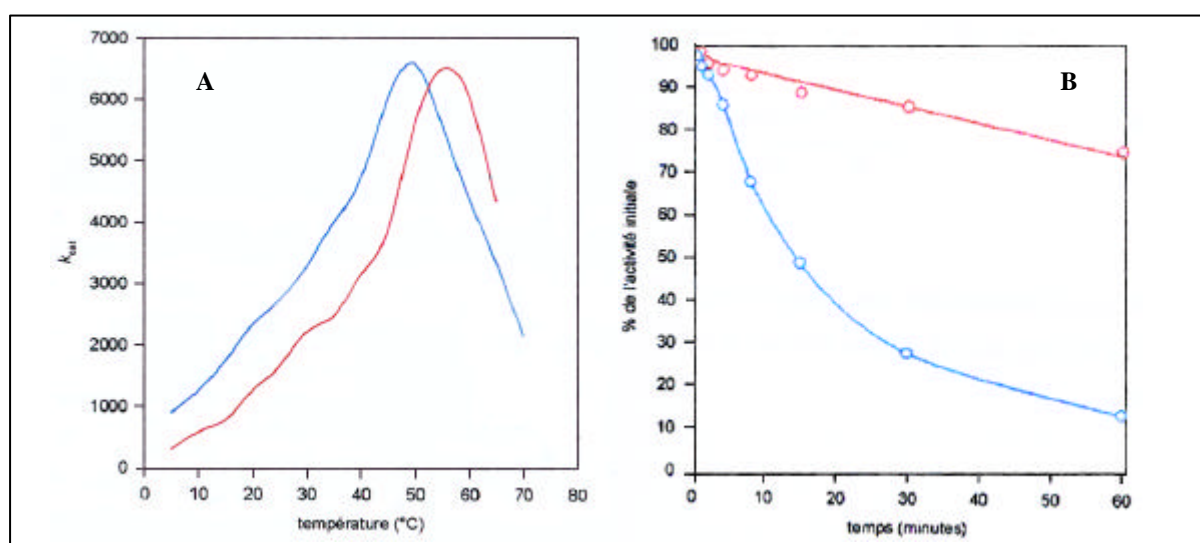


Figure 2. Thermodépendance (A) et stabilité thermique à 40°C (B) des xylanases des levures psychrophile *Cryptococcus adeliae* (en bleu) et mésophile *Cryptococcus albidus* (en rouge) (Petrescu, 1998).

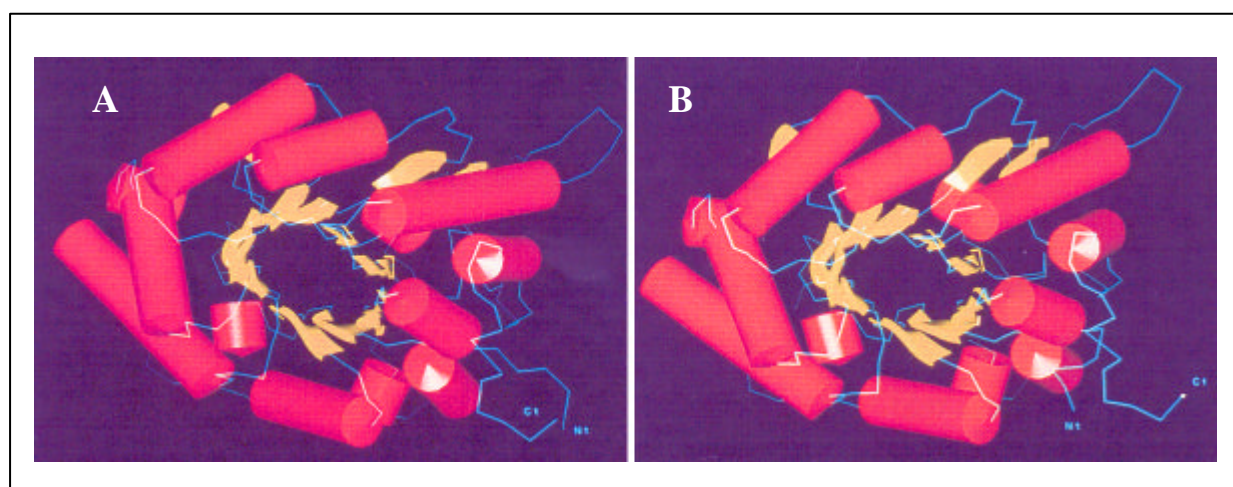


Figure 3. Modèles tridimensionnels des xylanases d'une levure psychrophile *Cryptococcus adeliae* (A) et de son homologue mésophile *Cryptococcus albidus* (B) (Petrescu, 1998).

1.3.2.2. Influence de la température sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat

Les remaniements structuraux évoqués ci-dessus améliorent certainement l'activité spécifique d'une enzyme. Cependant, ils ne peuvent profiter pleinement au micro-organisme que lorsque l'enzyme est en condition saturante en substrat. Or, la plupart des enzymes intracellulaires se trouvent en présence de concentrations relativement faibles en substrat, voisines de la valeur de K_m . On conçoit donc que l'efficacité d'une enzyme est mieux évaluée par le rapport k_{cat}/K_m . La stratégie d'adaptation, dans ce cas, pourrait résider dans la diminution de la valeur du K_m qui correspond à une meilleure affinité pour le substrat (Genicot *et al.*, 1987 ; Feller *et al.*, 1992). Si le k_{cat} d'une enzyme augmente nécessairement avec la température, son K_m par contre évolue de façon très variable (tableau 2). On peut cependant remarquer que les valeurs minimales des K_m coïncident généralement avec les températures des environnements où évoluent les organismes (Somero et Hochachka, 1968).

Tableau 2. Dépendance vis-à-vis de la température des constantes catalytiques (k_{cat}) et des constantes de Michaelis-Menten (K_m) de quelques enzymes produites par des organismes adaptés au froid.

Enzyme	Substrat	Température (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m	Référence
Xylanase (<i>Cryptococcus adeliae</i>)	Xylane d'avoine			mg/ml	Petrescu (1998)
		5	15	2,5	
		10	22	3	
		15	32	4	
		20	42	4,2	
		25	47	3,8	
30	59	3,5			
Subtilisine (<i>Bacillus</i> TA39)	Succ-FAAF-pNA			μM	Narinx (1995)
		5	32	26	
		15	80	27	
		25	115	37	
		35	149	42	
45	203	42			
Pyruvate kinase (<i>Salmo trutta</i>)	Pyruvate			μM	Somero et Hochachka (1968)
		5		250	
		10		110	
		15		90	
		20		100	
25		230			
a-Amylase (<i>Alteromonas haloplanctis</i>)	Amidon			g.l ⁻¹	Feller <i>et al.</i> (1994)
		4	490	1,09	
25	1363	1,27			
b-Lactamase (<i>Pseudomonas immobilis</i>)	Nitrocefin			μM	Feller <i>et al.</i> (1997)
		7	984	226	
30	1407	51			

1.3.3. Adaptation des membranes cellulaires

Les enzymes ne sont pas les seules macromolécules dont on doit tenir compte pour comprendre la psychrophilie. Les membranes biologiques jouent également un rôle physiologique capital étant donné qu'elles contrôlent les échanges moléculaires. Là encore, ce sont des protéines qui permettent à la cellule de capter et de transporter les nutriments et les signaux de natures diverses. Ces processus nécessitent de leur part une grande mobilité au sein de la structure lipidique. Or, aux basses températures, les phospholipides membranaires ont tendance à se figer ce qui a pour effet de réduire ces échanges vitaux.

Plusieurs revues résument les connaissances acquises sur les stratégies qui permettent aux psychrophiles de maintenir une fluidité membranaire adéquate aux basses températures (Inniss, 1975 ; Russell, 1990 ; Gounot, 1991). Tous ces travaux s'accordent sur le fait que les psychrophiles arrivent à maintenir la fluidité de leurs membranes en modifiant la nature des acides gras qui les composent. En effet, les membranes des organismes vivant à basses températures sont particulièrement riches en acides gras insaturés et à courtes chaînes (tableau 3) (Chan *et al.*, 1971 ; Bhakoo et Herbert, 1979 ; Canillac *et al.*, 1982 ; Russell et Fukunaga, 1990). Ces derniers, ayant un point de fusion beaucoup plus bas que celui des acides gras saturés, permettent aux membranes de garder une fluidité adéquate.

Tableau 3. Pourcentage des différents acides gras présents dans les lipides totaux chez deux souches, l'une psychrophile et l'autre mésophile du genre *Arthrobacter*. Les températures de culture sont respectivement de 2 et 25 °C (Canillac *et al.*, 1982).

Acides gras	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arthrobacter glacialis</i>
	(mésophile) 25°C	(psychrophile) 2°C
	%	%
C13	< 0,1	2,6
C14	2,6	5
C15	72,7	69,4
C16	10,6	18,7
C17	13,6	4,2
Acides gras linéaires*	8	1,1
Acides gras ramifiés*	91,9	98,6
Acides gras insaturés	2,6	31,2

* : Pourcentage obtenu à des températures de culture de 10 °C pour la souche psychrophile et à 32 °C pour la souche mésophile.

1.4. Incapacité des psychrophiles à se développer aux températures modérées

Si les micro-organismes psychrophiles sont caractérisés par leur capacité à se développer efficacement au voisinage de 0°C, une température supérieure à 20°C leur est généralement fatale. D'un point de vue thermodynamique, cela pourrait paraître paradoxal sachant que les températures entre 20 et 40°C sont généralement les plus favorables aux processus catalytiques. Alors que la littérature regorge d'informations concernant les stratégies mises en jeu par les micro-organismes psychrophiles pour se développer au voisinage de 0°C, peu de données récentes, par contre, sont disponibles pour expliquer cette incapacité de croissance de ces mêmes organismes aux températures modérées. Ce constat, apparemment banal, a pour effet de limiter considérablement les potentialités d'exploitation et l'essor industriel des organismes psychrophiles.

Dans les années 60, de nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer le phénomène, sans pour autant être suffisamment étayées.

1.4.1. Inhibition de la synthèse des protéines

Micrococcus cryophilus est l'un des micro-organismes les mieux étudiés pour son incapacité de croissance aux températures modérées. Malcolm (1968) a pu démontrer qu'au voisinage de 25°C, cette bactérie produit une amino-acyl-ARNt synthétase inactive qui a pour effet d'empêcher la traduction des ARN_m. Une telle inhibition de la synthèse de protéines est observée dans le cas de plusieurs autres micro-organismes (Inniss, 1975). Chez *Bacillus psychrophilus* et *Bacillus insolitus*, Bobier *et al.* (1972) suggèrent que la température maximale de croissance est fixée par la stabilité thermique des ribosomes. En effet, *in vitro*, les ribosomes de ces deux bacilles, ainsi que ceux de plusieurs espèces du genre *Clostridium*, sont relativement plus sensibles à la dénaturation thermique que ceux de leurs homologues mésophiles (Nash *et al.*, 1969 ; Bobier *et al.*, 1972 ; Irwin *et al.*, 1973). Toutefois, le lien de cause à effet entre l'incapacité de croissance aux températures modérées et la thermosensibilité des ribosomes n'est pas clairement établi, d'autant plus que la thermosensibilité des ribosomes est démontrée *in vitro* à des températures largement au-dessus de celles qui provoquent l'arrêt de la croissance des organismes concernés.

1.4.2. Inactivation des protéines fonctionnelles

La thermosensibilité représente une caractéristique assez répandue chez les enzymes et les protéines fonctionnelles d'organismes psychrophiles (Feller *et al.*, 1994). En tenant compte de cette particularité, il est tentant de croire que la dénaturation thermique des enzymes serait l'une des causes qui limitent la croissance des psychrophiles aux basses températures (Inniss, 1975 ; Russell, 1990 ; Gounot, 1991). Cependant, cette hypothèse est peu probable vu le nombre très limité de cas connus où la dénaturation prend des proportions importantes aux températures maximales qui limitent la croissance.

1.4.3. Altération des structures cellulaires

La morphologie des micro-organismes psychrophiles est particulièrement sensible à la température de croissance. Un des effets les plus spectaculaires des températures modérées est perceptible par les profondes déformations qui affectent les structures cellulaires. Les causes de ce phénomène sont encore mal connues. Chez des espèces du genre *Vibrio*, Haight et Morita (1966) montrent que l'induction des processus de lyse cellulaire par les températures modérées ne peut être arrêtée par un retour aux basses températures. Ces auteurs déduisent que la lyse cellulaire est due à des enzymes autolytiques qui, une fois produites, restent actives aux basses températures. Cependant, en se basant sur les données bibliographiques concernant les caractéristiques physiques des membranes des psychrophiles, Russell (1990) suggère que la lyse cellulaire est plutôt liée à l'hyperfluidité membranaire souvent observée chez ces organismes.

Chez les levures psychrophiles, les déformations morphologiques consistent en un allongement des bourgeons, une forte vacuolarisation du cytoplasme et un accroissement de la taille cellulaire (Rabecki, 1997). Des observations similaires sont décrites avec plusieurs mutants thermosensibles chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell, 1974 ; Thonart *et al.*, 1976). A température non permissive (37°C), ces mutants sont affectés dans le cycle de division cellulaire (d'où leur nom 'mutants cdc'). La figure 5 montre quelques formes cellulaires observées chez ces mutants.

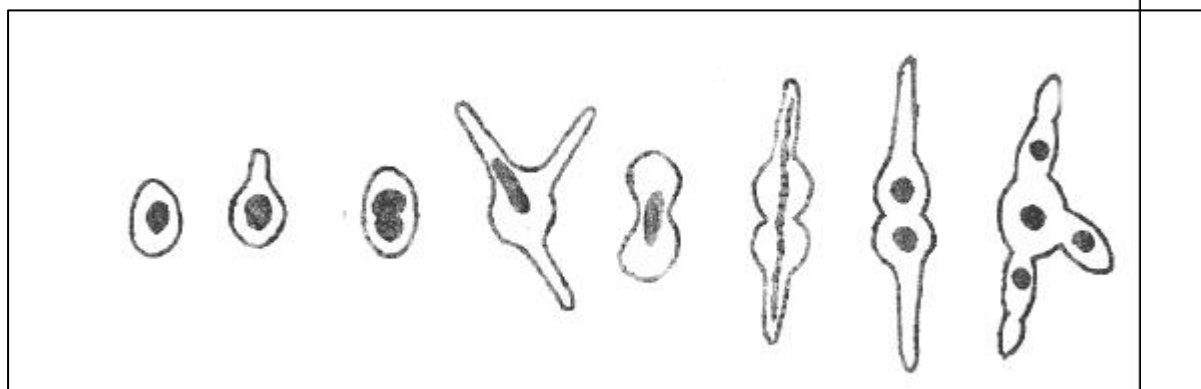


Figure 5. Différentes anomalies morphologiques observées chez les mutants thermosensibles de *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell, 1974 ; Thonart *et al.*, 1976).

Récemment, plusieurs auteurs ont montré que, chez les levures, des mutations au niveau des enzymes impliquées dans le métabolisme des acyl-coenzymes A donnent des mutants thermosensibles dont la morphologie cellulaire est fortement altérée aux températures non permissives. Ces mutants, une fois transférés aux températures non permissives, manifestent les mêmes perturbations morphologiques que celles observées chez les levures psychrophiles aux températures modérées (figure 6) (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1992, 1991 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Knoll *et al.*, 1995 ; Ashrafi *et al.*, 1998).

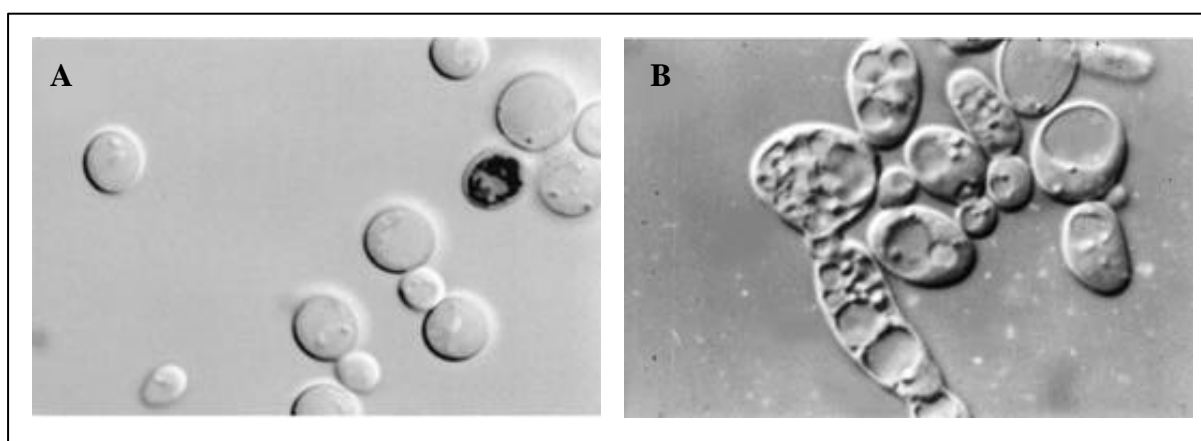


Figure 6. Perturbations morphologiques typiques des mutants thermosensibles *nmt* de *Saccharomyces cerevisiae* décrites par Johnson *et al.* (1994). Ces mutants sont affectés au niveau d'une de leurs acyl-transférases. **A** : Morphologie normale du mutant *nmt1* cultivée à 24°C. **B** : Perturbations morphologiques observées lors des cultures à des températures supérieures à 30 °C.

Le métabolisme des acyl-CoAs pourrait donc avoir un lien avec les altérations morphologiques observées chez les levures psychrophiles. C'est pourquoi celui-ci sera détaillé ci-après.

2. Les acyl-CoAs dans le métabolisme cellulaire

Les acyl-CoAs ont longtemps été considérés comme de simples intermédiaires dans la synthèse des lipides et la ***β***-oxydation des acides gras. La découverte des processus d'activation par acylation de certaines protéines a entraîné un grand regain d'intérêt pour ces molécules et l'élucidation de leurs rôles dans la régulation des différents processus cellulaires (Towler *et al.*, 1988). Depuis lors, la recherche portant sur le métabolisme de ces molécules a montré que le rôle joué par les acyl-CoAs est complexe et dépasse largement celui de simple intermédiaire. Entre autres, ces molécules sont impliquées dans le transport membranaire (Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998), la catalyse enzymatique (Yamakawa *et al.*, 1990), l'expression génétique (Black *et al.*, 2000), la division cellulaire (Knudsen *et al.*, 1999, 2000), la formation de vacuoles (Pfanner *et al.*, 1989, 1990), les processus de fusion des membranes (Comerford et Dawson, 1993), ...

2.1. Propriétés physico-chimiques des acyl-CoAs

Les acyl-CoAs sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête hydrophile, le coenzyme A, et d'une chaîne hydrophobe, l'acide gras. Ces deux parties sont liées par une liaison thioester (figure 7).

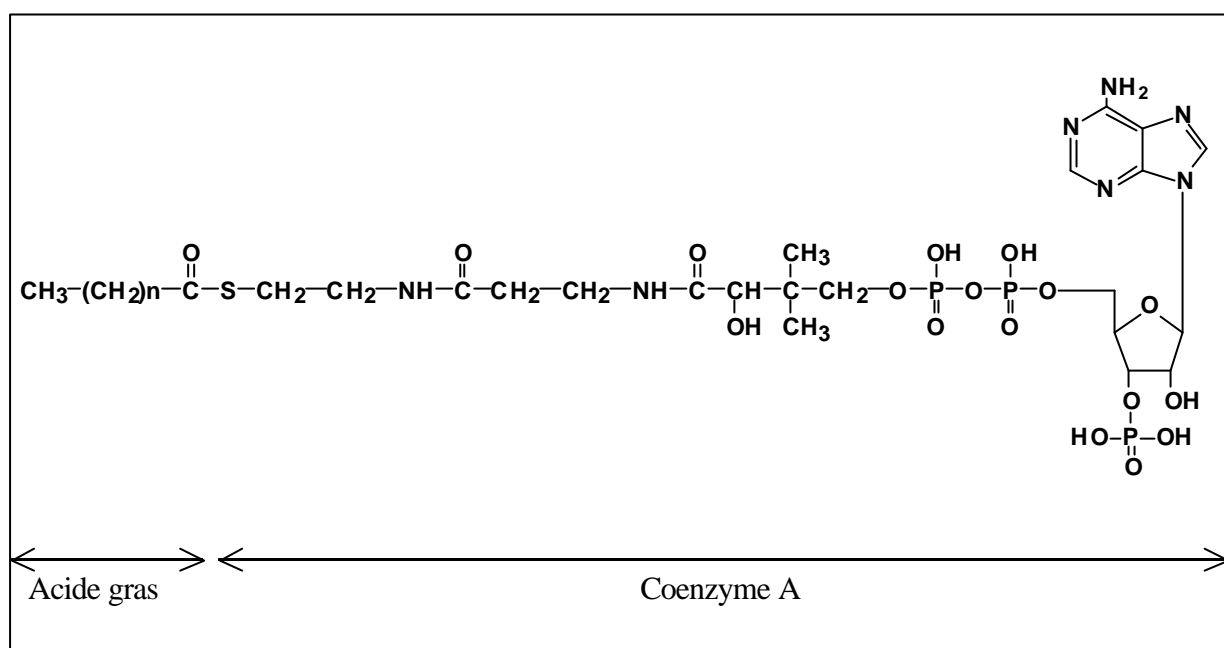


Figure 7. Structure d'un acyl-CoA.

Le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne d'acide gras est pratiquement toujours pair et varie généralement entre 4 et 24. Par convention, les acyl-CoAs sont dits à chaîne courte lorsque le nombre d'atomes de carbone est en dessous de 6, à chaîne moyenne lorsque le nombre d'atomes de carbone est compris entre 6 et 14 et à chaîne longue lorsque le nombre d'atomes de carbone est supérieur à 14.

De part leur structure amphiphile, les acyl-CoAs se comportent comme des détergents qui, aux concentrations élevées, s'agrègent spontanément et forment des micelles où les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur. La concentration micellaire critique des acyl-CoAs varie entre 30 et 60 μM en fonction de la taille de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras et des conditions du milieu (Powell *et al.*, 1981 ; Faergeman et Knudsen, 1997).

2.2. Effet inhibiteur des acyl-CoAs lié à leur propriété amphiphile

La structure amphiphile confère à ces molécules une grande affinité vis-à-vis des membranes cellulaires ($K_D \pm 6.10^{-6}$ M) (Knudsen *et al.*, 1999, 2000). De ce fait, une augmentation de leur concentration entraîne une accumulation au niveau des phospholipides, ce qui affecte la perméabilité et l'intégrité membranaire.

Outre cet effet néfaste sur les membranes cellulaires dû à des concentrations excessives des acyl-CoAs, plusieurs auteurs montrent que les acyl-CoAs inhibent également de façon non spécifique une multitude d'enzymes et de voies métaboliques (tableau 4).

Par ailleurs, chez l'homme, un certain nombre de maladies métaboliques comme le syndrome de Reye et certaines formes de la mort subite des nouveaux-nés sont causées par une intoxication des cellules nerveuses suite à une accumulation excessive des acyl-CoAs (Roe *et al.*, 1986).

Tableau 4. Exemples d'inhibition non spécifique des acyl-CoAs sur plusieurs enzymes et voies métaboliques et sur des processus biologiques.

	Constante d'inhibition (μ M)	Références
Métabolisme des lipides		
- Carboxylase d'acétyl-CoA	Ki $5,5.10^{-3}$	Rasmussen <i>et al.</i> (1994)
- Déshydrogénase d'acyl-CoA	Ki 0,2	Powell <i>et al.</i> (1987)
- Synthèse de phospholipides	IC_{30}^* 1,9	Lehrer <i>et al.</i> (1981)
- Transférase d'acyl-carnitine	Ki 20	Murthy et Pande (1987)
- Lipase	Ki 0,5	Jepson et Yeaman (1992)
Métabolisme énergétique		
- Glucose-6-phosphatase	Ki 50	Fulceri <i>et al.</i> (1995)
- Déshydrogénase du pyruvate	Ki 30	Moore <i>et al.</i> (1996)
Processus de fusion de membrane		
- Mécanismes d'endocytose et exocytose et de fusion membranaire.	Variable	Pfanner <i>et al.</i> (1989), (1990)
- Fusion de vésicules au réticulum endoplasmique.	Variable	Comerford et Dawson (1993)
Pompes à ions		
- Pompe à Ca^{2+} dépendante du GTP (réticulum endoplasmique)	Ki 0,5	Pys-Sikora <i>et al.</i> (1994)
Expression génétique		
- Carboxylase d'acétyl-CoA	Non déterminée	Kamiryo <i>et al.</i> (1976)
- FadR <i>E coli</i> (facteur de transcription)	Ki $5 \cdot 10^{-3}$	Dirusso <i>et al.</i> (1992); Black <i>et al.</i> (2000)
Catalyse enzymatique		
- Proline endopeptidase	Ki 9	Yamakawa <i>et al.</i> (1990)

* IC_{30} : concentration inhibitrice en μ M pour laquelle 30 % de l'activité est inhibée.

2.3. Voies de synthèse des acyl-CoAs

Les acyl-CoAs sont synthétisés dans le cytoplasme par deux voies distinctes. La première voie est une simple activation des acides gras préexistants, exogènes ou endogènes, provenant de l'hydrolyse de triglycérides ou de phospholipides. Cette voie est catalysée par l'acyl-CoA synthétase dont on connaît, chez *S. cerevisiae*, 4 isoformes différents codés par les gènes *FAA1*, *FAA2*, *FAA3* et *FAA4* (Johnson *et al.*, 1994).

La deuxième voie, par contre, est une néosynthèse qui se fait à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA. Chez les eucaryotes, la néosynthèse est réalisée par un complexe multienzymatique, homodimère, l'acide gras synthétase (FAS). Chaque protomère de ce complexe réunit toutes les activités enzymatiques nécessaires pour la synthèse (Paltauf *et al.*, 1994, Waku, 1992). Les principaux produits de la FAS sont le palmitoyl-CoA (C16-CoA) et le stéaroyl-CoA (C18-CoA) qui servent de précurseurs pour la synthèse de toute une variété d'autres acyl-CoAs (Singh *et al.*, 1985 ; Hori *et al.*, 1987).

2.4. Régulation de la concentration cellulaire des acyl-CoAs

A cause de la grande réactivité des acyl-CoAs, leur concentration est étroitement contrôlée à différents niveaux cellulaires. La concentration totale des acyl-CoAs varie entre 5 et 160 μM dont la forme libre (non complexée par des protéines spécifiques) est de l'ordre du nanomolaire (1-20 nM) et ne doit en aucun cas dépasser 200 nM (Knudsen *et al.*, 1999, 2000 ; Faergeman et Knudsen, 1997).

La concentration cellulaire en acyl-CoAs est la résultante de l'équilibre entre leur synthèse et leur utilisation. En effet, la rétroinhibition qu'exercent les acyl-CoAs sur les enzymes impliquées dans leur biosynthèse est un facteur déterminant dans la régulation de leur concentration. La carboxylase de l'acétyl-CoA est l'enzyme responsable de la formation du malonyl-CoA qui est une étape clef dans la néosynthèse des acyl-CoAs par l'acide gras synthétase (FAS). Cette carboxylase est inhibée par le palmitoyl-CoA avec une constante d'inhibition K_i de 5,5 nM (Rasmussen *et al.* 1994). Chez *S. cerevisiae*, le niveau d'expression de cette activité serait également sensible à la variation de la concentration des acyl-CoAs (Kamiryo *et al.*, 1976). Les acyl-CoAs exercent également une rétroinhibition sur l'acyl-CoA

synthétase. Cette enzyme est rétroinhibée par le palmitoyl-CoA avec un K_i de 4 μM (Pande, 1973).

Enfin, l'utilisation des acyl-CoAs dans les réactions d'élongation, de désaturation et d'estérification (synthèse de triglycérides, acylation de protéines, ...) ainsi que leur dégradation par **b**-oxydation dans les processus de production d'énergie sont les principaux facteurs qui définissent leur concentration cellulaire (Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000 ; Shrago, 2000).

Knudsen *et al.* (1999) suggèrent également que la compartimentation des acyl-CoAs dans des organites cellulaires (peroxysomes, mitochondries, ...) pourrait également intervenir dans la limitation de l'intoxication cellulaire par ces molécules.

2.4.1. Effet tampon des protéines ACBP et FABP à l'égard des acyl-CoAs

Les ACBP (Acyl-CoA Binding Protein) et les FABP (Fatty Acyl Binding Protein) constituent deux familles de protéines dont les masses moléculaires respectives sont de 10 kDa et 15 kDa. Ces deux protéines cytoplasmiques jouent un rôle dans la modulation de la concentration des acyl-CoAs ainsi que dans leur transport et leur disponibilité pour les diverses voies métaboliques (Faergeman et Knudsen 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000).

Rasmussen *et al.* (1993) ont démontré que, dans les conditions normales, le contenu cellulaire des ACBP et des acyl-CoAs des hépatocytes du rat sont respectivement de 55 μM et 62 μM . La forte affinité avec laquelle des ACBP fixent les acyl-CoAs ($K_D=1$ nM) réduit considérablement les risques d'intoxication par l'accumulation des acyl-CoAs libres. D'autant plus que le rapport des concentrations acyl-CoAs/ACBP est proche de l'unité.

Lorsque les sites de fixation des ACBP sont saturés, les acyl-CoAs entrent en compétition avec les acides gras au niveau des sites des FABP. En effet, les FABP fixent préférentiellement des acides gras libres mais sont capables de fixer également les acyl-CoAs avec un K_D d'environ 1 μM (Rolf *et al.*, 1995). Leur concentration cellulaire est d'environ 300 μM . Les FABP assurent de ce fait avec les ACBP le rôle d'un réservoir tampon qui évite des fluctuations trop importantes dans la concentration des acyl-CoAs libres et réduit leur concentration à des valeurs en dessous de 2 μM . La figure 8 montre que les acyl-CoAs sont d'abord fixés par les ACBP qui assurent la régulation de leur concentration entre 0 et 50 μM , les FABP intervenant au delà de 50 μM (Faergeman et Knudsen, 1997).

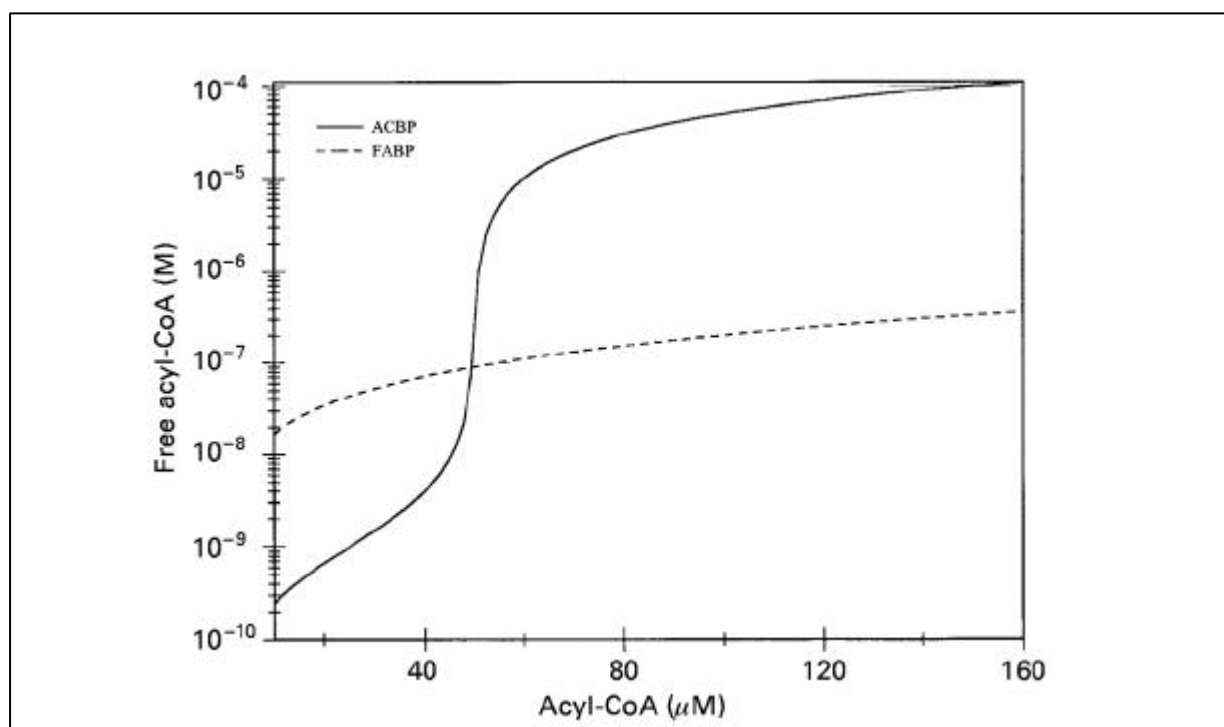


Figure 8. Evolution, *in vitro*, de la concentration des acyl-CoAs libres en présence des ACBP (Acyl-CoA Binding Protein) et des FABP (Fatty Acyl Binding Protein). Les concentrations en ACBP et FABP sont respectivement de 50 μM et 300 μM (similaires à leur concentration cellulaire). Les constantes de dissociation (K_D) envers les acyl-CoAs sont de 1 nM pour les ACBP et de 1 μM pour les FABP (Faergeman et Knudsen, 1997).

2.4.2. Rôle des thioestérases dans la régulation de la concentration des acyl-CoAs

La présence des thioestérases (hydrolases des acyl-CoAs) dans les différents organites cellulaires est un facteur supplémentaire qui diminue les risques d'intoxication cellulaire par les acyl-CoAs libres (Berge et Aarsland, 1985 ; Faergeman et Knudsen 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). En effet, ces enzymes réduisent considérablement la toxicité des acyl-CoAs en hydrolysant la liaison thioester entre le coenzyme A et l'acide gras (Faergeman et Knudsen, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000).

Cette activité enzymatique est très répandue chez les procaryotes comme chez les eucaryotes et est isolée à partir de plusieurs organites cellulaires. Toutes les fonctions physiologiques des thioestérases ne sont pas encore clairement élucidées ; néanmoins, leur rôle dans la régulation de la concentration des acyl-CoAs a été démontré par Berge et Aarsland (1985). Ces hydrolases ont généralement des K_m entre 0,1 et 6 μM et maintiennent,

de ce fait, la concentration intracellulaire en acyl-CoAs libres à un très faible niveau (Berge et Farstad, 1979 ; Broustas et Hajra 1995 ; Yamada *et al.*, 1996).

2.5. Rôles physiologiques des acyl-CoAs

Comme nous l'avons signalé au début de ce chapitre, les acyl-CoAs jouent des rôles d'effecteurs dans plusieurs processus cellulaires. La figure 9 représente le schéma proposé par Faergeman et Knudsen (1997) pour illustrer quelques-uns des rôles de ces acyl-CoAs dans le métabolisme cellulaire.

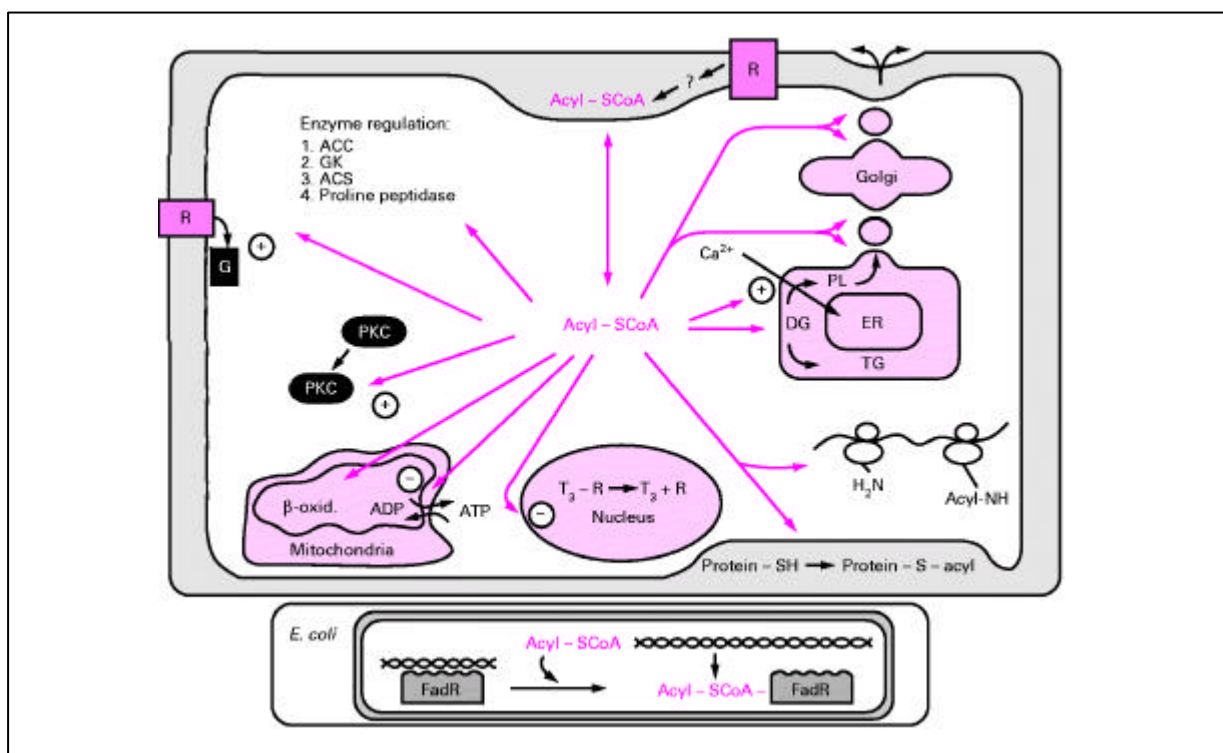


Figure 9. Schéma proposé par Faergeman et Knudsen (1997) montrant l'intervention des acyl-CoAs dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires (plusieurs enzymes cytoplasmiques, canaux et pompes à ions, fusion des membranes et expression de certains gènes, ...). Abréviations: ACC, acétyl-CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthétase; β-oxid., β-oxidation; DG, diacylglycerol; ER, réticulum endoplasmique; G, protéine G; GK, glucokinase; PKC, protéine kinase C; PL, phospholipides; R, récepteur; T3, tri-iodothyronine; TG, triacylglycérol.

2.5.1. Rôles dans la régulation des événements membranaires

La régulation et la coordination des événements de fusion membranaire jouent un rôle central dans l'excrétion, l'endocytose, la division cellulaire et la compartimentation intracellulaire.

Le mécanisme moléculaire du bourgeonnement des vésicules, leur transport ainsi que leur fusion aux membranes des compartiments cibles sont des phénomènes complexes et très mal connus. Récemment, Pfanner *et al.* (1989) ont pu démontrer que les acyl-CoAs jouent un rôle essentiel dans ces processus. Par le fait que l'inhibition de la synthèse des acyl-CoAs par l'acyl-CoA synthétase provoque l'inhibition de la formation des vésicules. La nature de l'intervention des acyl-CoAs dans ces processus est encore mal connue mais, on sait que le phénomène est lié à la mauvaise acylation d'une protéine car les inhibiteurs de la S-acylation donnent le même effet que les inhibiteurs de l'acyl-CoA synthétase (Pfanner *et al.*, 1990).

Les acyl-CoAs sont également impliqués dans la perméabilité membranaire et dans le fonctionnement des pompes à ions (Rys-Sikora *et al.*, 1994)

2.5.2. Rôle dans la régulation de l'expression génétique

Chez *Escherichia coli*, les gènes *fad A*, *fad B*, *fad D*, *fad E*, *fad H* et *fad L* codent pour les différentes protéines impliquées dans le transport et la dégradation des acides gras. L'expression de ces gènes est régulée au niveau de la transcription par le facteur Fad R (produit du gène *fad R*). Ce facteur bloque l'expression de ces gènes en se fixant au niveau de leur promoteur (Overath *et al.*, 1969 ; Klein *et al.*, 1971 ; Dirusso *et al.*, 1992, 1993). Dirusso *et al.* (1992) ont démontré que la fixation du facteur Fad R aux promoteurs est sous la dépendance de certains acyl-CoAs. Les constantes d'inhibition (K_i) du palmitoyl-CoA (C16-CoA) de l'oléoyl-CoA (C18:1⁹-CoA) sont de $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, alors que celles du myristoyl-CoA (C14-CoA) et du décanoyl-CoA (C10-CoA) sont respectivement de 0,3 et 2 μM .

Chez *S. cerevisiae*, le gène *OLE1* codant pour la Δ^9 -désaturase, est réprimé lors de l'ajout dans le milieu de culture des acides gras Δ^9 -insaturés (Bossie et Martin, 1989, McDonough *et al.*, 1992). La répression est levée chez les mutants déficients en acyl-CoA synthétase, l'enzyme responsable de la production d'acyl-CoAs à partir des acides gras exogènes, ce qui

indique que l'expression du gène *OLE1* est sensible à la concentration des acyl-CoAs dont la chaîne d'acide gras est Δ^9 -insaturée (Choi *et al.*, 1996).

Kamiryo *et al.* (1976) montrent également que chez *S. cerevisiae*, l'expression génétique de la carboxylase de l'acétyl-CoA, enzyme qui catalyse une étape essentielle dans la néosynthèse des acides gras, est également sensible à la concentration des acyl-CoAs.

2.5.3. Rôle dans l'acylation des protéines

Les modifications de protéines par liaison covalente à des acides gras ont été découvertes simultanément par des analyses structurales et par des études de marquage métabolique radioactif (Towler *et al.*, 1988). Ces modifications sont catalysées par des transférases dont les substrats sont les acyl-CoAs, souvent le palmitoyl-CoA et le myristoyl-CoA. Elles ont des conséquences à la fois structurales et fonctionnelles sur les protéines concernées (Casey, 1995). En effet, d'une part, elles influencent la conformation, la stabilité et le repliement correct de la protéine (Justice *et al.*, 1995) et, d'autre part, elles lui confèrent une ancre hydrophobe qui permet son insertion dans la membrane (Peitzsch et McLaughlin, 1993).

Les deux principales modifications covalentes de protéines par des acides gras sont ; la S-palmitoylation et la N-myristoylation. La première correspond à la formation, post-traductionnelle, d'une liaison thioester entre un résidu cystéine interne et l'acide palmitique. La N-myristoylation, quant à elle, est une modification, co-traductionnelle, du résidu glycine N-terminal d'une protéine, par formation d'une liaison amide avec l'acide myristique.

Un certain nombre de protéines acylées ont déjà été décrites. On peut citer les protéines virales de structure, dont la myristoylation est indispensable au développement de certaines infections (Chow *et al.*, 1987 ; Grand, 1989), ainsi que les protéines de la famille *src* découvertes dans des tumeurs cancéreuses et dont la présence est associée aux processus de prolifération (Resh, 1994 ; Boutin, 1997).

Plusieurs protéines acylées se trouvent en amont d'une série d'évènements métaboliques essentiels. Citons par exemples la sous-unité α des protéines G impliquées dans la transduction des signaux ou certaines phosphokinases qui régulent une cascade de réactions et qui sont activées par la myristoylation (Jones *et al.*, 1990 ; Mumby *et al.*, 1990).

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs travaux démontrent que la concentration cellulaire en acyl-CoAs et leur disponibilité, en tant que substrats des transférases, sont essentielles pour les processus d'acylation (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1991, 1992 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Knoll *et al.*, 1995 ; Ashrafi *et al.*, 1998). Une déficience dans l'acylation de protéines entraîne des perturbations morphologiques et l'arrêt de la croissance.

3. Objectifs du travail

Les industries qui s'intéressent à la culture des micro-organismes adaptés aux basses températures sont souvent confrontées à l'incapacité de ces derniers à se développer au delà de 20°C. Cette exigence thermique représente un des obstacles majeurs à leur utilisation à grande échelle.

Bien que le phénomène puisse apparaître comme un paradoxe thermodynamique, à notre connaissance, peu d'études s'y sont réellement intéressées. Les nombreuses informations acquises au cours des vingt dernières années concernent plutôt les mécanismes mis en jeu pour faire face au déficit énergétique lors de la croissance aux basses températures.

Par ce travail, nous voudrions apporter une contribution à la compréhension des causes de l'inaptitude des micro-organismes psychrophiles à se développer aux températures modérées. Dans ce contexte, l'étude de la levure psychrophile *Rhodotorula aurantiaca* A19, choisie comme modèle pour ses caractéristiques technologiques, a été abordée sous différents aspects.

Ainsi dans une première partie, nous voulions évaluer les effets néfastes de la croissance aux températures modérées à différents niveaux cellulaires tant physiologique que morphologique et moléculaire. Les analyses morphologiques ont cependant orienté la suite de notre recherche et nous ont incités à focaliser notre étude sur le métabolisme des acyl-CoAs et sur le rôle de ces derniers dans l'inaptitude de *R. aurantiaca* A19 à se développer aux températures modérées.

MATERIEL ET METHODES

1. Souches utilisées et milieux de culture

1.1. Souches utilisées

Les souches antarctiques utilisées nous ont aimablement été cédées par le Professeur C. Gerday du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Liège. Elles sont issues d'une collection de micro-organismes isolés à la station Antarctique Dumont d'Urville en Terre d'Adélie (66°40' S, 140°01' E).

La souche psychrotrophe de *Rhodotorula aurantiaca* provient de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve (UCL). Elle a été isolée du sol (Ardennes belges) par le Laboratoire de Mycologie de l'UCL. Cette souche porte le numéro de référence 31345.

1.2. Identification des souches

L'identification des souches est réalisée à 10°C en se basant sur les données acquises par galeries API (API 20 C AUX) (BioMérieux). Cette identification repose sur les tests conventionnels de fermentation et/ou d'assimilation. Les résultats sont interprétés par BioMérieux Paris, selon les instructions d'API SYSTEM S.A.

La souche A19 a été identifiée par ce test en tant que *Rhodotorula aurantiaca*. Son identification a été confirmée par des analyses supplémentaires réalisées par le laboratoire de Mycologie de l'UCL. Cette souche est déposée à la collection de la mycothèque de L'UCL sous le numéro de référence 40267.

Pour connaître la gamme de températures permissives, les levures de la collection ont été repiquées sur le milieu 868 (pour la composition du milieu, voir § 1.4.) et cultivées aux températures de 4, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C.

1.3. Mise en collection des souches

Les souches sont conservées à long terme sous forme séchée. Les cultures sont réalisées à 4°C sur le milieu 868. Ensuite, en phase exponentielle de croissance, les cellules sont récupérées stérilement, lavées deux fois avec une solution de maltose 1%. Après une congélation à -40°C, les cellules sont lyophilisées. Les tubes de lyophilisation sont ensuite scellés sous vide et stockés à -80°C.

La conservation sous forme congelée, en présence de glycérol (20%), permet une conservation à moyen terme seulement (3 mois).

La mise en culture des souches se fait par repiquage des cellules lyophilisées sur milieu 868. Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 5 jours avant d'être utilisées pour inoculer les cultures.

1.4. Description des milieux de cultures

- *Milieu 868*

Le milieu 868 est utilisé pour la remise en culture des souches et pour leur production avant la mise en collection. Il est également utilisé lors de la détermination des températures permissives des souches. La composition de ce milieu, par litre d'eau déminéralisée, est :

- Extrait de levure	10 g
- Peptone de caséine	10 g
- Glucose	10 g
- Agar	15 g

- *Milieu YNB*

Le milieu YNB est utilisé lors de la détermination des paramètres cinétiques de croissance et pour les cultures qui ont servi à l'étude de l'influence de la température sur le protéome de la souche psychrophile *Rhodotorula aurantiaca* A19. La composition de ce milieu, par litre d'eau déminéralisée, est :

- 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 10 g de glucose
- 1,7 g de B.Y.N.B. (Bacto Yeast Nitrogen Base) (Difco). Ce milieu contient, par gramme :

* Vitamines : Biotine 2 μg , pantothénate de calcium 400 μg , acide folique 2 μg , inositol 200 μg , niacine 400 μg , acide p-aminobenzoïque 200 μg , hydrochlorure de pyridoxine 400 μg , riboflavine 200 μg , hydrochlorure de thiamine 400 μg .

* Minéraux : NaH_2PO_4 0,1 g, MgSO_4 0,5 g, NaCl 0,1 g, CaCl_2 0,1 g, acide borique 500 μg , CuSO_4 40 μg , KI 100 μg , FeCl_2 200 μg , MnSO_4 400 μg , MoNa 200 μg , ZnSO_4 400 μg .

- *Milieu YPD*

Le milieu YPD est utilisé pour les cultures en fermenteur. La composition de ce milieu, par litre d'eau déminéralisée, est :

- 10 g d'extrait de levure
- 20 g de peptone de caséine
- 20 g de glucose

La stérilisation des milieux se fait par autoclavage à 121°C pendant 20 min. Le BYNB est stérilisé par filtration sur des filtres Acrodisc (Millipore) d'une porosité de 0,22 μm .

2. Cultures cellulaires

2.1. Cultures en fioles

Pour permettre un départ rapide de la croissance, nous procédons à un ensemencement de 50 à 250 ml de milieu de culture à partir d'une colonie prélevée sur boîte de Pétri (milieu 868). Le milieu inoculé constitue la 'préculture' après 48 h d'incubation à 4°C sur un agitateur orbital Infors AG (120 rpm). Des parties aliquotes de celle-ci sont alors ajoutées à des erlenmeyers de 1 l contenant 250 ml de milieu de culture stérile. Les cultures sont ensuite incubées à une température déterminée, sous agitation (120 rpm). La composition des milieux des cultures et des précultures varie selon l'étude pour laquelle elles sont destinées (voir § 1.4.).

La croissance cellulaire est mesurée par turbidimétrie à 540 nm ou par comptage sur cellule de Bürker. Pour s'assurer de la pureté des cultures mises en oeuvre, nous avons recours à un examen microscopique.

2.2. Cultures en fermenteur

Lorsque l'expérience requiert une quantité importante de biomasse ou exige un suivi de l'état physiologique de la cellule, les cultures sont alors produites en fermenteur. Deux fermenteurs de marque Biolafitte (France) d'une capacité de 20 et 400 l ont été utilisés. Ces fermenteurs sont des cuves cylindriques en acier inoxydable munies de doubles enveloppes servant d'échangeur thermique. Les parties inférieures des cuves sont équipées de bossages destinés à recevoir les sondes :

- la sonde de température (Biolafitte, France),
- la sonde de pH (Ingold, Suisse),
- la sonde de mesure de la pression partielle en oxygène dissout (Ingold, Suisse).

Les fermenteurs sont également équipés d'un analyseur de gaz (Binos, Leybold-Mereaus, Angleterre).

La stérilisation des fermenteurs est réalisée à 121°C pendant 30 min. Après refroidissement du milieu de culture, les fermenteurs sont inoculés à partir de précultures

âgées de 48 h. Le volume des précultures représente une proportion de 5% du volume total du milieu. L'apparition de mousse est évitée par l'addition d'antimousse actif à basse température Antifoam B (Sigma).

2.3. Régulation de la température des cultures

Vu le caractère psychrophile des souches utilisées, toutes les cultures sont réalisées à basses températures. Pour réguler la température des cultures en fioles, ces dernières sont incubées dans une chambre d'incubation réfrigérée (Isocab). La température des fermenteurs est régulée par la circulation de l'eau de ville dans la double enveloppe des réacteurs. Pour réaliser des cultures en dessous de 12 °C (température de l'eau de ville), le système de refroidissement du fermenteur de 20 l a été adapté grâce à la connection des circuits de la double enveloppe du réacteur à un réfrigérateur (MGW Lauda RM 20). Cependant, cette adaptation n'a pas été possible dans le cas du fermenteur de 400 l.

3. Récupération et lyse des cellules

Pour les productions en fermenteur de 20 l, le milieu en fin de culture est centrifugé pendant 30 min, à $7000 \times g$ (centrifugeuse Sorvall RC-3). Dans le cas des productions en fermenteur de 400 l, la récupération des cellules se fait à l'aide d'une centrifugeuse semi-continue (Sharpless) à $16000 \times g$.

Le culot cellulaire est ensuite lavé dans le tampon de lyse (tampon phosphate 100 mM, pH 7, additionné de 0,2% (P/V) d'acide tétraacétique éthylène diamine (EDTA) et de 0,2% (P/V) de dithiothréitol (DTT)), puis resuspendu dans un volume déterminé du même tampon pour avoir une concentration finale de 50 g de biomasse (poids frais) par 100 ml de tampon. La suspension cellulaire est refroidie à 4°C et extrudée deux fois à cette température et à une pression de 1500 bars à l'aide d'une presse de French (Hydrobar).

Un homogénéiseur Niro (modèle Soavi) est utilisé à la place de la presse de French pour les cultures obtenues en fermenteur de 400 l. L'extrusion de la suspension cellulaire, préalablement refroidie à 4 °C, se fait de manière continue à 1500 bars également. Le refroidissement de la chambre de compression se fait avec de la glace pilée.

L'extrait cellulaire brut ainsi obtenu est centrifugé à 4°C pendant 60 min à $7000 \times g$ (Sorvall RC-3), puis 30 min à $18000 \times g$ (Beckman J2-21). Les culots sont éliminés et le surnageant est ensuite fractionné en petits volumes et congelé à -80°C.

4. Influence de la température de culture sur les paramètres cinétiques de croissance

L'étude de la cinétique de croissance est réalisée sur le milieu YNB comme décrit au § 2.1. Les températures d'incubation sont : 0, 4, 10 et 17°C pour *R. aurantiaca* A19 et 4, 10, 17 et 25°C pour *R. aurantiaca* 31345. Régulièrement, des échantillons sont prélevés des cultures et analysés.

La croissance cellulaire est mesurée par turbidimétrie à 540 nm et par comptage sur cellule de Bürker. En fin de culture, une mesure du poids sec est réalisée. Le glucose résiduel présent dans les échantillons est dosé à l'aide du kit 'Glucose Enzymatique PAP500' (BioMérieux), selon les instructions de la notice technique du produit. Différents paramètres sont calculés comme suit :

- Le taux de croissance (μ) :

Par analogie avec l'équation de Michaelis et Menten, Monod (1949) propose la relation suivante entre le taux de croissance cellulaire et la concentration en substrat limitant :

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{S + K_s}$$

où μ est le taux ou la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}) ;

μ_m est le taux de croissance maximal (h^{-1}) ;

S est la concentration en substrat limitant (g/l) ;

K_s est la constante de demi-saturation en substrat selon Monod (g/l).

- La vitesse de croissance (r_x) :

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu \cdot X$$

où X est la concentration cellulaire ;

t est le temps (h) ;

r_x est la vitesse de croissance ($X/(\text{l.h})$).

- La constante de demi-saturation en substrat (K_S) :

La représentation $\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ de Lineweaver-Burk permet de calculer le K_S :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m}$$

- Le temps de génération (g) :

Le temps de génération correspond au temps de doublement de la population cellulaire pendant la phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$).

$$g = \frac{\ln 2}{\mu_m} = \frac{0,693}{\mu_m}$$

5. Influence de la température de culture sur la morphologie cellulaire

Pour l'étude de l'influence d'une hausse brusque de température (shift) sur la morphologie de *R. aurantiaca* A19 aux différents stades de croissance, des cultures sur milieu YPD sont réalisées comme indiqué au § 2.1. A des intervalles de temps réguliers (24 h), ces cultures sont transférées l'une après l'autre de 4 à 18°C. L'évolution de la morphologie cellulaire est suivie au microscope optique après coloration de la suspension cellulaire au bleu de méthylène.

6. Influence de la température de culture sur le protéome de *R. aurantiaca* A19

L'analyse du protéome de *R. aurantiaca* A19 est réalisée par électrophorèse bidimensionnelle comme décrit dans le manuel d'électrophorèse 2D (Pharmacia).

La souche psychrophile *R. aurantiaca* est cultivée à 0 et à 18°C en fioles (voir § 2.1.) sur milieu YNB. La croissance des cultures est arrêtée en phase exponentielle ($\pm 10^7$ cell/ml). Les cellules sont récupérées et lavées dans un tampon d'extraction contenant 54 g d'urée, 2g de dithiothréitol (DTT), 2 ml de Pharmalyte₃₋₁₀ (Pharmacia), 140 mg de

phénylméthylsulfonyl-fluorure (PMSF), 20 mg de Pefabloc (Merck), 2 ml de Triton X-100 et 100 ml d'eau désionisée.

L'extraction des protéines est réalisée par rupture mécanique à la presse de French (voir § 3). La quantité totale de protéines produites aux deux températures est déterminée comme décrit au § 9.5 et elle est d'environ 2 mg/10⁷ cellules.

L'électrophorèse se déroule en deux étapes à l'aide d'un appareil d'électrophorèse horizontale Multiphor II (Pharmacia). La première étape permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique et la deuxième permet leur séparation en fonction de leur masse moléculaire.

6.1. Séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique

Les gels de focalisation isoélectrique utilisés sont des bandes de polyacrylamide contenant des ampholytes (DryStrip₃₋₁₀ 110 mm, Pharmacia). Les dimensions sont 11 cm de longueur, 0,5 cm de largeur et 0,5 mm d'épaisseur. Ces gels, vendus sous forme séchée, sont réhydratés pendant 20 h dans une solution contenant 48 g d'urée, 0,5 ml de Triton X-100, 0,5 ml de Pharmalyte₃₋₁₀ (Pharmacia), 200 mg de dithiothréitol (DTT), 2 mg de bleu de bromophénol et 100 ml d'eau désionisée. Les gels sont ensuite placés sur un support plastifié et déposés sur une plaque thermostatée. Les échantillons (60 µg/puits) sont déposés à mi-chemin entre l'anode et la cathode grâce à des applicateurs. Les solutions pour les électrodes sont : H₃PO₄ 1 M pour l'anode et NaOH 1 M pour la cathode. Avant d'appliquer le courant, les gels sont entièrement couverts par de l'huile de silicone pour éviter la déshydratation et la modification locale du gradient de pH. La séparation est réalisée en deux phases avec les consignes suivantes :

	potentiel (V)	intensité (mA)	puissance (W)	Temps (h)
Phase I	300	1	5	1
Phase II	1400	1	5	15

Après la migration des protéines, les gels sont récupérés, lavés pendant 10 min dans 100 ml d'une solution de tampon Tris-HCl 20 mM pH 6,8 contenant 36 g d'urée, 1 g de SDS et 30 ml de glycérol, puis équilibrés pendant 10 min dans 100 ml de la même solution

additionnée de 1 g de dithiothréitol (DTT), 10 mg de bleu de bromophénol et 0,45 g d'iodoacétamide.

6.2. Séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire

Les gels obtenus sont rapidement soumis à la deuxième séparation ou enveloppés dans des membranes de cellophane et stockés à -80°C . La deuxième séparation se fait sur des gels à gradient de polyacrylamide Excel-Gel SDS 8-18 (Pharmacia). Les dimensions de ces derniers sont : 30 cm de longueur, 10 cm de largeur et 0,5 mm d'épaisseur. Ces gels comprennent une partie dite *de concentration* de 33 mm, composée de 5% d'acrylamide et une partie *de séparation* de 77 mm, composée d'un gradient de 8 à 18% d'acrylamide. Les tampons qui assurent le passage du courant électrique sont sous forme de gels de 30 cm de longueur, 1 cm de largeur et 1 cm d'épaisseur (Excel-Gel SDS Buffer strips).

Les gels issus de la première séparation (IEF) sont déposés à la surface du deuxième gel à 1 mm de la cathode (2 gels IEF par gel Excel-Gel SDS). Des standards de masse moléculaire sont déposés de part et d'autre des gels IEF. Ces standards contiennent les indicateurs de masse moléculaire suivants : phosphorylase b (94 kDa), sérum albumine bovine (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur trypsique de soja (20 kDa), α -lactalbumine (14,4 kDa). La séparation est également réalisée en deux phases avec les consignes suivantes :

	potentiel (V)	intensité (mA)	puissance (W)	Temps (min)
Phase I	600	20	30	30
Phase II	600	50	30	70

Les protéines sont révélées par coloration à l'argent avec le kit 'Silver staining protein' (Pharmacia) selon les instructions de la notice technique. Les gels sont numérisés, puis analysés par Pharmacia-Biotech à l'aide du logiciel informatique Image-Master 2D Elite (Pharmacia).

7. Influence de la température de culture sur le métabolisme des lipides chez *R. aurantiaca* A19

7.1. Influence de l'apport d'acides gras sur la croissance à 18°C

Pour cette étude, des cultures de *R. aurantiaca* A19 sont réalisées en fiole de 250 ml de milieu comme indiqué au § 2.1. Le milieu de base est le YPD additionné des sels d'acides gras suivants à une concentration finale de 500 µM : le laurate de sodium (C12), le myristate de sodium (C14), le palmitate de sodium (C16) et le stéarate de sodium (C18). Ces cultures sont inoculées à partir d'une préculture réalisée à 4°C et incubées à 18°C. Deux cultures témoins sont réalisées sur milieu YPD sans ajout d'acides gras : la première cultivée à 4°C et la seconde à 18°C. L'évolution de la croissance et de la morphologie cellulaire est suivie par microscopie.

7.2. Détermination de la concentration intracellulaire des acyl-CoAs

7.2.1. Extraction des acyl-CoAs

La souche psychrophile *R. aurantiaca* est cultivée à 0 et à 18°C en fioles de 1 l sur milieu YPD (voir §2.1.). Après un temps de culture de 126 et 90 h, respectivement pour les cultures à 0°C et à 18°C, la croissance est arrêtée par ajout de 5 ml d'acide acétique glacial. L'acidification du milieu permet également d'éviter l'hydrolyse enzymatique des acyl-CoAs. Les cellules sont récupérées par centrifugation (voir § 3.) et lavées dans un tampon d'extraction (tampon phosphate pH 7,2 contenant 10 mM de MgCl₂ et 4% (V/V) d'acide acétique glacial). Les culots sont ensuite répartis en plusieurs lots de 3 g et congelés à -80°C. L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Prasad *et al.* (1987). A 3g de cellules sont ajoutés 3 ml de tampon d'extraction et 40 ml d'une solution chloroforme:méthanol (1:2). Le mélange est homogénéisé pendant 3 min à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Thurax, Van Der Heyden) à 8000 t/min puis additionné de 12,7 ml d'eau et 12,7 ml de chloroforme. Après centrifugation, à 18000 × g (Beckman J2-21) pendant 30 min, la partie lipidique se trouve dans la phase chloroformique et la phase aqueuse contient les acyl-CoAs et les protéines. Cette dernière est récupérée et les lipides encore présents sont éliminés par trois

lavages au chloroforme (addition de 20 ml de chloroforme et centrifugation). Les protéines sont enfin précipitées par l'ajout de 25 ml d'acétonitrile. L'extrait ainsi obtenu est ensuite congelé et lyophilisé.

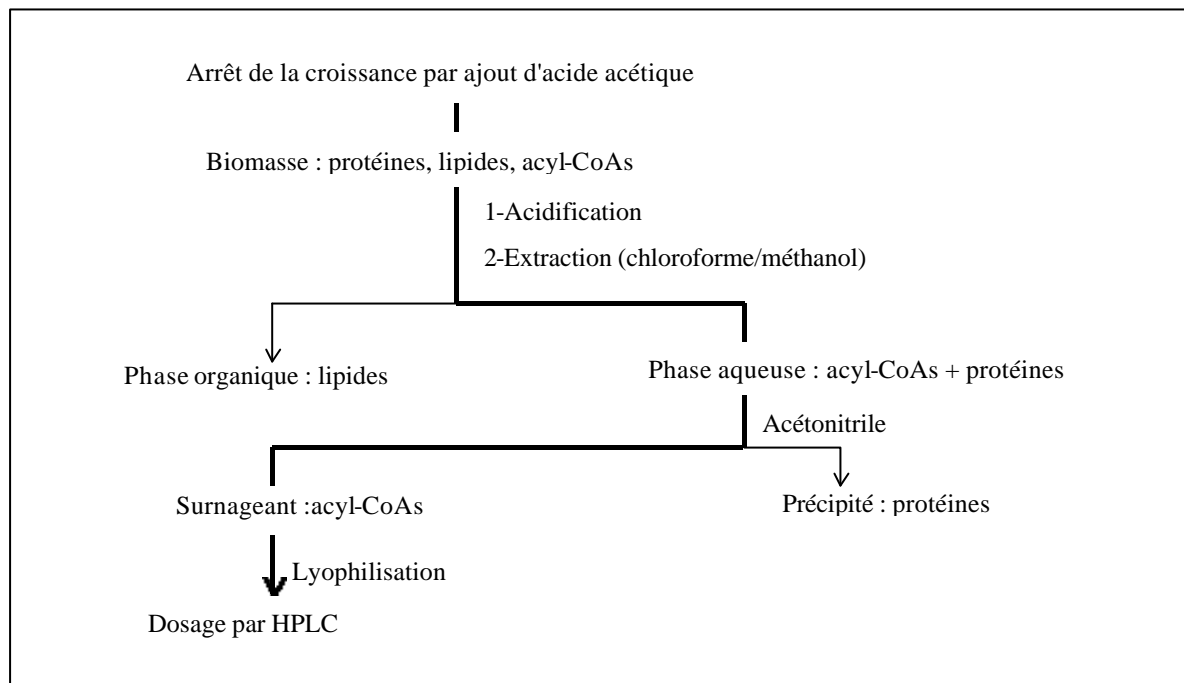


Figure 1. Schéma d'extraction des acyl-CoAs chez la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 (d'après Prasad *et al.*, 1987).

7.2.2. Dosage par HPLC des acyl-CoAs

L'installation HPLC comporte une unité HPLC intégrée Kontron 32X et un injecteur HP 1050. La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur Kontron 432-UV. L'intégration des données est réalisée grâce au programme Softron PC Software.

Les extraits cellulaires obtenus (Cf. § 7.2.1.) sont ensuite analysés par chromatographie, selon la méthode décrite par Rosendal et Knudsen (1992), sur une colonne LiChrospher 100 RP-18 (4,6x250 mm) (Merck). Les tampons d'élution sont :

- tampon A ; composé de 20% d'acétonitrile, 80% KH_2PO_4 25 mM à pH 5,3 ;
- tampon B ; composé de 80% d'acétonitrile, 20% KH_2PO_4 25 mM à pH 5,3.

Les extraits secs des acyl-CoAs sont repris dans le tampon A, puis élués selon le programme d'éluion suivant : 0% B pendant 10 min, de 0% B à 60% B en 55 min, 60% B pendant 10 min, de 60% B à 100% B en 10 min, 100% pendant 10 min et de 100% B à 0% B en 5 min.

Le volume d'échantillon par injection est de 40 μ l ; le débit d'éluion est fixé à 1 ml/min et la détection des acyl-CoAs se fait par spectrophotométrie à 254 nm.

Les temps de rétention des acyl-CoAs sont déterminés grâce à des injections répétées des standards suivants : octanoyl-CoA (C8:0), décanoyl-CoA (C10:0), myristoyl-CoA (C14:0), palmitoyl-CoA (C16:0) et stéaroyl-CoA (C18:0) (Sigma).

Les concentrations sont déterminées par le programme Softron PC Software en se référant à une courbe d'étalonnage établie par l'injection de différentes concentrations de myristoyl-CoA (Sigma).

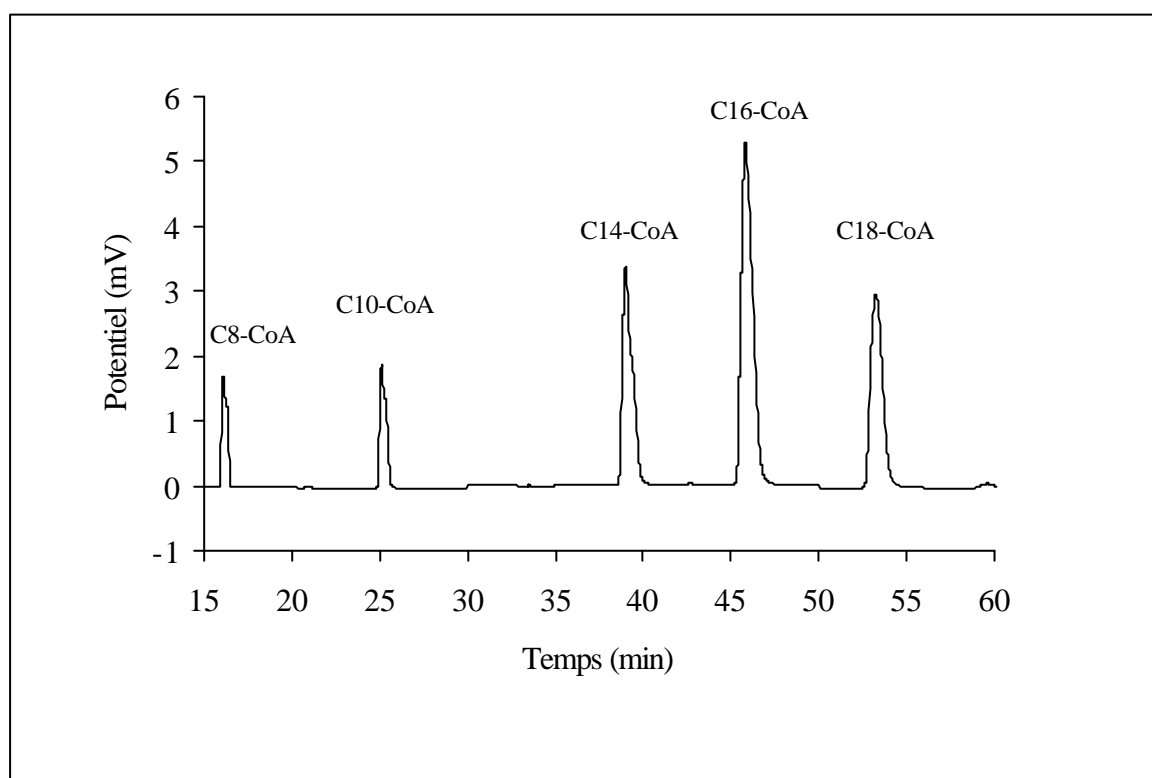


Figure 2. Chromatographie HPLC sur colonne, LiChrospher 100 RP (Merck). La solution de standards contient 1 mM d'octanoyl-CoA (C8:0), 1 mM de décanoyl-CoA (C10:0), 1 mM de myristoyl-CoA (C14:0), 1 mM de palmitoyl-CoA (C16:0) et 1 mM de stéaroyl-CoA (C18:0). La phase mobile est : A, 20% d'acétonitrile/80% de tampon KH_2PO_4 25 mM pH 5,3 et B, 80% d'acétonitrile/20% de tampon KH_2PO_4 25 mM pH 5,3. Le programme d'éluion est : 0% B pendant 10 min, de 0% B à 60% B en 55 min, 60% B pendant 10 min, de 60% B à 100% B en 10 min, 100% pendant 10 min et de 100% B à 0% B en 5 min. Le débit est de 1 ml/min, le volume injecté sur la colonne est 10 μ l et les esters d'acyl-CoA sont détectés à 254 nm.

7.3. Identification des acyl-CoA par spectrométrie de masse

Le composé correspondant au pic dont le temps de rétention est de 39 min, obtenu par HPLC sur colonne LiChrospher 100 RP-18, a été récolté et analysé par spectrométrie de masse (FAB). Cette analyse a été gracieusement réalisée dans le service des Professeurs De Pauw et De Graeve.

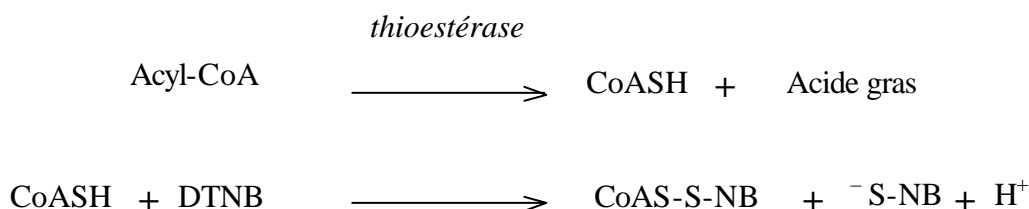
Les échantillons sont dissouts dans une solution eau:acétonitrile (50:50) et sont introduits par perfusion directe dans un spectromètre de masse configuré en tandem (LC-MS-MS, Quatro II-Micromass). La fragmentation de la molécule est obtenue par électrospray en mode positif à 3500 V avec un voltage de cône de 30 eV. La calibration de l'appareil se fait grâce à un mélange de molécules de polyéthylène glycol (200, 400, 600 et 1000 Da).

Le spectre de masse obtenu est comparé à celui obtenu lors de la fragmentation du myristoyl-CoA commercial (Sigma) et à ceux publiés par Norwood *et al.* (1990) et Taylor *et al.* (1990).

8. Etude de l'activité thioestérase de la souche psychrophile

8.1. Méthode de dosage de l'activité thioestérase

La méthode de dosage de l'activité thioestérase est une méthode colorimétrique décrite par Svensson *et al.* (1995) et Ellman (1959). Elle repose sur le titrage des groupements -SH du CoASH libéré après hydrolyse des acyl-CoAs. Le titrage se fait par l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB).



Le thionitrobenzoate libéré est coloré en jaune et l'absorbance est suivie à 412 nm ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le milieu réactionnel est composé de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, contenant du myristoyl-CoA 0,1 mM et du DTNB 1 mM.

2 à 20 μl de solution enzymatique sont ajoutés à 1 ml de milieu réactionnel. La cinétique de l'apparition du thionitrobenzoate est suivie grâce à l'évolution de l'absorbance à 412 nm. Les résultats sont enregistrés et traités grâce à un logiciel adapté aux études cinétiques (Pharmacia) couplé au spectrophotomètre. 1 unité d'activité enzymatique (U) représente la quantité d'enzymes nécessaire pour former 1 μmole de thionitrobenzoate en 1 min à 25°C.

8.2. Fractionnement de l'extrait cellulaire pour la mise en évidence de l'activité thioestérase

Les cellules issues d'une production en fermenteur de 20 l (voir § 2.2.) sont suspendues dans un volume déterminé de tampon de lyse : tampon phosphate 100 mM, pH 7, additionné de 0,2% (P/V) d'EDTA et de 0,2% (P/V) de dithiothréitol (DTT) (voir § 3.) pour avoir une concentration finale de 50 g de biomasse (poids frais) par 100 ml de tampon. Les cellules sont ensuite lysées mécaniquement par trois passages successifs à la presse de French (voir §3.). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de l'extrait cellulaire pendant 60 min à $18000 \times g$ (Beckman J2-21).

8.2.1. Fractionnement par chromatographie sur tamis moléculaire

La colonne de tamis moléculaire utilisée est une colonne HiPrep 16/60 Sephacryl-S200 HR (Pharmacia). Le volume du gel est de 120 ml et la zone de séparation est de 5 à 250 kDa. La colonne est préalablement raccordée au système FPLC (appareillage Pharmacia constitué de deux pompes P-500 et d'un moniteur LCC 500 PLUS) et équilibrée dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7. Le volume d'extrait cellulaire injecté est de 4 ml. Les protéines sont éluées par le même tampon à un débit de 18 ml/h et sont détectées à une longueur d'onde de 280 nm. Des fractions d'un volume de 4 ml sont récoltées et l'activité thioestérase est mesurée pour chacune des fractions.

La colonne est calibrée avec les standards de masse moléculaire suivants : catalase (240 kDa), phosphatase alcaline (140 kDa), sérumalbumine bovine (66 kDa), lactate déshydrogénase (36 kDa). Le volume mort de la colonne est établi avec le bleu de dextrane (2000 kDa).

8.2.2. Fractionnement par isoélectrofocalisation (IEF) par Rotofor

La focalisation isoélectrique par Rotofor (Bio-rad) de la thioestérase est réalisée selon la méthode de Wiktorsson *et al.* (1992). Les deux membranes du Rotofor sont immergées pendant 1 nuit, l'une dans une solution de NaOH 100 mM et l'autre dans une solution de H₃PO₄ 100 mM. Elles sont ensuite placées dans les deux chambres qui leur correspondent (respectivement à l'anode et à la cathode). Les deux chambres sont remplies aux 2/3 par les deux solutions précitées.

10 ml d'extrait cellulaire sont dialysés pendant 16 h contre de l'eau distillée. Au rétentat de la dialyse sont ajoutés 25 ml d'eau distillée et 370 µl d'une solution d'ampholytes (pH 3-10) (Biorad). L'isoélectrofocalisation est réalisée à 4°C dans les conditions suivantes : potentiel électrique 2000 V, intensité 35 mA, puissance 12 W, durée 3 h 20 min. Des fractions de 5 ml sont récoltées. Le pH et l'activité thioestérase sont mesurés pour chacune de ces fractions.

9. Purification de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19

La purification de la thioestérase a été réalisée à 4 °C, à partir de cultures produites en fermenteurs de 20 et de 400 l (voir §2.2.). L'extraction des protéines et leur récupération sont réalisées comme au § 3. Les acides nucléiques contenus dans l'extrait cellulaire sont précipités par l'addition de 0,1% (P/V) de sulfate de protamine et éliminés par centrifugation à 18000 × g (Beckman J2-21) pendant 30 min.

9.1. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium

Le fractionnement des protéines se fait en 2 étapes ; le surnageant est amené à 30% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agité pendant 30 min à 4°C, puis centrifugé pendant 2 h à $18000 \times g$. Le culot est éliminé et le surnageant est amené à 80% de saturation, agité pendant 30 min à 4°C et centrifugé pendant 5 h à $18000 \times g$ à 4°C. Le culot est alors suspendu dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7.

9.2. Chromatographie sur colonne hydrophobe (phényl-Sepharose)

L'échantillon obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium est réparti en plusieurs fractions de volume égal. Ces fractions sont ensuite déposées au sommet d'une colonne XK 26/40 (Pharmacia) contenant 300 ml de phényl-Sepharose CL-4B (Pharmacia). La colonne est préalablement équilibrée dans le tampon de charge (tampon phosphate 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7). Le gel est ensuite lavé avec le même tampon à un débit de 4 ml/min. L'absorbance est suivie à 280 nm et, une fois la ligne de base stabilisée, un second lavage est réalisé avec de l'eau distillée.

L'activité thioestérase est décrochée par une désorption en masse par le tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,4. Des fractions d'un volume de 5 ml sont récoltées et celles contenant l'activité thioestérase sont rassemblées et lyophilisées.

9.3. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (Mono-Q)

La purification est poursuivie sur une colonne Mono Q HR 5/5 (Pharmacia). La colonne est préalablement rincée avec 15 ml de tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,7, puis avec 15 ml du même tampon sans NaCl. Les protéines purifiées sur colonne phényl-Sépharose et lyophilisées sont fractionnées en plusieurs échantillons. Ces derniers sont repris dans du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,7 et injectés à la colonne. L'élution est réalisée dans le même tampon avec un gradient de NaCl comme suit : 0 mM pendant 22 min, de 0 à 16 mM en 34 min, 16 mM pendant 44 min, de 16 mM à 1 M en 10 min et 1 M pendant 10 min. Le débit

est fixé à 0,8 ml/min, le volume des fractions est de 2 ml et l'élution des protéines est suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions présentant de l'activité thioestérase sont rassemblées, dialysées pendant 1 nuit contre du tampon phosphate 50 mM pH 7 puis concentrées à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration 'Amicon 8400' avec une membrane Diaflo YM10.

9.4. Chromatographie sur colonne hydrophobe (phényl-Superose)

La purification est terminée par une troisième chromatographie. La colonne utilisée est une colonne phényl-Superose HR 5/5 (Pharmacia). Cette dernière est préalablement rincée avec 15 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7 puis équilibrée dans 15 ml du même tampon contenant du NaCl à une concentration de 1 M.

Aux échantillons issus de la purification sur colonne échangeuse d'anions (Mono-Q), est ajouté du NaCl pour obtenir une concentration finale de 1 M. L'élution est réalisée dans le même tampon avec un gradient décroissant de NaCl comme suit : 1 M pendant 15 min, de 1 M à 600 mM en 25 min, 600 mM pendant 30 min, de 600 à 0 mM en 5 min et 0 mM pendant 15 min. Le débit est fixé à 0,8 ml/min, le volume des fractions est de 2 ml et l'élution des protéines est suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions contenant l'activité thioestérase sont rassemblées, dialysées pendant 1 nuit contre de l'eau distillée et lyophilisées.

9.5. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué suivant la méthode colorimétrique de Bradford. La solution de Bradford est préparée comme suit : 100 mg de bleu de Coomassie G 250 sont dissouts dans 50 ml d'éthanol à 95% ; à cette solution sont ajoutés 200 ml de H_3PO_4 à 85%. Le volume est ensuite amené à 1 l avec de l'eau distillée.

A 1 ml de la solution de Bradford préalablement filtrée sur un filtre Whattman n°1, on ajoute 10 à 100 μ l de la solution protéique à doser. L'absorbance est ensuite mesurée à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée en se référant à une droite étalon réalisée à partir de solutions de sérum albumine bovine de concentrations déterminées.

10. Caractérisation de la thioestérase

10.1. Electrophorèse en gel dénaturant

Des échantillons sont prélevés et lyophilisés après chaque étape de purification afin de suivre l'évolution de la pureté de l'enzyme. L'électrophorèse est réalisée, selon le système discontinu de Laemmli (1970), à l'aide d'un appareil à électrophorèse horizontale Multifor II (Pharmacia). Le tampon de charge contient :

- 5 ml de tampon Tris-HCl 600 mM pH 7,5
- 0,5 g de dodécyl sulfate de sodium (SDS)
- 77 mg de dithiothréitol (DTT)
- 5 mg de Bleu de Bromophénol
- 45 ml d'eau distillée.

Les gels et les tampons qui assurent le passage du courant électrique sont les mêmes que ceux décrits au § 6.2. Les échantillons préalablement lyophilisés sont repris dans un volume adéquat de tampon de charge (concentration en protéine de l'ordre de 2 µg/µl), incubés pendant 3 min à 100°C et déposés sur le gel (Excel-Gel SDS 8-18, Pharmacia). Les conditions de l'électrophorèse sont les suivantes : potentiel : 600 V; intensité : 50 mA; puissance : 30 W; temps : 80 min; température : 10°C.

La masse moléculaire de la thioestérase est déterminée en se référant au kit de calibration décrit dans le § 6.2. Les bandes protéiques sont révélées par coloration à l'argent avec le kit 'Silver staining protein' (Pharmacia) ou par coloration au Bleu de Coomassie.

10.2. Isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide

Les gels de focalisation isoélectrique utilisés sont des gels de polyacrylamide (30x10x0,5 cm) contenant des ampholytes (Ampholine PAGplate 3-10, Pharmacia). Ces gels permettent une séparation des protéines dans un gradient de pH allant de 3,5 à 9,5. Les solutions d'électrodes sont : 1 M H₃PO₄ et 1 M NaOH, respectivement, pour l'anode et la cathode.

5 µg de thioestérase pure sont remis en solution dans de l'eau distillée, puis déposés sur le gel. Les conditions de l'électrophorèse sont les suivantes : potentiel : 1500 V; intensité : 50 mA; puissance : 30 W; temps : 90 min; température : 10°C.

Le point isoélectrique est déterminé grâce à un kit de calibration contenant les indicateurs de pH suivants : amyloglucosidase (3,5), rouge de méthyle (3,75), inhibiteur de la trypsine de soja (4,55), β-lactoglobuline A (5,2), anhydrase carbonique bovine B (5,85), anhydrase carbonique humaine B (6,55), myoglobine acide de cheval (6,85), myoglobine alcaline de cheval (7,35), lectine de lentille acide (8,15), lectine de lentille moyenne (8,45), lectine de lentille alcaline (8,65), trypsinogène (9,30).

Après la migration des protéines, les gels sont révélés :

- soit, pour l'activité thioestérase, par un substrat spécifique selon la méthode décrite par Amaki (1992). Pour cela, le gel est lavé pendant 10 min dans 100 ml d'une solution de tampon phosphate 50 mM à pH 7, puis incubé pendant 20 min dans 50 ml d'une solution du même tampon contenant 100 µl de butyrate d'α-naphthyle, 0,5 g de "fast blue B" et 5 ml de tween 80.
- soit, pour les protéines totales, par coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent avec le kit "Silver staining protein" (Pharmacia) selon les instructions de la notice technique.

10.3. Composition en acides aminés de la thioestérase

Cette analyse est réalisée au laboratoire du Professeur Van Beeumen (Laboratoire de Biochimie et d'Ingénierie des Protéines, Université de Gand). La thioestérase est soumise à une hydrolyse acide en phase gazeuse. Elle est d'abord transférée sur un filtre (Novablot system, Pharmacia) puis mise dans un tube de verre borosilicaté de 5 x 55 mm. L'ensemble est ensuite placé dans une fiole d'hydrolyse (Pierce). L'hydrolyse est réalisée à l'acide chlorhydrique 6 N, pendant 1 h à 165°C. Les dérivés phényl-thiocarbamyle d'acides aminés (PTC-aa) obtenus sont analysés à l'aide d'un appareillage de type Derivatizer 420 A (Perkin Elmer Applied Biosystems).

10.4. Séquençage des peptides internes

Cette analyse a été réalisée également au laboratoire du Professeur Van Beeumen. La thioestérase est soumise à une hydrolyse à l'endoprotéinase Lys C. Les peptides sont ensuite séparés par HPLC sur une colonne Séphasyl peptide C18 (Pharmacia). Les peptides correspondant aux fractions récoltées (F 17, F 18 et F 25) dont les temps de rétention respectifs sont de 17,6, 17,9 et 20,5 min sont ensuite séquencés selon la méthode d'Edman au moyen d'un séquenceur automatique 476A (Perkin Elmer Applied Biosystem). Les acides aminés sous forme de phényl-thiohydantoïne acides aminés (PTH-aa) sont analysés sur une colonne spécifique (Brownlee, 5 PTH, 5 μm ; 0,2 x 22 cm, Perkin Elmer).

10.5. Influence du pH sur la stabilité de l'enzyme

Le tampon utilisé pour l'étude de la stabilité de l'enzyme en fonction du pH est un tampon couvrant une large gamme de pH. Il contient par litre : 0,72 g de H_3PO_4 , 3,54 g de H_3BO_3 , 0,42 g d'acide citrique et 13,7 g de NaOH. Une série de solutions dont le pH varie de 2 à 11 est ensuite préparée. Le pH est ajusté à l'aide d'une solution de HCl 0,1 N.

Un échantillon de thioestérase pure est remis en solution dans de l'eau distillée. Cette solution est répartie dans des tubes Eppendorf contenant 100 μl des tampons préalablement préparés aux différents pH. Les tubes sont conservés à 4°C et l'activité résiduelle est mesurée à des intervalles de temps réguliers.

10.6. Influence du pH sur l'activité enzymatique

Des solutions dont le pH va de 4 à 10 sont préparées (voir § 8.1.). Des quantités adéquates de myristoyl-CoA et d'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) y sont ajoutées pour obtenir des concentrations respectives de 0,1 et 1 mM. L'activité enzymatique est ensuite déterminée par la méthode standard décrite au § 8.1.

10.7. Etude de la glycosylation

La déglycosylation de la thioestérase est réalisée par l'endoglycosidase H de *Streptomyces griseus* (Sigma). L'hydrolyse est réalisée pendant 18 h à 25°C dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7. La détermination de la masse moléculaire de la thioestérase après déglycosylation est réalisée par électrophorèse sur gel dénaturant Excel-Gel SDS 8-18 (Pharmacia) comme décrit au § 10.1.

10.8. Spécificité vis-à-vis du substrat

10.8.1. Activité thioestérase

Les thioesters utilisés sont : l'octanoyl-CoA (C8:0), le décanoyl-CoA (C10:0), le myristoyl-CoA (C14:0), le palmitoyl-CoA (C16:0), le palmitoléoyl-CoA (C16:1) et le stéaroyl-CoA (C18:0). Ces thioesters diffèrent par la taille de la chaîne d'acide gras et sa saturation.

L'activité thioestérase est suivie grâce à la méthode colorimétrique qui repose sur le titrage au DTNB du groupement SH du CoASH libéré (voir § 8.1.). Des concentrations en substrat de 10, 25, 50, 75, 100 et 150 μM sont utilisées. Les vitesses initiales de la réaction d'hydrolyse sont déterminées et permettent le calcul des K_m et k_{cat} grâce au logiciel de gestion du spectrophotomètre (Kinetics Application Software 2.01, Pharmacia). Les K_m et k_{cat} sont déduits à partir des représentations de Hanes.

10.8.2. Activité carboxyl-estérase

10.8.2.1. Hydrolyse des esters de *p*-nitrophényle

Les esters de *p*-nitrophényle utilisés sont : le butyrate de *p*-nitrophényle (C4:0), le valérate de *p*-nitrophényle (C5:0), le caproate de *p*-nitrophényle (C6:0) et le caprylate de *p*-nitrophényle (C8:0). Ces esters diffèrent également par la taille de la chaîne d'acide gras.

Le milieu réactionnel contient 1,56% de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 0,6% de NaCl . Le pH est ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH 0,1 N. Le substrat, préalablement solubilisé dans de l'acétonitrile (20% V/V), est ajouté au milieu réactionnel. Les concentrations en substrats utilisés sont : 10, 50, 100, 250, 500 et 1000 μM . L'évolution de la réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 405 nm (ϵ_{405} du *p*-nitrophénol est de $15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Quinn *et al.*, 1982).

Comme pour l'étude de la spécificité vis-à-vis des thioesters, les paramètres cinétiques d'hydrolyse (K_m et k_{cat}) sont calculés grâce au logiciel de gestion du spectrophotomètre (Kinetics Application Software 2.01, Pharmacia). 1 unité d'activité estérase (U) correspond à la quantité d'enzymes nécessaire pour libérer 1 μmole de *p*-nitrophénol en 1 min à 25°C.

10.8.2.2. Hydrolyse des triglycérides

L'enzyme est testée pour l'hydrolyse de deux triglycérides : la tributyrine et la tripalmitine. Ces deux substrats sont utilisés à une concentration de 10 mM sous forme d'émulsion dans une solution d'alcool polyvinylique à 2%. L'activité est évaluée par titrage des acides gras libérés, pendant 15 min de réaction, à l'aide d'une solution 0,1 N de NaOH .

10.8.3. Activité phospholipase

Pour vérifier la capacité de l'enzyme purifiée à hydrolyser des phospholipides, deux substrats sont utilisés : la lécithine et la *p*-nitrophényle phosphatidyl-choline. Ces substrats permettent de révéler et doser les activités phospholipases A_2 et C. Le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8 contenant 0,5% (P/V) de lécithine ou 1 mM de *p*-nitrophényle phosphatidyl-choline. L'activité phospholipase A_2 est évaluée par titrage des acides gras libérés, pendant 15 min de réaction, à l'aide d'une solution 0,1 N de NaOH . L'activité phospholipase C, quant à elle, est évaluée par spectrophotométrie en suivant l'absorbance à 405 nm au cours du temps.

10.9. Etude du site actif

Cette analyse est réalisée selon la méthode décrite par Svenssen *et al.* (1995). Un échantillon de thioestérase pure est remis en solution dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7. La solution enzymatique est ensuite répartie dans des tubes Eppendorf et incubée pendant 1 h à 20°C en présence de 1 et 5 mM des réactifs suivants : le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB) et le phénylméthylsulfonyl-fluorure (PMSF). L'activité résiduelle est mesurée comme décrit aux § 8.1. et § 10.6.2. respectivement pour les activités thioestérase et carboxyl-estérase.

10.10. Thermodépendance

La thermodépendance de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 est comparée à une thioestérase commerciale (L-1754, Sigma) isolée de la levure mésophile *Candida rugosa*.

10.10.1. Etude de la thermostabilité

Pour étudier la thermostabilité, les deux thioestérases sont solubilisées dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7 et incubées à 40 et 50°C. Des échantillons sont régulièrement prélevés et refroidis sur glace. Les activités résiduelles sont ensuite mesurées conformément au test standard décrit au § 8.1.

10.10.2. Détermination des températures optimales

Les températures optimales des deux thioestérases sont déterminées par mesure des activités comme renseigné au § 8.1. pendant 5 min à des températures allant de 5 à 55°C. L'étude est réalisée grâce à un spectrophotomètre thermostatisé (Ultrospec III, Pharmacia).

10.10.3. Thermodépendance des paramètres cinétiques

Pour étudier l'influence de la température sur les paramètres cinétiques d'hydrolyse du myristoyl-CoA, les vitesses initiales de la réaction d'hydrolyse sont déterminées entre 5 et 35°C. Le milieu réactionnel est constitué du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contenant 1 mM de DTNB et des concentrations en substrat de : 10, 25, 50, 75, 100 et 150 μ M.

Comme pour la détermination des températures optimales, l'hydrolyse est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté Ultrospec III (Pharmacia). Le traitement des données et le calcul des vitesses initiales sont réalisés automatiquement grâce au logiciel de gestion de l'appareil (Kinetics Application Software 2.01, Pharmacia). Les K_m et k_{cat} sont déduits automatiquement à partir des représentations de Hanes.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1 :

Sélection d'une levure modèle et étude de sa cinétique de croissance

Comme il a été rapporté dans l'Introduction, les micro-organismes sont traditionnellement classés en fonction de leur température optimale de croissance. Dès lors, les organismes capables de croître aux basses températures ont été classifiés en deux grands groupes, les psychrophiles et les psychrotrophes :

- les psychrophiles auraient une température optimale de croissance inférieure à 15°C et une température maximale de croissance inférieure à 20°C,
- les psychrotrophes auraient une température optimale de croissance supérieure à 15°C et une température maximale de croissance supérieure à 20°C.

Ces définitions sont actuellement très contestées puisqu'elles ne se basent que sur un seul critère, la vitesse de croissance, pour définir l'optimum thermique. Plusieurs études récentes ont démontré qu'une vitesse de croissance élevée ne reflète pas nécessairement un bon état physiologique (Feller *et al.*, 1994, 1996, 1997, 1998). De plus, certains micro-organismes peuvent être psychrophiles ou psychrotrophes selon la richesse du milieu nutritif (Russell, 1990).

Ces définitions restent néanmoins un outil valable pour une caractérisation préliminaire permettant une première classification.

1.1. Identification et classification des levures isolées en Antarctique

Les souches de levures qui font partie de cette étude ont été isolées en Antarctique, à partir de divers origines (tableau 1.1), en Terre Adélie au cours d'expéditions polaires de 1988 et de 1992.

Dans le but de connaître la gamme de température permissive et de faire une première classification, les levures de la collection sont cultivées sur milieu gélosé (YPD) à différentes températures (4, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C).

L'identification des souches est réalisée en se basant sur les données acquises par culture sur galeries API (API 20 C AUX). Cette identification se base principalement sur des tests d'assimilation de différentes sources de carbone.

Tableau 1.1. Identification des souches isolées en Antarctique et détermination de leur température de croissance

Réf.	Origine	Identification	Température maximale de croissance (°C)
A2	Glace d'eau douce	<i>Candida ciferrii</i>	20
A4	Glace d'eau salée	<i>Candida ciferrii</i>	20
N8	Flaque d'eau de mer	<i>Candida tropicalis</i>	20
N9	Glace d'eau salée	<i>Candida lusitaniae</i>	20
A18	Algues nécrosées	<i>Candida colliculosa</i>	15
N14	Matière en décomposition	<i>Candida sp.</i>	15
A11	Algues nécrosées	<i>Candida sp.</i>	20
A5	Faïlle sur banquise	<i>Tricosporon cutaneum</i>	20
N13	Matière en décomposition	<i>Tricosporon cutaneum</i>	20
A9m	Glace d'eau salée	<i>Tricosporon sp.</i>	15
N10B	Glace d'eau douce	<i>Tricosporon sp.</i>	25
A9l	Glace d'eau salée	<i>Cryptococcus albidus</i>	15
N1	Glace d'eau douce	<i>Cryptococcus albidus</i>	15
A17	Algues nécrosées	<i>Cryptococcus sp.</i>	20
N85	Algues nécrosées	<i>Cryptococcus sp.</i>	25
A16	Algues nécrosées	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	20
A19	Algues nécrosées	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	20
N41	Matière en décomposition	<i>Bullera sp.</i>	20
N42	Matière en décomposition	<i>Bullera sp.</i>	20
A19B	Algues nécrosées	<i>Mrakia gelida</i>	15

Sur les 20 souches que compte la collection de levures Antarctiques, deux seulement ont montré une faible croissance au delà de 20°C. Toutes les autres levures se sont avérées incapables de se développer au delà de cette température. Ce résultat n'est pas étonnant dans la mesure où toutes les souches proviennent d'un biotope où la température est en permanence en dessous de 5°C et où aucune pression sélective ne force l'apparition d'organismes capables de se développer à des températures plus élevées.

1.2. Choix de la levure *Rhodotorula aurantiaca* A19

Dans le but d'accomplir une étude approfondie de l'action de la température sur la physiologie des levures adaptées aux basses températures, la souche *Rhodotorula aurantiaca* A19 a été prise comme modèle. Le choix de cette souche est dû à l'intérêt que portent plusieurs travaux réalisés au CWBI quant à certaines de ses caractéristiques biotechnologiques, telle sa capacité à produire des arômes, notamment la γ -décylactone (Belot, 1995 ; Amrouche, 1999), ainsi que sa capacité à dégrader certains hydrocarbures aromatiques tels que le phénanthrène, le biphényle et le naphthalène (Bossrez, 1994).

Le comportement de cette souche est comparé, sur le plan de la cinétique de croissance, à son homologue psychrotrophe de la même espèce. Cette dernière, *Rhodotorula aurantiaca* 31345, provient de la collection de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve. Elle a été sélectionnée dans les Ardennes belges.

1.3. Comparaison de la cinétique de croissance de la souche psychrophile *Rhodotorula aurantiaca* A19 et de son homologue psychrotrophe de la même espèce R31345

Chez les organismes adaptés au froid, la détermination de l'optimum thermique n'est pas chose aisée. Il est actuellement admis que la définition de l'optimum thermique est complexe et ne peut être basée uniquement sur la vitesse de croissance mais doit prendre en considération plusieurs paramètres dont les plus importants sont la vitesse spécifique de croissance (μ_{\max}), l'affinité vis-à-vis des substrats nutritifs et le rendement en biomasse (Noriyuki *et al.*, 1990 ; Rutter *et al.*, 1994 ; Guillou *et al.*, 1996).

Dans cette partie du travail, la thermodépendance de paramètres cinétiques de croissance est étudiée, en fioles, chez la souche psychrophile et comparée à celle de son homologue psychrotrophe de la même espèce. Les deux souches sont cultivées sur milieu YNB avec le glucose comme seule source de carbone (voir § 1.4 du M.&M.). Les températures de culture sont 0, 4, 10 et 17°C pour la souche psychrophile *Rhodotorula aurantiaca* A19 et 4, 10, 17 et 25°C pour son homologue psychrotrophe R31345 (voir § 4 du M.&M.).

1.3.1. Influence de la température sur le rendement en biomasse

La figure 1.1 montre l'évolution des courbes de croissance des deux souches, psychrophile et psychrotrophe, en fonction du temps et à différentes températures.

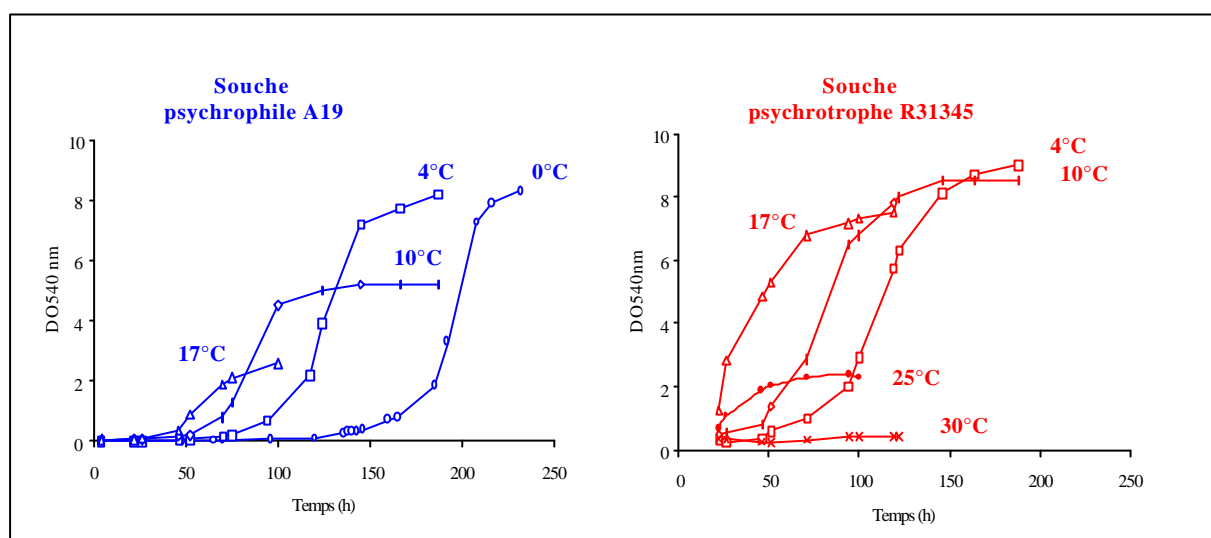


Figure 1.1. Influence de la température de culture sur la croissance sur milieu YNB des souches psychrophile et psychrotrophe de *R. aurantiaca*.

Les biomasses cellulaires obtenues en fin de croissance, aux différentes températures, sont regroupées dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2. Influence de la température de culture sur la biomasse cellulaire obtenue en fin de culture pour les souches psychrophile A19 et psychrotrophe R31345 de *R. aurantiaca*.

Température (°C)	Concentration cellulaire maximale (Cellules/ml)				
	0	4	10	17	25
Souche psychrophile	$8,2 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$ $\pm 0,5 \times 10^8$	pas de croissance
Souche psychrotrophe	non déterminé	$7,1 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$	5×10^8 $\pm 0,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$

La densité cellulaire est maximale entre 0 et 4 °C pour la souche psychrophile. En effet, à 0 et à 4°C, la biomasse est respectivement 1,5 et 3,5 fois supérieure à celle produite à 10 et 17°C. Aucune croissance n'est détectée au delà de 20°C. Concernant la souche psychrotrophe, dans la gamme de température examinée, on observe une biomasse maximale aux alentours de 4°C avec également une diminution du nombre de cellules par ml au delà de cette température. La biomasse produite par cette souche à 4°C est respectivement 1,4 et 4,2 fois supérieure à celle produite à 17 et 25°C. La température supérieure limitant la croissance pour cette souche est entre 30 et 32°C (figure 1.1).

1.3.2. Influence de la température sur la vitesse spécifique de croissance

Les vitesses spécifiques de croissance (μ_{\max}) sont calculées graphiquement en utilisant la représentation de Lineweaver-Burk. La figure 1.2 montre l'évolution de ce paramètre en fonction de la température chez les souches psychrophile et psychrotrophe de *R. aurantiaca*.

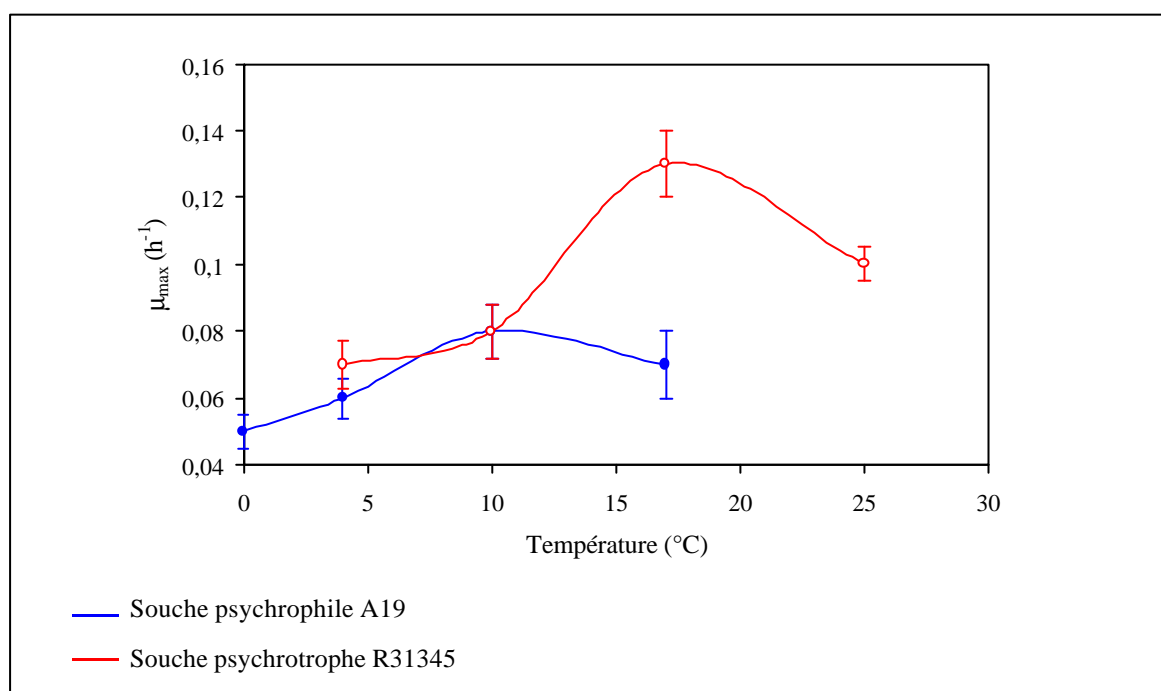


Figure 1.2. Influence de la température sur la vitesse spécifique de croissance (μ_{\max}), des souches psychrophile A19 et psychrotrophe R31345 de *R. aurantiaca*.

Les vitesses spécifiques de croissance sont fortement influencées par la température de culture. Pour les deux souches, les μ_{\max} évoluent en cloche avec des valeurs maximales à 10°C chez la souche psychrophile (0,08 h⁻¹) et à 17°C chez la souche psychrotrophe (0,13 h⁻¹).

A l'analyse des μ_{\max} , aux températures qui donnent les meilleurs vitesses de croissance, il apparaît que ce paramètre est 1,5 fois plus élevé dans le cas de la souche psychrotrophe par rapport à la souche psychrophile. Les temps de génération à ces températures (optimales) sont respectivement de 5,3 et 8,6 h.

1.3.3. Influence de la température sur la constante de demi-saturation (K_s) en glucose

Le K_s correspond à la concentration en substrat qui donne une vitesse de croissance représentant la moitié de la vitesse maximale. Ce paramètre permet d'évaluer l'affinité avec laquelle le substrat est prélevé. La figure 1.3 montre l'influence de la température d'incubation sur la constante de demi-saturation du glucose chez les deux levures.

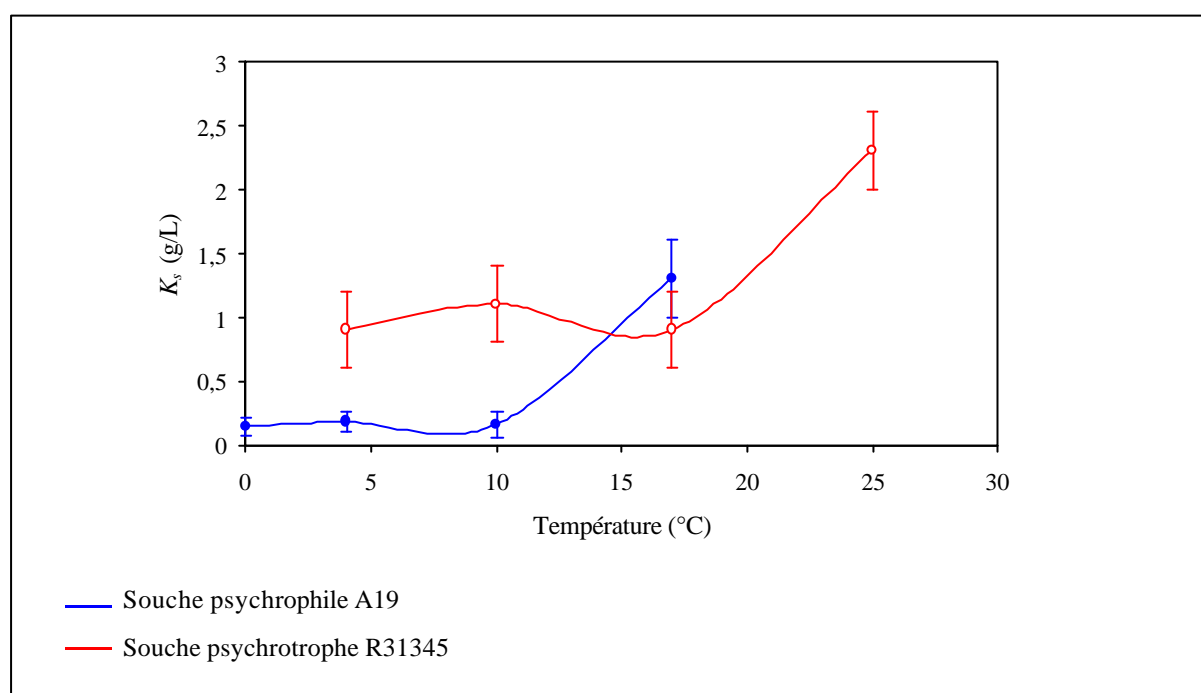


Figure 1.3. Influence de la température d'incubation sur la constante de demi-saturation en glucose (K_s) chez les souches psychrophile A19 et psychrotrophe R31345 de *R. aurantiaca*. Les valeurs de K_s sont obtenues à partir de la représentation de Lineweaver-Burk (LWB).

La constante de demi-saturation en glucose K_s de la souche psychrotrophe R31345 n'est pas significativement influencée par la température entre 4 et 17°C, elle est de l'ordre de 1 g/l (5 mM). La valeur obtenue à 25°C semble indiquer que plus on s'approche de la température

supérieure qui limite la croissance, plus le K_s augmente. A 25°C, le K_s calculé est 2,5 fois celui calculé à 4°C. Le même comportement est observé chez la souche psychrophile A19 qui, quant à elle, montre une valeur de K_s de 0,16 g/l (0,8 mM) qui augmente d'une façon plus marquée au delà de 10°C. A 17°C, le K_s est 9 fois celui déterminé à 0°C.

En comparant les K_s des deux souches entre 0 et 10°C, la souche psychrotrophe montre une valeur jusqu'à 7 fois plus élevée que celle observée pour la souche psychrophile, ce qui veut dire que le glucose est prélevé avec une affinité 7 fois plus élevée par la souche psychrophile que par la souche psychrotrophe. Au delà de 15°C, cette tendance est inversée et le K_s de la souche psychrophile devient supérieur à celui de la souche psychrotrophe.

1.3.4. Influence de la température sur les affinités spécifiques vis-à-vis du glucose

La thermodépendance des affinités spécifiques (μ_{\max}/K_s) des deux levures est présentée dans la figure 1.4.

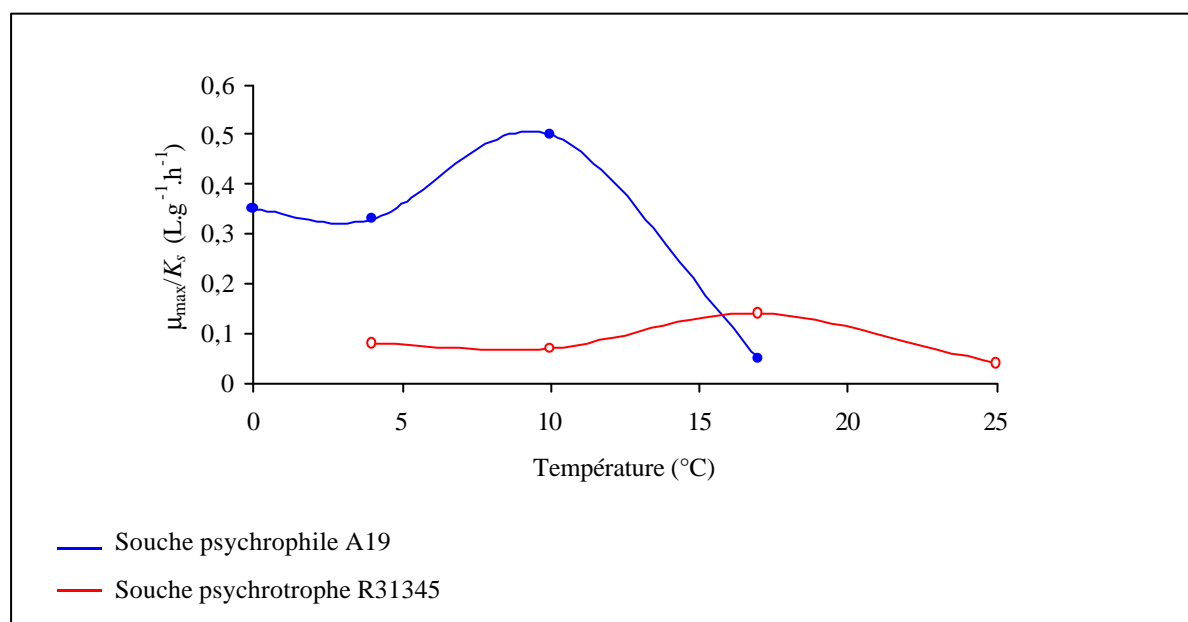


Figure 1.4. Influence de la température sur les affinités spécifiques (μ_{\max}/K_s) vis-à-vis du glucose des souches psychrophile et psychrotrophe. Les cultures sont réalisées à 0, 4, 10 et 17°C pour la souche psychrophile et à 4, 10, 17 et 25°C pour la souche psychrotrophe.

La souche psychrophile montre une affinité spécifique maximale ($0,5 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) au voisinage de 10°C et diminue d'une façon spectaculaire au delà de cette température pour atteindre une valeur 10 fois moindre à 17 °C. Cette diminution de μ_{\max}/K_s pourrait constituer un élément important dans la compréhension des causes de son incapacité à se développer au

delà de 20°C. La souche psychrotrophe montre un profil similaire dont l'optimum (0,15 l.g⁻¹.h⁻¹) est à 17°C. En comparant les deux souches, on constate qu'à 10 °C et aux températures inférieures, la souche psychrophile a une affinité spécifique jusqu'à 5 fois plus élevée que la souche psychrotrophe.

1.5. Discussion

L'optimum de température n'est pas facile à définir chez les deux souches. En effet la définition de ce paramètre doit en intégrer d'autres qui n'évoluent pas toujours de la même façon. Nous avons vu que les températures qui donnent les vitesses spécifiques de croissance les plus élevées sont moins favorables à la production de biomasse et à l'affinité vis-à-vis du substrat.

L'affinité spécifique (μ_{\max}/K_s) vis-à-vis du substrat est également un paramètre qui apporte de précieux renseignements sur le métabolisme d'un micro-organisme (Nedwell *et al.*, 1994). Chez les deux souches étudiées, ce paramètre diminue fortement avec l'augmentation de la température de culture ce qui atteste d'une profonde dégradation de leur état physiologique. La comparaison des paramètres cinétiques de croissance montre que, globalement, ces deux levures manifestent le même comportement avec un léger décalage vers les températures modérées pour la souche psychrotrophe.

Il existe néanmoins des différences entre les deux souches concernant leur vitesse de croissance et leur capacité à assimiler le substrat carboné. En effet, la souche psychrophile provient de l'Antarctique et montre une affinité vis-à-vis du substrat carboné relativement plus élevée. La souche psychrotrophe, quant à elle, montre une croissance plus rapide et provient de la région ardennaise où les conditions nutritives sont moins sévères et où la compétitivité dépendrait plutôt de la vitesse de croissance. Ces mêmes différences ont été soulignées chez plusieurs souches de levures par Vishniac et Klinger (1986). Ces auteurs considèrent que ces différences intra-spécifiques ne seraient pas liées directement à une adaptation au froid mais plutôt à la disponibilité des nutriments dans le milieu d'origine.

Dans la suite de notre travail, nous allons nous focaliser sur la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19. Nous porterons un intérêt particulier aux raisons qui empêchent cette souche de se développer aux températures modérées et qui limitent son utilisation à des fins écologiques et industrielles.

Chapitre 2 :

Influence des températures modérées (18-20°C) sur le protéome de la souche psychrophile R. aurantiaca A19

Bien que l'incapacité des organismes psychrophiles à se développer aux températures modérées représente un obstacle majeur à leur utilisation dans les domaines écologiques et industriels, aucune étude récente, à notre connaissance, n'est disponible à ce sujet. Des travaux datant des années 60, passés en revue par Inniss (1975), rapportent que cette thermosensibilité des organismes adaptés au froid est un phénomène complexe et serait une conséquence de l'altération de plusieurs fonctions cellulaires.

Une des hypothèses avancées pour expliquer l'incapacité des psychrophiles à se développer aux températures modérées est l'altération de la synthèse des protéines qui serait la conséquence de l'inactivation d'une amino-acyl-ARNt synthétase ou de l'instabilité des ARN et des ribosomes (Harder et Veldcamp, 1967 ; Malcolm, 1968 ; Nash *et al.*, 1969). Une technique de choix pour vérifier cette hypothèse revient à analyser, par électrophorèse bidimensionnelle, le 'protéome' de la souche psychrophile. Cette technique permet de mettre en évidence les protéines exprimées dans des conditions physiologiques particulières et d'estimer leur niveau d'expression par rapport à la normale.

2.1. Analyse par électrophorèse bidimensionnelle du protéome de la souche psychrophile R. aurantiaca A19

La souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 est cultivée à 0 et à 18°C sur milieu YNB. La croissance des deux cultures est arrêtée en phase exponentielle (voir § 6 du M.&M.). L'extraction des protéines est réalisée par rupture mécanique à la presse de French (voir § 3 du M.&M.). La quantité totale de protéines produites aux deux températures est d'environ

2 mg/10⁷ cellules. L'électrophorèse se fait en deux étapes; une première séparation selon le point isoélectrique des protéines de l'extrait cellulaire et une deuxième en fonction de leur masse moléculaire (voir § 6 du M.&M.).

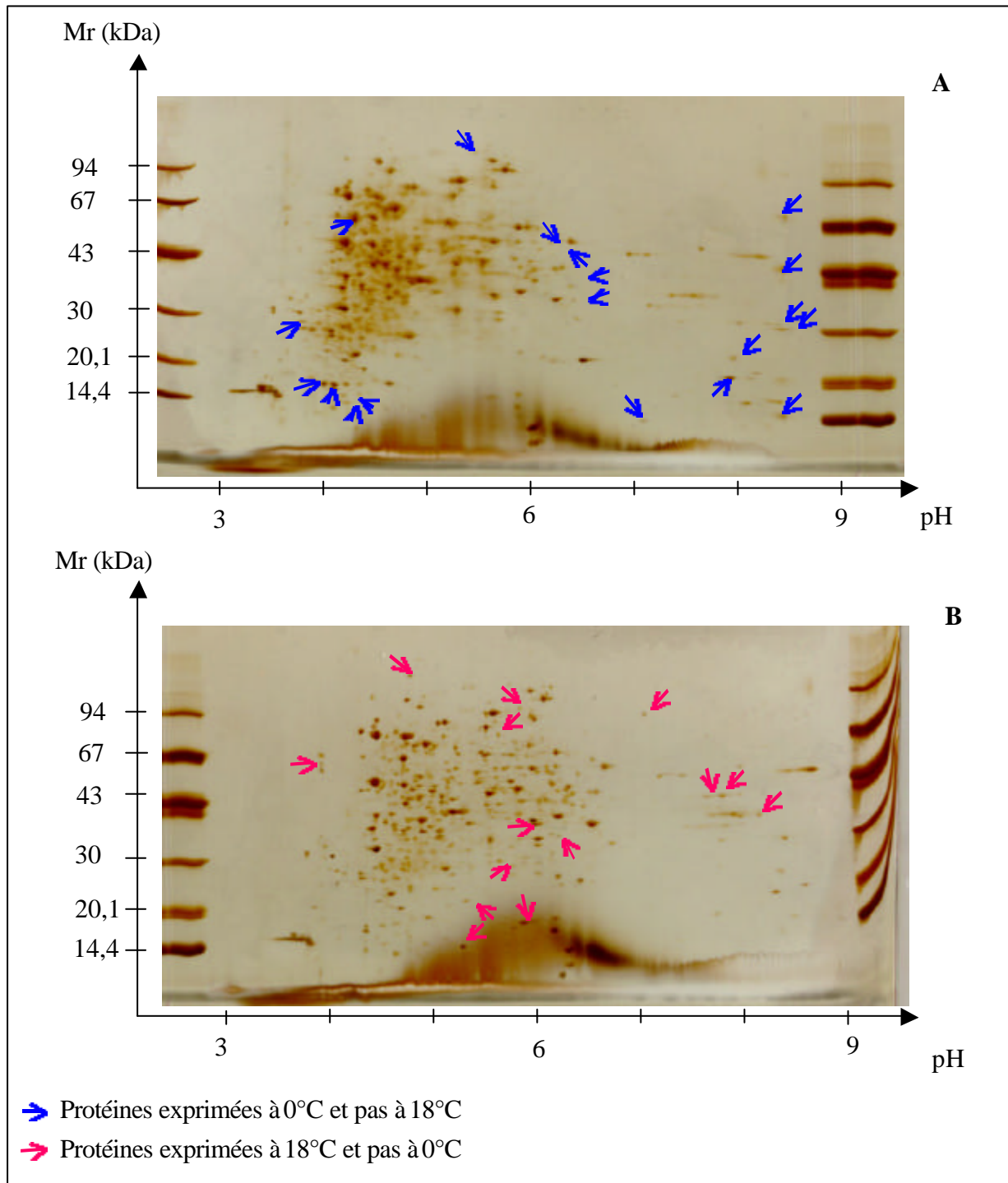


Figure 2.1. Electrophorèses bidimensionnelles des protéines totales produites par la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 cultivée à 0°C (A) et à 18°C (B). la quantité de protéines appliquée est de 60 µg/échantillon. La première séparation est réalisée par migration sur gels d'isoélectrofocalisation (IEF) (voir § 6.1 du M.&M.). Pour la deuxième migration, les gels IEF sont déposés à la surface d'un gel de polyacrylamide SDS gradient 8-18 (voir § 6.2 du M.&M.). Les bandes sur les côtés droit et gauche des gels correspondent aux standards de masse moléculaire.

Les photographies des deux gels (figure 2.1) montrent les protéomes de la souche psychrophile A19 à 0°C et à 18°C. Le traitement des résultats est réalisé par un logiciel informatique (Pharmacia). Ce programme permet de corréler les spots de protéines deux à deux et de faire une analyse comparative sur le plan quantitatif et qualitatif. Le tableau 2.1 montre un bilan des différences obtenues entre les protéomes de *R. aurantiaca* A19 exprimés à 0 et à 18°C.

Tableau 2.1. Influence de la température sur l'expression génétique chez *R. aurantiaca* A19.

Nombre total de spots révélés à 0°C	384
Nombre total de spots révélés à 18°C	379
Protéines exprimées à 0°C et pas à 18°C	19
Protéines exprimées à 18°C et pas à 0°C	14
Protéines ayant un niveau d'expression au moins 10 % plus élevé à 0°C qu'à 18°C	128
Protéines ayant un niveau d'expression au moins 10 % moins élevé à 0°C qu'à 18°C	46

2.2. Discussion

Il a été démontré chez *Candida gelida* et *Micrococcus cryophilus*, respectivement une levure psychrotrophe et une bactérie psychrophile, que la perte de viabilité aux températures modérées est directement liée à une diminution, voir même une inhibition, de la synthèse globale de protéines (Malcolm, 1968 ; Nash *et al.*, 1969). Une telle inhibition s'exerce au niveau de la traduction des ARN_m. D'autres travaux montrent, pour plusieurs bactéries antarctiques, qu'au delà des températures habituelles de croissance de ces bactéries, on observe une diminution de l'expression de plusieurs enzymes, parfois essentielles (Quist et Stokes, 1972, 1969 ; Saruyama *et al.*, 1979, 1980 ; Bertoli et Inniss, 1978).

Dans le cas de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19, un léger effet négatif des températures modérées sur le protéome est globalement perceptible. Cependant, il est difficile, à ce stade de l'analyse protéomique, de faire une corrélation entre la synthèse de protéines et l'inhibition de la croissance au voisinage de 20°C. Des études supplémentaires sont requises afin d'identifier les protéines les plus touchées et d'étudier leur implication dans le phénomène.

Chapitre 3 :

Etude de l'effet des températures modérées sur la morphologie de la souche R. aurantiaca A19

Chez les organismes psychrophiles les effets négatifs des températures modérées sont perceptibles à différents niveaux cellulaires. En effet, comme il a été démontré pour plusieurs bactéries psychrophiles, les températures modérées peuvent induire de profondes altérations morphologiques (Gounot *et al.*, 1977, 1976, Ferroni et Inniss, 1974, 1973).

3.1. Influence de la température d'incubation sur la morphologie de la souche psychrophile R. aurantiaca A19

L'effet des températures modérées sur la morphologie de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 est étudié en microscopies optique et électronique à transmission.

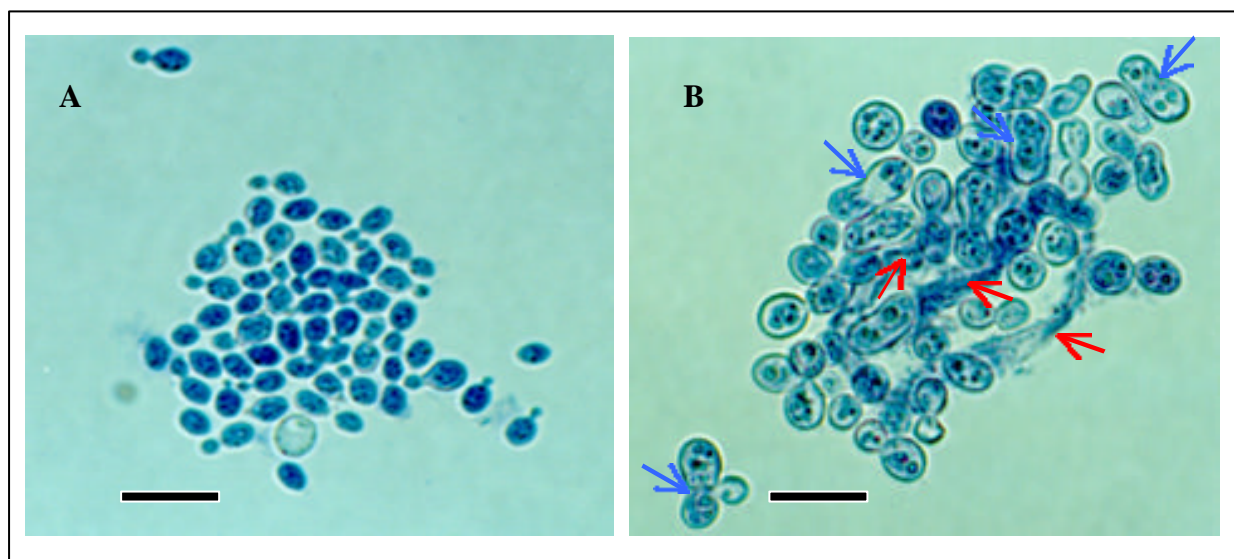


Figure 3.1. Photographies obtenues par microscopie optique à contraste de phase de cellules de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 cultivées à 4°C (A) et à 18°C (B). La mise en évidence de la lyse cellulaire et la libération de la fraction cytoplasmique (montré par des flèches rouges) est réalisée grâce à une coloration au bleu de méthylène. Les flèches bleues montrent les déformations cellulaires qui apparaissent vraisemblablement suite au blocage des processus de division cellulaire. Les barres d'échelle correspondent à 10 μm

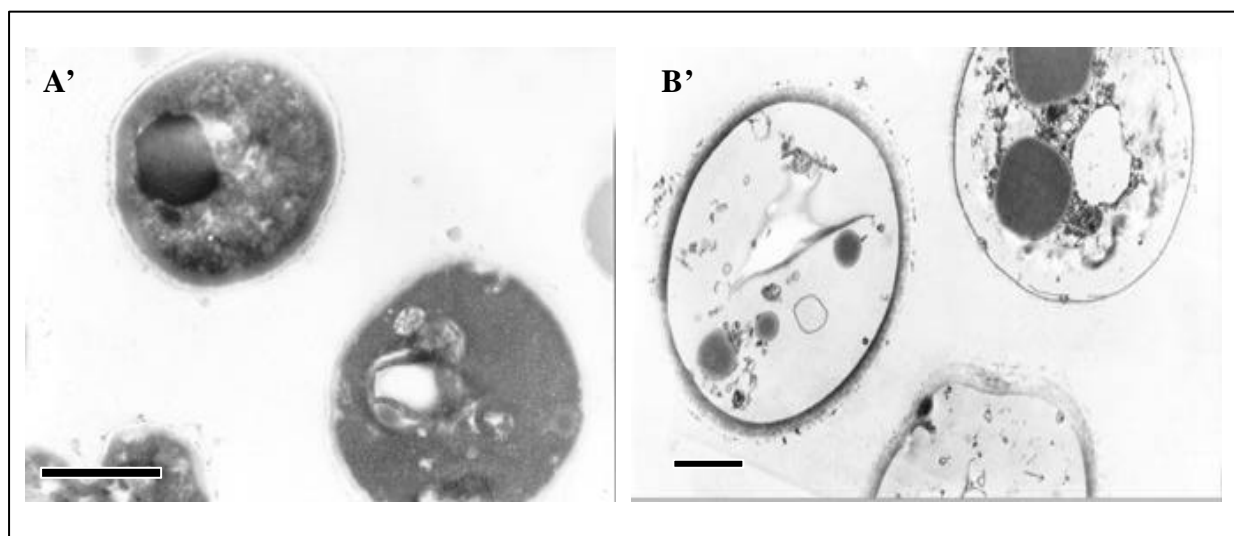


Figure 3.2. Photographies obtenues par microscopie électronique à transmission de cellules de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 cultivées à 4°C (A') et à 18°C (B'). Les barres d'échelle correspondent à 1 μm.

L'analyse des photographies montrées ci-dessus révèle que les cellules cultivées à basse température ont une taille de 5 à 10 μm. Les bourgeons sont de petites tailles et bien délimités par rapport aux cellules mères. A 18°C, des changements morphologiques profonds sont observés. En effet, les cellules ont une taille jusqu'à 5 fois supérieure à celles des cellules

obtenues à 0°C. Les processus de bourgeonnement sont inhibés et les cellules sont incapables d'achever leur division (flèches bleues sur la figure 3.1.B). Il y a également une forte vacuolarisation, une altération des membranes plasmiques et une libération du contenu cytoplasmique (flèches rouges sur la figure 3.1.B). Les photographies obtenues par microscopie électronique à transmission montrent également que le contenu cytoplasmique est altéré et que le cytoplasme est réduit à quelques vacuoles (figure 3.2)

3.2. Incidence des chocs de hautes températures sur la morphologie cellulaire

La lyse cellulaire aux températures modérées est un phénomène assez commun chez les psychrophiles (Gounot *et al.*, 1976, 1977, Ferroni et Inniss, 1973, 1974). Des auteurs expliquent ce phénomène par l'hyperfluidité qui caractérise les membranes des psychrophiles. En effet, chez les psychrophiles, les phospholipides membranaires sont riches en acides gras à courtes chaînes et à chaînes insaturées. Cette caractéristique, indispensable lors de la croissance aux basses températures, diminuerait la température de fusion des membranes cellulaires et abaisserait la température supérieure limitant la croissance (Russell et Fukunaga, 1990).

L'expérience qui suit nous permet de vérifier, chez la souche psychrophile, l'existence d'un lien entre la fluidité membranaire et l'incapacité de croissance au delà de 20°C.

Nous avons eu recours à des transferts des cultures de 4 à 18°C, après différents temps d'incubation à 4°C (voir § 5 du M.&M.). Au cas où la lyse cellulaire serait liée à la fluidité membranaire, elle devrait survenir indépendamment du moment du transfert et du stade physiologique des cellules.

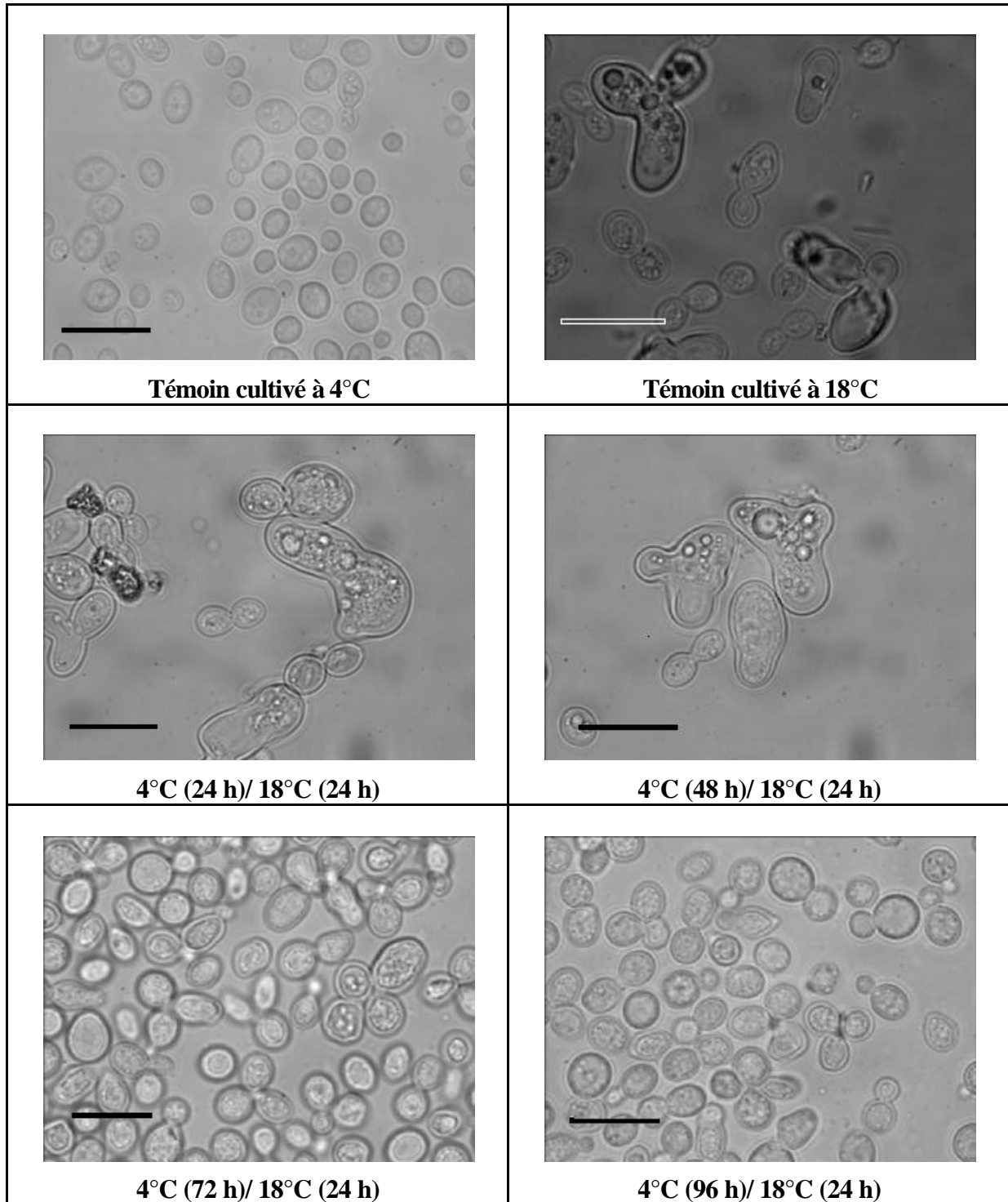


Figure 3.4. Incidence des chocs de température sur la morphologie de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19. Le début de croissance des cultures est réalisé à 4°C puis, à des intervalles de temps réguliers, les cultures sont transférées à 18°C (voir § 5 du M.&M.). L'observation microscopique est réalisée après 24 h de culture à 18°C. Les barres d'échelle correspondent à 5 µm.

L'analyse en microscopie optique (figure 3.4) montre une modification importante de la morphologie cellulaire lorsque les cellules sont transférées en début de phase exponentielle de croissance (24 et 48 h) par rapport à celles transférées à la fin de cette phase ou en état de croissance stationnaire (72 et 96 h). Comme il est montré dans la figure 3.1, ce changement morphologique est probablement associé à une lyse des cellules. Cette thermosensibilité, en début de la phase exponentielle de croissance, se traduit également par un accroissement considérable de la taille des cellules et à une intense vacuolarisation.

3.3. Discussion

L'inhibition des processus de bourgeonnement et les altérations au niveau de la membrane plasmique pourraient être parmi les causes de l'incapacité de la souche psychrophile à se développer aux températures modérées. Ces altérations de la morphologie cellulaire résultant d'un choc thermique dépendent étroitement du stade de croissance et ne s'observent que lorsque le transfert à partir des basses températures vers les températures modérées se produit pendant la phase exponentielle.

D'autre part, Perrier *et al.* (1995, 1997), dans une étude de la composition des lipides et phospholipides d'une vingtaine d'espèce de *Rhodotorula*, n'ont pas pu révéler de changements significatifs dans la composition des lipides cellulaires au cours des différents stades de la croissance. Par conséquent, l'hypothèse émise par Russell (1990), basée sur l'existence d'un lien entre lyse cellulaire et altération de la membrane plasmique liée spécifiquement à une fluidité membranaire accrue, semble ne pas se vérifier dans le cas la souche *R. aurantiaca* A19.

Chapitre 4 :

Influence des températures modérées sur le métabolisme des acyl-CoAs chez la souche psychrophile R. aurantiaca A19

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, plusieurs travaux décrivent la sélection de mutants thermosensibles. Ces mutants montrent une croissance perturbée au delà de 30°C et sont incapables d'achever leurs divisions à 37°C (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1991, 1992 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Knoll *et al.*, 1995 ; Ashrafi *et al.*, 1998). Les mutations se situent à différents niveaux du métabolisme des acyl-CoAs et entraînent, entre autre, des altérations de la morphologie cellulaire.

Chez la souche *R. aurantiaca* A19, les perturbations morphologiques liées aux températures de culture suggèrent que l'incapacité de cette levure à se développer aux températures modérées pourrait être liée à une déficience dans le métabolisme des acyl-CoAs.

4.1. Influence de l'addition d'acides gras sur la croissance aux températures supérieures limitant la croissance de la souche *R. aurantiaca* A19

Le mutant '*nmt-181*' est l'un des mutants thermosensibles de *S. cerevisiae*. Ce mutant, récemment isolé, montre un comportement similaire à celui de *R. aurantiaca* A19 ; à savoir une thermosensibilité pendant la phase exponentielle de croissance et des perturbations morphologiques lors du transfert de 24 à 37 °C (Johnson *et al.*, 1994). Le mutant *nmt-181* produit une acyl-transférase dont l'affinité vis-à-vis de son substrat est fortement diminuée au delà de 30°C. Chez la souche sauvage, cette enzyme est très active pendant la phase exponentielle de croissance et contrôle l'activation par acylation d'une dizaine de protéines essentielles (Johnson *et al.*, 1994, Duronio *et al.*, 1992, 1991). L'ajout dans le milieu de culture de certains acides gras saturés, ayant 12 à 18 atomes de carbone, apporte à la cellule les substrats de la transférase, les acyl-CoAs, et restaure la croissance aux températures non permissives (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Knoll *et al.*, 1995).

Dans cette expérience, nous avons vérifié si l'incapacité de la souche *R. aurantiaca* A19 à se développer au voisinage de 18°C est réellement due à une auxotrophie pour certains acides gras. La figure 4.1 montre les résultats de la croissance à 18°C sur le milieu YPD en présence de différents acides gras ; le laurate (C12:0), le myristate (C14:0), le palmitate (C16:0) et le stéarate (C18:0).

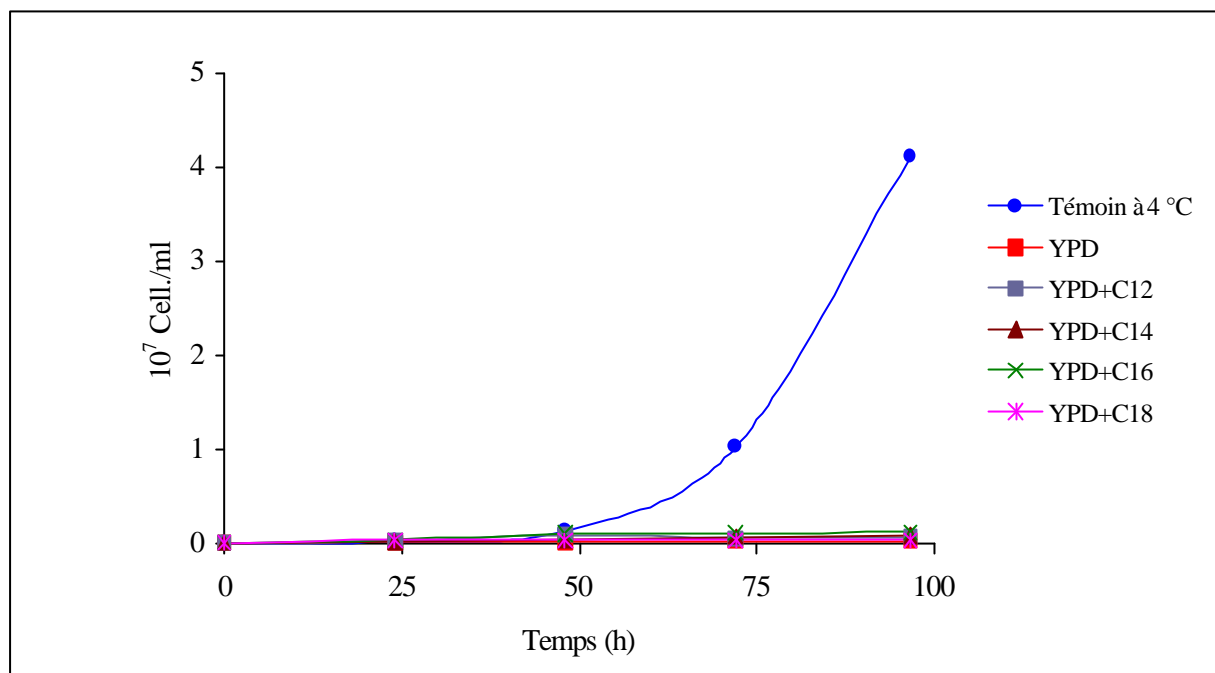


Figure 4.1. Influence de l'ajout d'acides gras sur la croissance à 18°C de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19. Les acides gras ajoutés sont l'acide laurique (C12:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), à une concentration de 500 μ M (voir § 7.1 du M.&M.).

Le suivi de la croissance de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 en présence et en absence d'acides gras ne permet pas de déceler de différences significatives. Aucun des acides gras utilisés ne permet une amélioration nette de la croissance. Le comportement de *R. aurantiaca* A19 ne peut donc être expliqué par une simple auxotrophie vis-à-vis de l'un des acides gras testés.

4.2. Influence de la température sur la concentration cellulaire des acyl-coAs

Les acides gras, qui rentrent dans le métabolisme des lipides et des phospholipides, se trouvent sous forme d'acyl-CoAs. Par conséquent, les acyl-CoAs représentent des éléments clefs dans le métabolisme des phospholipides membranaires. De plus, comme nous l'avons signalé dans la partie Introduction, ces molécules interviennent également dans la régulation de plusieurs voies métaboliques (Comerford *et al.*, 1993 ; Ostermann *et al.*, 1993 ; Pfanner *et al.*, 1989, 1990.). C'est pourquoi nous avons voulu étudier plus en profondeur l'incidence de

la température de culture sur le contenu en acyl-CoAs chez *R. aurantiaca* A19. Les méthodes d'extraction et de dosage des acyl-CoAs utilisées sont adaptées des méthodes proposées par Prasad *et al.* (1987) et Rosendal et Knudsen (1992). Elles sont décrites au § 7.2 du M.&M.

4.2.2. Dosage par HPLC des acyl-CoAs

La souche psychrophile est cultivée à 0 et à 18°C. La croissance est arrêtée en acidifiant le milieu en phase exponentielle ($\pm 10^7$ cell/ml). L'acidification permet également d'éviter l'hydrolyse spontanée et enzymatique des acyl-CoAs (Prasad *et al.*, 1987). L'extraction est ensuite réalisée sur le culot cellulaire. Les acyl-CoAs extraits sont ensuite lyophilisés et dosés par HPLC en utilisant une colonne à phase inversée de type LiChrospher 100 RP (voir § 7.2 du M.&M). La figure 4.3 montre les chromatogrammes obtenus.

Sous les conditions d'analyses appliquées (décrites au § 7.2.2 du M.&M), les temps de rétention de décanoyl-CoA, de myristoyl-CoA, de palmitoyl-CoA et de stéaroyl-CoA sont respectivement de 16,2 ; 25,1 ; 39,7 ; 45,2 et 52,1 min (voir figure 2 du § 7.2.2 du M.&M.).

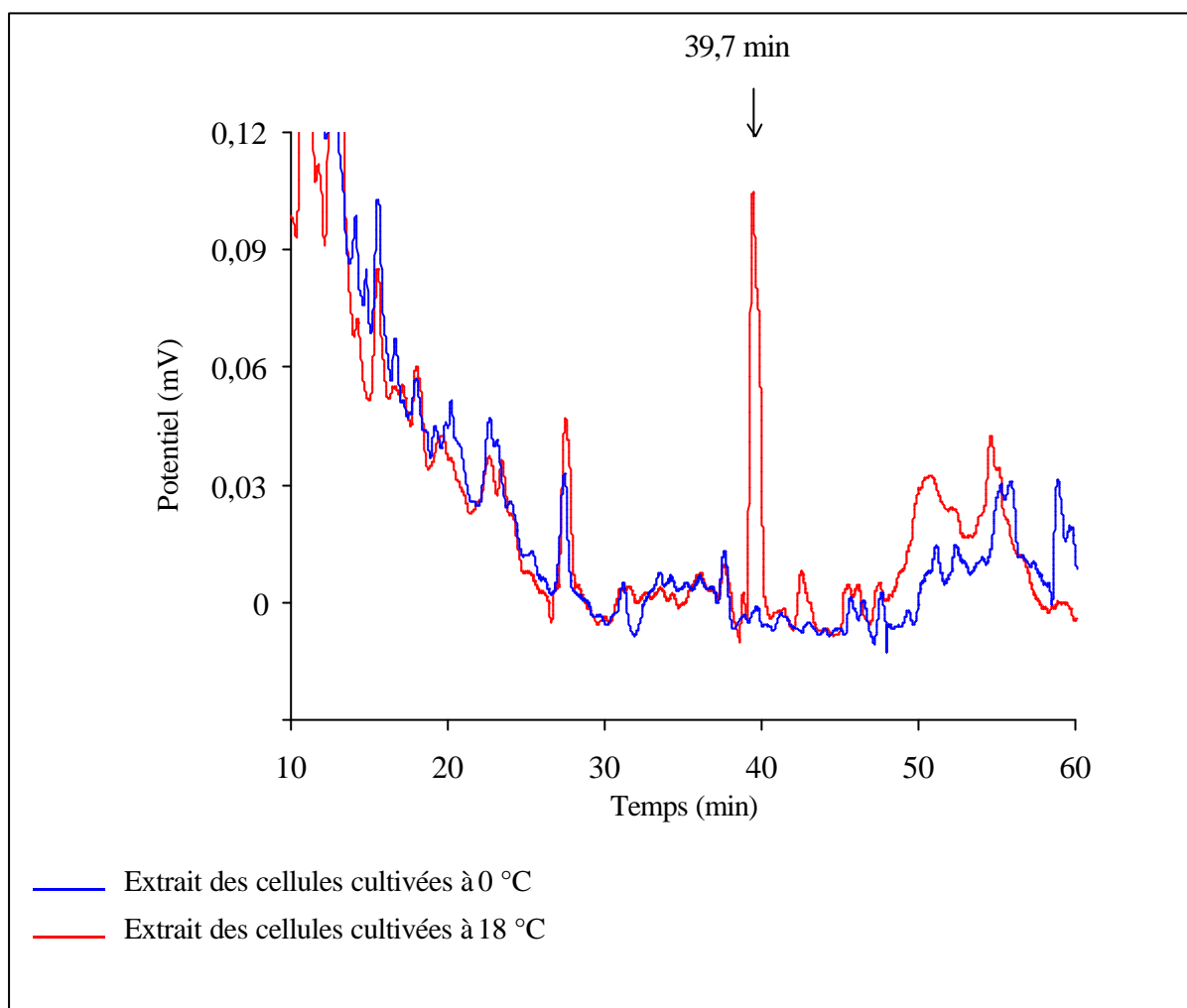


Figure 4.3. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC sur colonne à phase inversée LiChrospher 100 RP (Merck) des acyl-CoAs extraits des cellules cultivées à 0 et à 18°C. Le volume d'injection est de 40 μ l. Les phases mobiles sont : A, 20% d'acétonitrile/80% de tampon KH_2PO_4 25 mM pH 5,3 et B, 80% d'acétonitrile/20% de tampon KH_2PO_4 25 mM pH 5,3. Le programme d'élution est : 0% B pendant 10 min, de 0% B à 60% B en 55 min, 60% B pendant 10 min, de 60% B à 100% B en 10 min, 100% pendant 10 min et de 100% B à 0% B en 5 min. Le débit est de 1 ml/min, le volume d'échantillon injecté sur la colonne est de 40 μ l et l'absorbance est suivie à 254 nm.

La comparaison des chromatogrammes des extraits des cellules cultivées à 0 et à 18°C laisse apparaître une différence majeure au niveau du pic dont le temps de rétention est de 39,7 min. Ce temps de rétention correspond au myristoyl-CoA (voir figure 2 du § 7.2.2 du M.&M.). La concentration de ce composé dans l'extrait des cellules cultivées à 18 °C (500 μ M) est plus de 28 fois supérieure à celle des cellules cultivées à 0°C. Le composé correspondant à ce pic a été récolté et analysé par spectrométrie de masse pour une identification précise.

4.2.3. Identification par spectrométrie de masse

Cette étude a été réalisée dans les services des professeurs De Graeve et De Pauw. Elle a nécessité une mise au point préalable dans le but de déterminer la technique d'ionisation adéquate. Moyennant une adaptation du potentiel électrique à appliquer au cône d'extraction, la technique d'ionisation par électrospray en mode positif s'est avérée la plus adaptée pour notre analyse (voir § 7.3 du M.&M.).

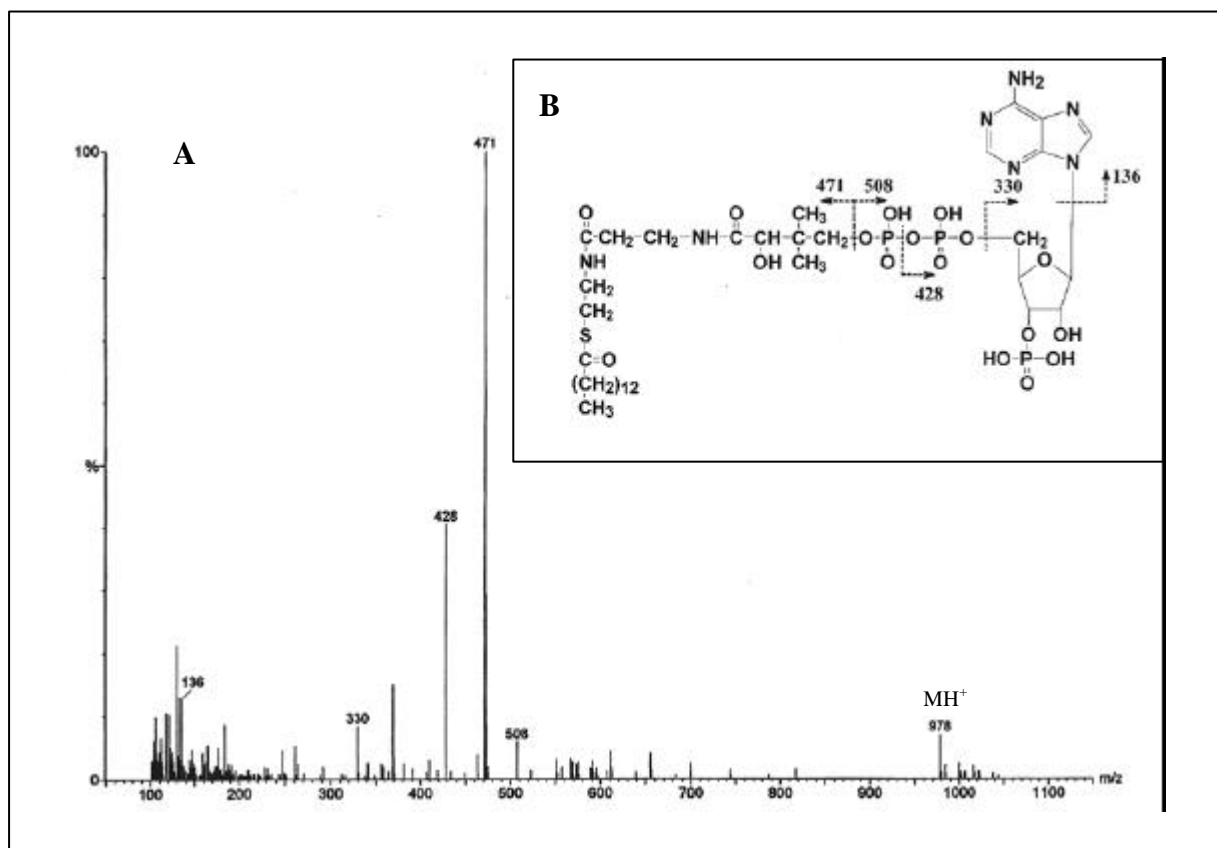


Figure 4.4. (A) Spectre de masse du composé présent dans l'extrait des cellules cultivées à 18°C et dont le temps de rétention est de 39,7 min sur la colonne à phase inversée (LiChrospher 100 RP-18). (B) Formule développée du myristoyl-CoA avec les différentes possibilités d'ionisation proposées dans la littérature (Norwood *et al.*, 1990 ; Taylor *et al.*, 1990 ; Millington *et al.*, 1991).

Le myristoyl-CoA ($C_{35}H_{62}O_{17}N_7SP_3$) a une masse moléculaire de 977 Da. Le pic à m/z 978 serait donc l'ion moléculaire $[M+H]^+$. On retrouve également, sur le spectre de masse (figure 4.4, A), plusieurs ions cités dans la littérature comme étant des fragments caractéristiques des acyl-CoAs (figure 4.4, B) (Norwood *et al.*, 1990 ; Taylor *et al.*, 1990 ; Millington *et al.*, 1991). La présence du pic à m/z 471 ne laisse aucun doute sur l'identité de

ce composé. En effet cet ion est caractéristique du myristoyl-CoA et renseigne la taille du groupement acyle (Norwood *et al.*, 1990).

4.3. Discussion

La concentration calculée du myristoyl-CoA dans les cellules cultivées à 18°C est de 500 μM . Cette concentration est 28 fois supérieure à celle des même cellules cultivées à 0°C. Les autres acyl-CoAs allant de C8 à C18 ne présentent pas de pics significatifs dans le chromatogramme de la figure 4.3 et sont difficiles à mettre en évidence.

En l'absence d'acides gras exogènes, le myristoyl-CoA ainsi que tous les acyl-CoAs sont produits par le complexe enzymatique de l'acide gras synthétase (FAS). Chez les eucaryotes, cette enzyme produit en majeure partie le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA (Lynen *et al.*, 1980). Dans les conditions normales, compte tenu de leur toxicité, le niveau total des acyl-CoAs est strictement en dessous de 160 μM et le myristoyl-CoA en représente moins de 5 % (Lynen *et al.*, 1969 ; Singh *et al.*, 1985 ; Hori *et al.*, 1987 ; Faergeman et Knudsen, 1997).

Comme le montre la figure 4.7, la concentration cellulaire en acyl-CoAs, et à fortiori en myristoyl-CoA, résulte principalement de l'équilibre entre la synthèse, l'utilisation et l'hydrolyse (Berge et Aarsland, 1985 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). Les protéines fixant les acyl-CoAs (ACBP), les protéines fixant les acides gras (FABP) ainsi que les membranes cellulaires sont également impliquées dans la régulation de la concentration de ces molécules et jouent globalement le rôle d'un réservoir tampon (figure 4.7) (Faergeman et Knudsen, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000).

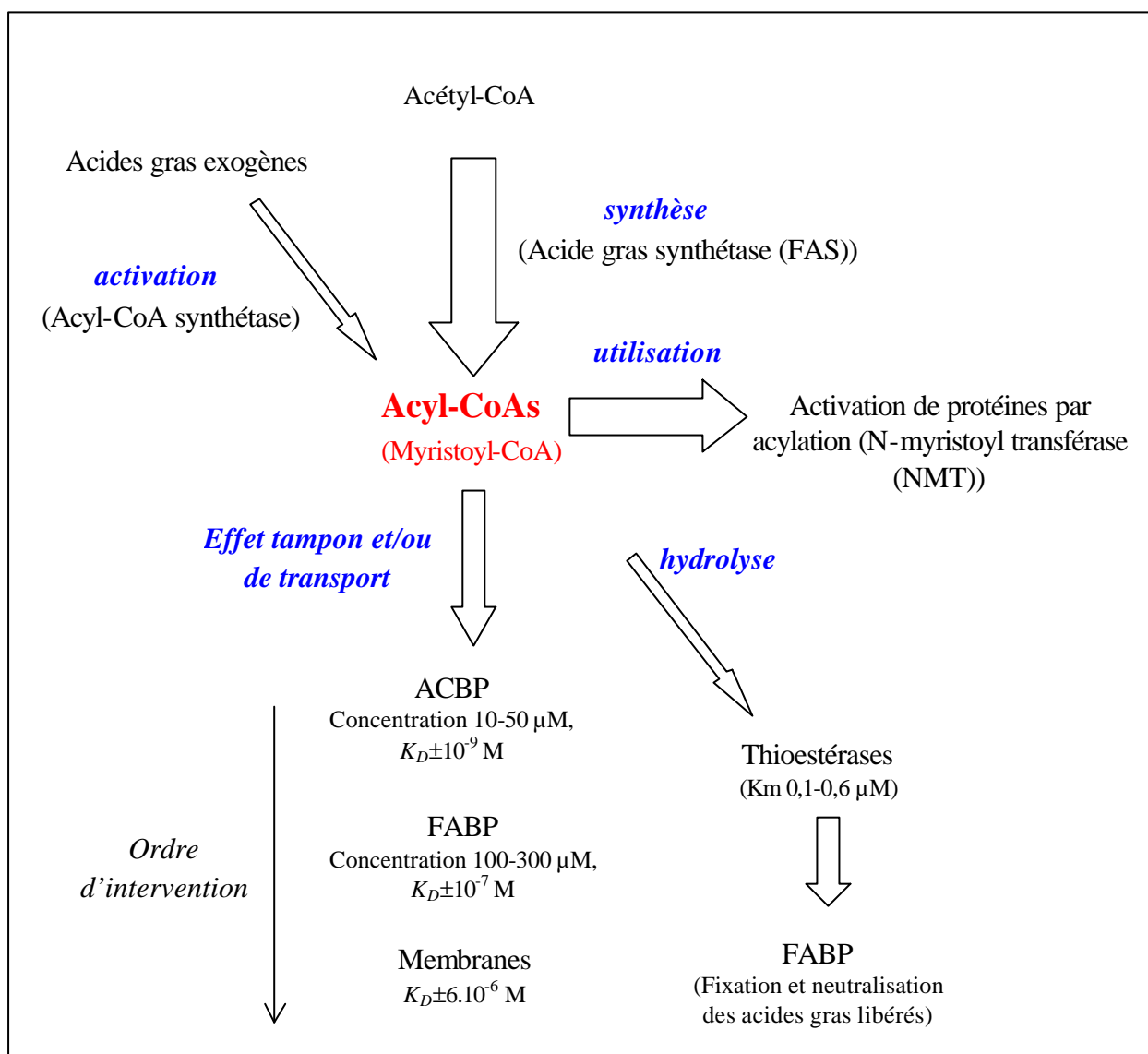


Figure 4.7. Schéma du métabolisme des acyl-CoAs inspiré des travaux de Faergeman et Knudsen (1997) ; Svensson *et al.* (1998) et Knudsen *et al.* (1999) (2000). ACBP : protéines fixant les acyl-CoAs (Acyl-CoA Binding Proteins), FABP : protéines fixant les acides gras (Fatty Acid Binding Proteins).

Comme tous les acyl-CoAs, le myristoyl-CoA a une structure amphiphile (figure 4.4.B) et se comporte comme un détergent très toxique. A concentration élevée, cette molécule provoque la solubilisation des bicouches membranaires et inhibe plusieurs enzymes et voies métaboliques (Boylan *et al.*, 1992 ; Requero *et al.*, 1995 ; Banhegyi *et al.*, 1996).

Chez la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 cultivée au voisinage de 20°C, l'augmentation du niveau de myristoyl-CoA laisse présager d'une rupture de la régulation de

la concentration intracellulaire de cette molécule et semble constituer un élément important dans l'explication du phénomène de lyse cellulaire.

L'hypothèse d'une suractivation thermique de l'acide gras synthétase (FAS) est à exclure puisque cette enzyme produit en majeure partie le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA (Lynen *et al.*, 1969 ; Singh *et al.*, 1985 ; Johnson *et al.*, 1994).

La deuxième hypothèse à envisager pour expliquer la teneur élevée en myristoyl-CoA est une déficience au niveau de son utilisation et/ou de son hydrolyse.

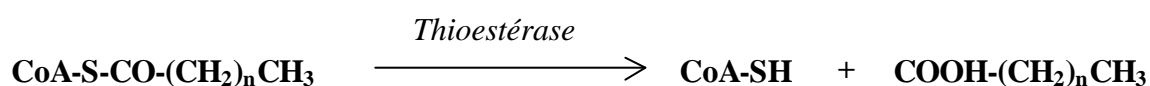
Chez les levures, la myristoylation des protéines est l'une des principales voies d'utilisation du myristoyl-CoA (Duronio *et al.*, 1991, 1992, Johnson *et al.*, 1994). Cette transformation, catalysée par la N-myristoyltransférase (NMT), concerne une douzaine de protéines et permet leur activation. Plusieurs auteurs ont démontré l'importance de cette transformation dans la mesure où elle se trouve en amont de plusieurs voies métaboliques (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1992, 1991 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Knoll *et al.*, 1995 a, 1995 b ; Ashrafi *et al.*, 1998).

Chez *R. aurantiaca*, une déficience dans la N-myristoyltransférase peut certainement provoquer un arrêt de la croissance. Cependant, elle ne peut, à elle seule, expliquer une telle ampleur d'accumulation de myristoyl-CoA. En effet, dans les conditions normales, tout excès en cette molécule et en acyl-CoAs serait évité grâce à l'activité thioestérase (Svensson *et al.*, 1998, Faergeman et Knudsen 1997, Berge et Aarsland 1985). Cette activité réduit considérablement la toxicité du myristoyl-CoA en le clivant en coenzyme A et en myristate. Ce dernier est alors aussitôt neutralisé par sa complexation par les FABP (figure 4.7) (Faergeman et Knudsen, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000).

Comme les thioestérases jouent un rôle important dans le maintien du faible niveau intracellulaire en acyl-CoAs, nous nous sommes focalisé sur cette activité dans la suite du travail.

Chapitre 5 :
Production de l'activité thioestérase par la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19

Les thioestérases ou les hydrolases des acyl-CoAs sont des enzymes largement répandues chez les êtres vivants. Elles hydrolysent notamment les liaisons thioesters des acyl-CoAs :



Il existe deux classes de thioestérases qui diffèrent par leurs fonctions cellulaires. La première classe correspond à des thioestérases qui font partie du complexe enzymatique de l'acide gras synthétase (FAS). Leur rôle est d'arrêter l'élongation des acides gras lors du processus de condensation (Knudsen *et al.*, 1975 ; Libertini *et al.*, 1978). La FAS est cytoplasmique et sa masse moléculaire est au-dessus de 240 kDa (Kasturi *et al.*, 1988 ; Jayakumar *et al.*, 1997, Chirala *et al.*, 1997,).

La deuxième classe de thioestérases regroupe des isoenzymes qui se trouvent principalement au niveau des lysosomes, des peroxysomes et des mitochondries, mais peuvent également être isolées du cytoplasme (Broustas *et al.*, 1996 ; Verkruyse *et al.*, 1996 ; Svensson *et al.*, 1995, 1998 ; Poupon *et al.*, 1999). Le rôle de ce groupe de thioestérases est moins bien défini. Néanmoins, plusieurs travaux récents montrent que ces isoenzymes sont impliqués dans la régulation de la concentration cellulaire des acyl-CoAs et dans le

catabolisme des acides gras (Berge et Aarsland 1985 ; Faergeman *et al.*, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). Chez les eucaryotes, cette deuxième classe de thioestérases est différenciée de la première par la masse moléculaire qui est souvent inférieure à 100 kDa (Broustas *et al.*, 1996 ; Diczfalusy *et al.*, 1996 ; Poupon *et al.*, 1999).

5.1. Production en fermenteur de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19

Les essais d'isolement et de quantification de l'activité thioestérase chez *R. aurantiaca* A19 montrent que cette souche produit une faible activité thioestérase. Cette activité se retrouve dans la fraction soluble après lyse mécanique des cellules.

Compte tenu de la faible activité de l'extrait cellulaire, il était nécessaire de purifier cette enzyme en partant d'une grande quantité de biomasse. C'est pourquoi nous avons réalisé des cultures en fermenteur de 20 l et puis en fermenteur de 400 l.

5.1.1. Production de la biomasse en fermenteur de 20 l

Une première culture de *R. aurantiaca* est réalisée en fermenteur de 20 l dans les conditions décrites au § 2.2 du M.&M. La culture est réalisée à 0°C grâce à des adaptations du système de refroidissement de la cuve (voir § 2.3 du M.&M.). Le milieu utilisé est le milieu YPD décrit au § 2.3 du M.&M. L'agitation et l'aération du fermenteur sont fixés respectivement à 200 t/min et 0,5 vvm.

L'évolution des paramètres de la fermentation est enregistrée en continu par un ordinateur. La croissance est suivie par dénombrements au microscope sur cellule de Burkner. Les deux graphes de la figure 5.1 montrent l'évolution en fonction du temps de culture, de la biomasse, de la concentration en glucose, du pH, de l'activité thioestérase, du pourcentage d'O₂ et de CO₂ dans les gaz à la sortie du fermenteur ainsi que du quotient respiratoire.

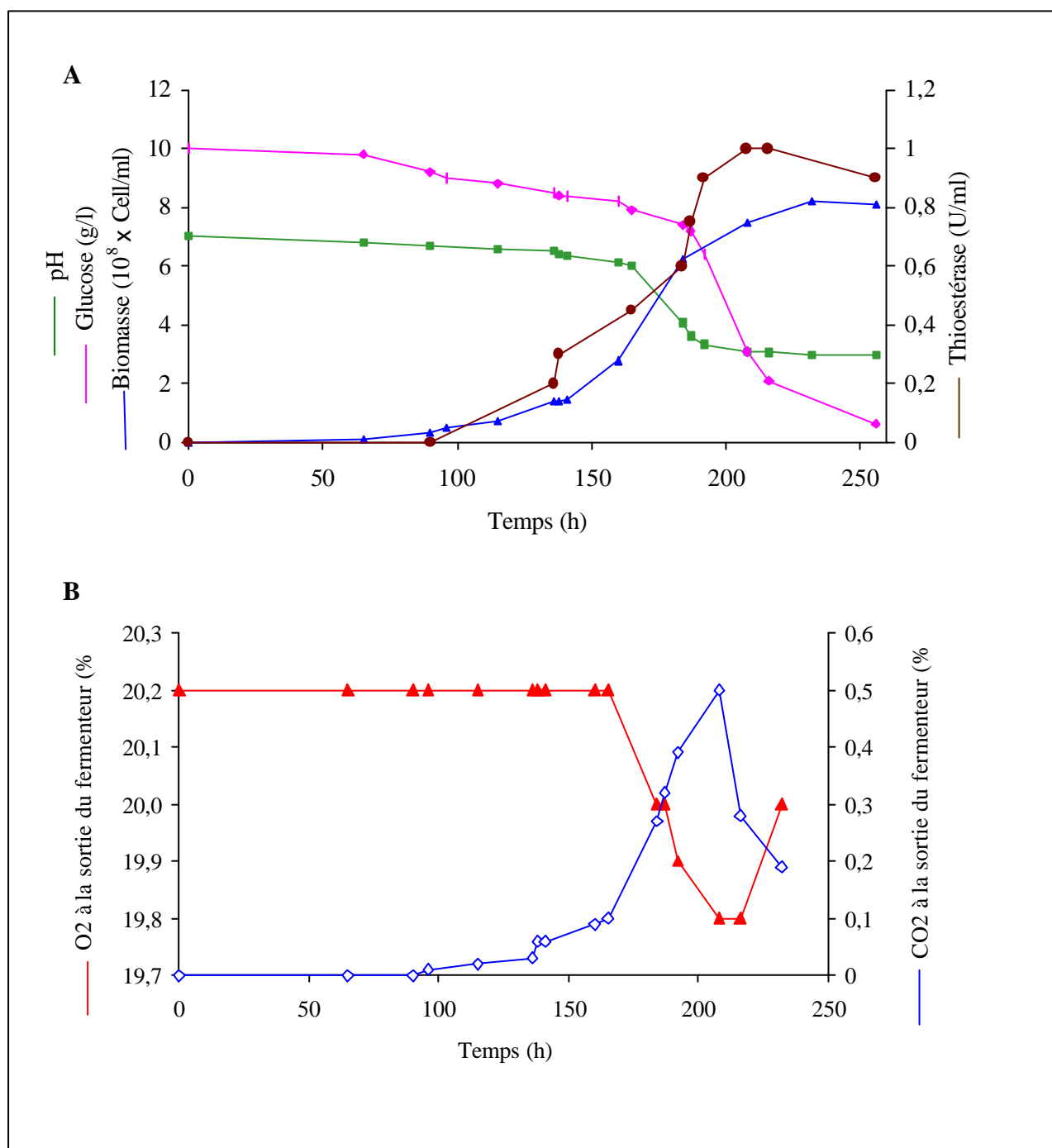


Figure 5.1. Suivi de la croissance de la souche *Rhodotorula aurantiaca* A19 en fermenteur de 20 l. La culture est réalisée à 0°C en milieu YPD. L'agitation et l'aération du fermenteur sont fixés respectivement à 200 t/min et 0,5 vvm.

A : Suivi de la biomasse, de la concentration en glucose, du pH et de l'activité thioestérase.

B : Suivi des taux d'O₂ et de CO₂ dans les gaz à la sortie des du fermenteur.

La culture de *Rhodotorula aurantiaca* A19 en fermenteur de 20 l est achevée en 240 h. La phase de latence est particulièrement longue et dure 60 heures. Après cette période où les cellules s'adaptent aux conditions de culture, la consommation d'oxygène augmente au fur et à

mesure que la biomasse croît. Le pH diminue avec la consommation du glucose. Après 208 heures de culture, la respiration diminue indiquant la fin de la croissance.

La vitesse spécifique de croissance (μ_{\max}) est de $0,055 \text{ h}^{-1}$ ce qui donne un temps de génération (tg) de l'ordre de 13 h. La biomasse finale est de 8.10^8 cellules/ml. La production de thioestérase est de $1 \text{ U}/10^9$ cellules, soit 1000 U/l de culture.

5.1.2. Production en fermenteur de 400 l

La production de la levure psychrophile a aussi été réalisée dans un fermenteur de 400 l (volume de culture 250 l). Les conditions de l'expérience sont décrites au § 2.2 du M.&M.

L'agitation et l'aération sont fixées respectivement à 85 t/min et 0,3 vvm. Le pH n'est pas régulé. La température, pour des raisons techniques, varie entre 10 et 15°C.

La croissance est suivie par le dénombrement des cellules au microscope sur cellule de Burker. Le temps de génération (tg) avoisine 6 h, ce qui donne une vitesse de croissance 2 fois plus élevée que celle observée dans le cas de la culture en fermenteur de 20 l. La concentration cellulaire, en fin de culture, est de 1.10^8 cellules/ml. La production de thioestérase est de $1 \text{ U}/10^9$ cellules et correspond à 100 U/l en fin de culture.

5.1.3. Discussion

L'adaptation du système de refroidissement utilisé pour la culture en fermenteur de 20 l était difficilement transférable à l'échelle du fermenteur de 400 l. Nous n'avons donc pu maintenir la température en dessous de 12°C. Cette température élevée affecte le rendement en biomasse et l'activité enzymatique de la culture qui sont 8 à 10 fois plus élevés en fermenteur de 20 l où la température de culture est de 0°C. Cette expérience met en évidence la difficulté de cultiver à grande échelle cette souche psychrophile.

Notons que la synthèse de la thioestérase ne semble pas être influencée par la température de culture. Elle est d'environ $1 \text{ U}/10^9$ cellules à une température de 0 °C comme à 10-15 °C.

5.2. Caractérisation de l'activité thioestérase

5.2.1. Lyse cellulaire et fractionnement de l'extrait

La biomasse obtenue est lysée mécaniquement au moyen d'une presse de French (voir § 3 du M.&M.). L'extrait cellulaire est ensuite fractionné par chromatographie sur tamis moléculaire et par isoélectrofocalisation afin de déterminer le nombre de thioestérases présentes dans l'extrait cellulaire et la classe à laquelle elles appartiennent.

L'activité thioestérase est déterminée par une méthode colorimétrique décrite par Svensson *et al.* (1995) et Ellman (1959) basée sur le titrage par le DTNB des groupements -SH du CoASH libéré après hydrolyse du myristoyl-CoA (voir § 8.1 du M.&M.).

5.2.1.1. Fractionnement de l'extrait cellulaire sur tamis moléculaire

L'extrait cellulaire est déposé sur un tamis moléculaire Sephacryl S-200 (gamme de fractionnement : 5 à 250 kDa) et élué selon les conditions décrites au § 8.2.1 du M.&M. La figure 5.2 montre le profil d'éluion des protéines ainsi que celui de l'activité thioestérase.

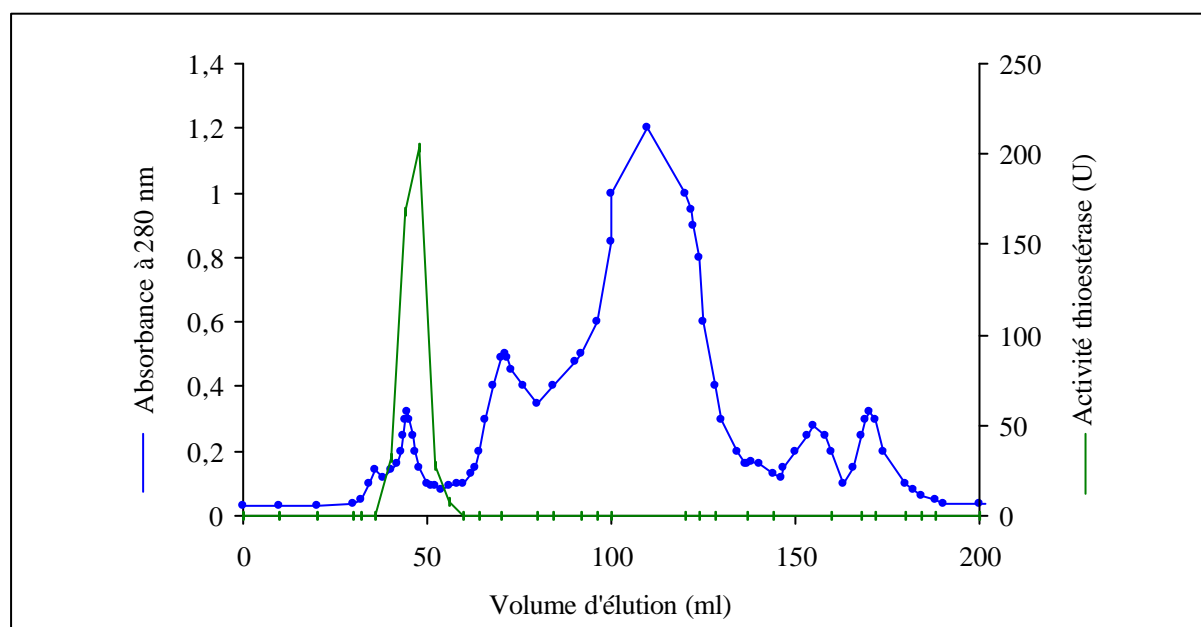


Figure 5.2. Chromatographie FPLC sur colonne de tamis moléculaire HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Pharmacia). Le volume d'extrait cellulaire injecté est de 4 ml. Les protéines sont éluées par un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7 à un débit de 18 ml/heure. Le volume des fractions est de 4 ml et l'absorbance est mesurée à 280 nm.

L'activité thioestérase maximale est éluée après passage de 48 ml de tampon, ce qui correspond à une masse moléculaire de 80 ± 5 kDa selon la droite de calibration de la colonne (voir § 8.2.1 du M.&M.).

5.2.1.2. Fractionnement de l'extrait cellulaire par isoélectrofocalisation

L'extrait cellulaire est également fractionné par isoélectrofocalisation sur un appareillage de type Rotofor (Bio-rad) (voir § 8.2.2 du M.&M.). Le gradient de pH et la position de l'activité thioestérase dans la colonne du Rotofor sont repris dans la figure 5.3.

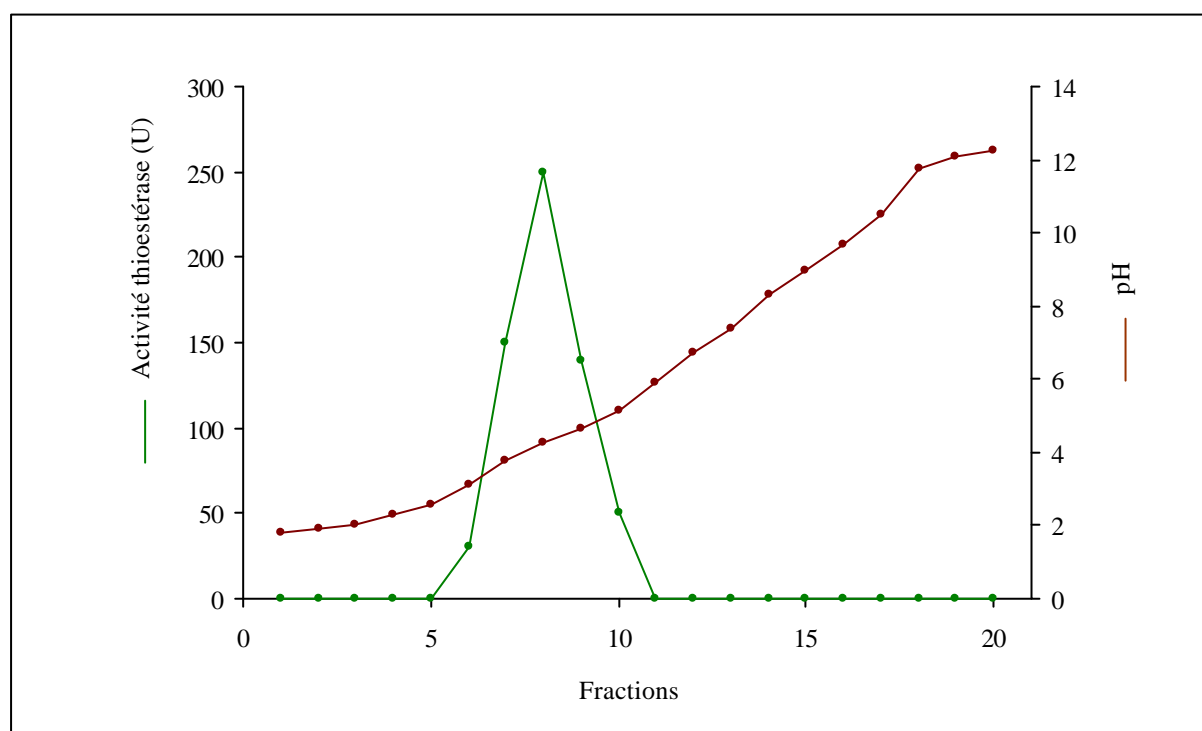


Figure 5.3. Fractionnement de l'extrait cellulaire par isoélectrofocalisation au moyen d'un Rotofor (Bio-rad). 10 ml d'extrait cellulaire sont fractionnés et des fractions d'un volume de 5 ml sont récoltées. Le pH et l'activité thioestérase sont ensuite mesurés pour chacune de ces fractions.

L'activité thioestérase se répartit dans 5 fractions entre pH 3,1 et 5,2 avec un maximum d'activité à pH 4,2.

5.2.1.3. Discussion

Le fractionnement par focalisation isoélectrique et par chromatographie sur tamis moléculaire révèle la présence d'un seul pic d'activité thioestérase. Compte tenu de sa masse moléculaire (80 ± 5 kDa), cette enzyme pourrait être classée dans le groupe des thioestérases impliquées dans le catabolisme des acides gras et dans la régulation de la concentration intracellulaire des acyl-CoAs (Broustas *et al.*, 1996 ; Diczfalusy *et al.*, 1996 ; Poupon *et al.*, 1999).

Chapitre 6 :
Purification de la thioestérase de la souche psychrophile R.
aurantiaca A19

Plusieurs résines sont décrites dans la littérature comme étant susceptibles de lier les ester-hydrolases par affinité. Trois d'entre elles ont été testées dans ce travail ; l'héparine agarose (Becht *et al.*, 1980), la cholestéryl-hémisuccinate agarose (Wichman *et al.*, 1979, Fukuyama *et al.*, 1979) et la désulfo-CoA-agarose. Les tentatives de purification de la thioestérase par ces résines se sont traduites par une absence de fixation de l'enzyme sur les ligands. Nous avons donc eu recours aux techniques classiques de purification de protéines.

6.1. Extraction et fractionnement des protéines cellulaires

La purification a été réalisée à partir de la biomasse produite en fermenteur de 400 l (voir § 5.1.2 du chapitre 5). La lyse des cellules est réalisée à l'aide d'un homogénéisateur à 1500 bars (voir § 3 du M.&M.).

L'extrait cellulaire est traité au sulfate de protamine pour éliminer les acides nucléiques puis fractionné au sulfate d'ammonium (voir §9.1 du M.&M.). 56 % d'activité sont récupérés pour une gamme de concentration comprise entre 30 et 80 % de saturation en ce sel. L'activité totale récupérée après ces étapes est de 1900 U pour 2,68 g de protéines.

La suite de la purification comporte 3 étapes : une chromatographie hydrophobe sur phényl-Sepharose, une chromatographie sur échangeur d'anions et une chromatographie hydrophobe sur phényl-Superose.

6.2. Purification par chromatographie

6.2.1. Chromatographie hydrophobe sur phényl-Sepharose

Après précipitation au sulfate d'ammonium, l'activité récupérée est remise en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7 puis déposée au sommet d'une colonne hydrophobe de type phényl-Sepharose (voir § 9.2 du M.&M.).

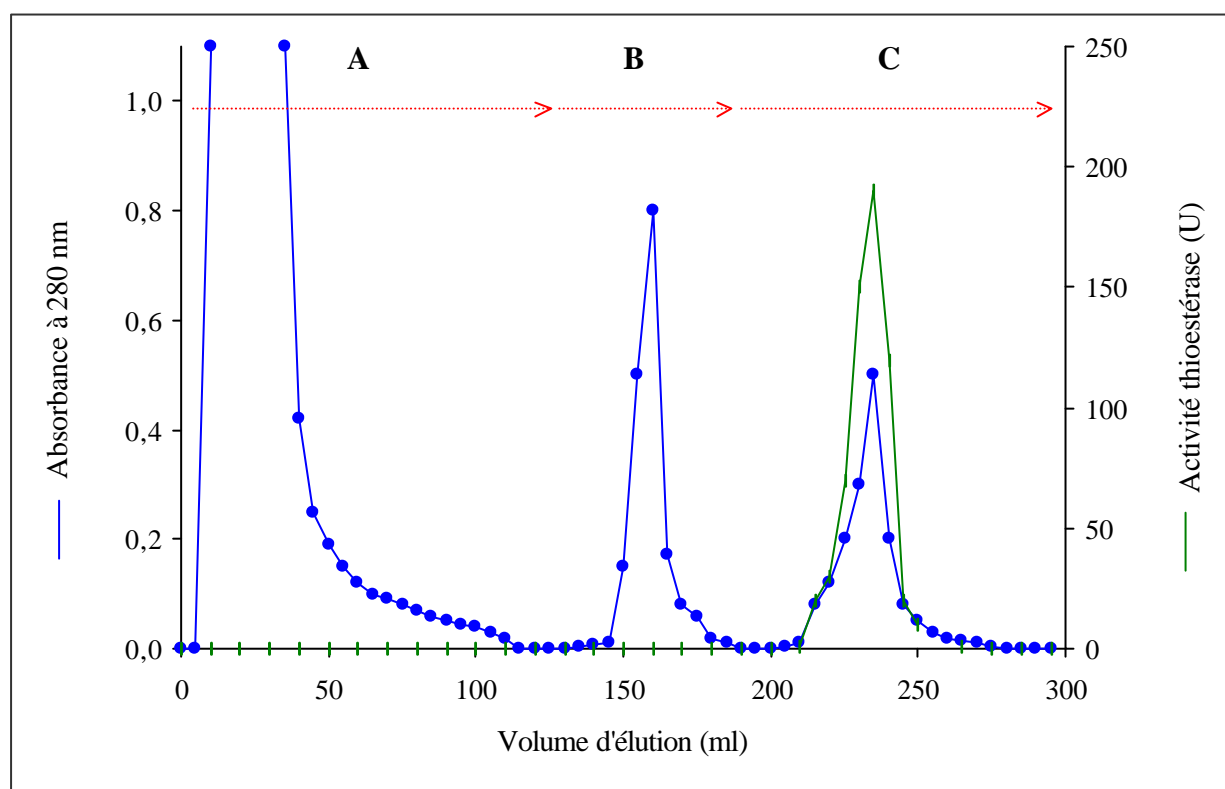


Figure 6.1. Purification par chromatographie hydrophobe FPLC sur colonne XK 26/40 contenant 300 ml de phényl-Sepharose (Pharmacia). La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 50 mM pH 7 et à une concentration de 200 mM NaCl. Le débit est fixé à 4 ml/min. Le volume des fractions est de 10 ml. L'absorbance est mesurée à 280 nm.

A : Chargement de l'extrait cellulaire et lavage de la résine avec le tampon phosphate 20 mM pH 7 à une concentration de 200 mM NaCl.

B : Lavage à l'eau distillée

C : Elution avec du tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,4.

Le profil d'éluion sur phényl-Sepharose repris dans la figure 6.1 montre que la thioestérase s'adsorbe fortement au support. L'éluion est réalisée par une désorption en masse en augmentant le pH de 7 à 8,4.

Le rendement de l'étape est de 96 % et le facteur de purification est de 35 fois. La quantité totale de protéines récupérées est de 169 mg.

6.2.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (Mono-Q)

Les fractions contenant l'activité thioestérase provenant de l'étape précédente (phényl-Sepharose) sont concentrées par lyophilisation avant de passer à la purification par la colonne d'échange d'anions Mono-Q (Pharmacia) (voir § 9.3 du M.&M.).

La figure 6.2 montre le profil d'élution des protéines ainsi que celui de l'activité thioestérase.

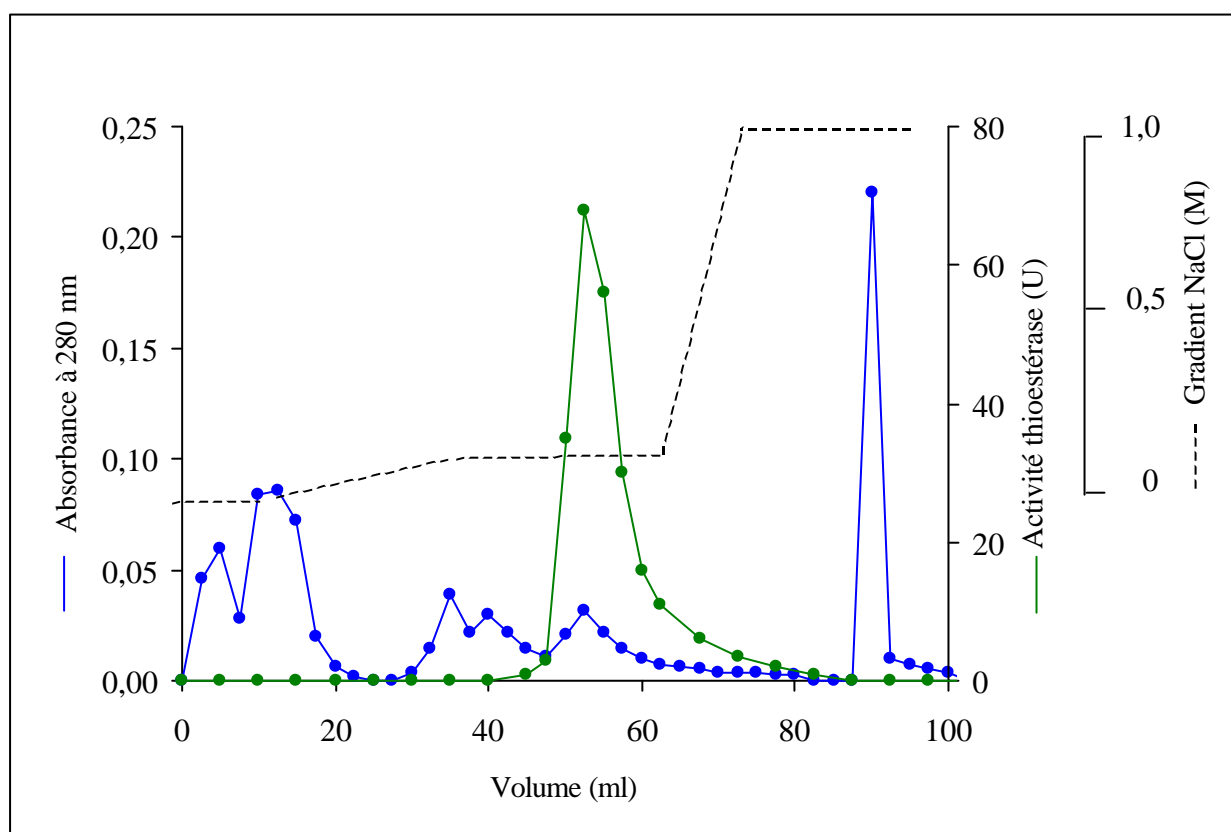


Figure 6.2. Purification par chromatographie FPLC sur échangeur d'anions, Mono-Q HR 5/5 (Pharmacia) des fractions récoltées après passage sur chromatographie hydrophobe (phényl-Sepharose). Le tampon d'élution est le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,7. L'élution est effectuée par un gradient de NaCl (0-1 M). Le débit est de 0,8 ml/min. L'absorbance des fractions (2 ml) est mesurée à 280 nm.

La thioestérase est éluée grâce à un gradient croissant de 0 à 1 M de NaCl. L'éluion a lieu à la concentration de 0,16 M. Le rendement d'étape est de 98 % et le facteur de purification est de 273 fois. La quantité totale de protéines récupérées est de 21,6 mg.

6.2.3. Chromatographie sur colonne hydrophobe phényl-Superose

Les fractions actives obtenues après l'étape Mono-Q sont dialysées contre du tampon phosphate 50 mM pH 7, concentrées par ultrafiltration, puis additionnées de NaCl pour atteindre une concentration finale de 1 M. Elles sont ensuite passées sur une colonne hydrophobe de type phényl-Superose (voir § 9.4 du M.&M.) (figure 6.3).

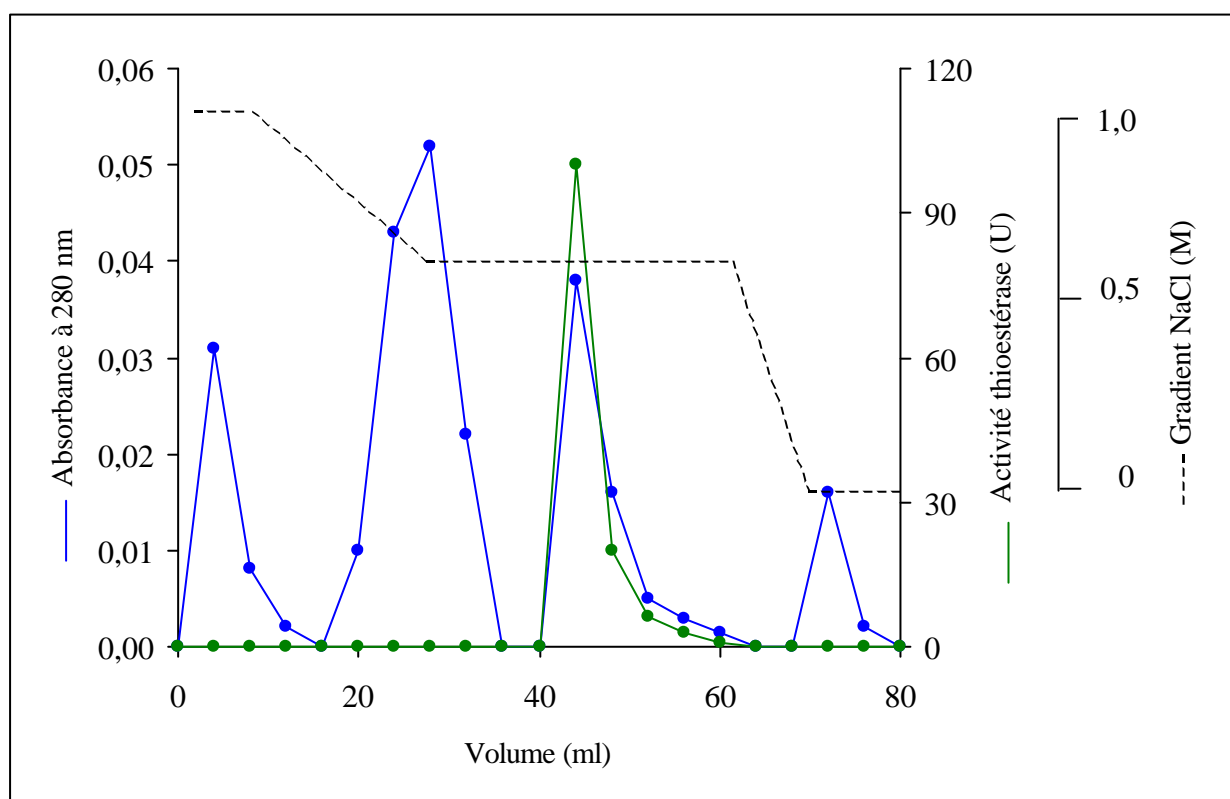


Figure 6.3. Purification par chromatographie hydrophobe par FPLC sur colonne phényl-superose HR5/5 (Pharmacia) des fractions actives récoltées après passage sur échangeur d'anions Mono-Q. La colonne est préalablement équilibrée dans le tampon phosphate 50 mM pH 7 à une concentration de NaCl de 1 M. L'éluion est réalisée par un gradient décroissant de NaCl (1-0 M). Le débit est de 0,8 ml/min. Le volume des fractions est de 2 ml et l'absorbance est suivie à 280 nm.

La thioestérase est éluée à une concentration de 0,6 M en NaCl grâce à un gradient décroissant de 1 à 0 M de ce sel. Le rendement d'étape est de 60 % et le facteur de purification est de 360 fois. La quantité totale de protéines récupérées est de 10 mg.

6.2.4. Bilan de purification

Le tableau 6.1 représente les étapes et le bilan de purification de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19.

Tableau 6.1. Etapes et bilan de purification de la thioestérase

	Protéines totales	Activité totale	Activité spécifique	Rendement	Purification
	mg	U	U/mg	%	
Extrait cellulaire	11 080	3 400	0,3	100	1
Sulfate d'ammonium	2 680	1 900	0,7	56	2,3
Phényl-Sepharose	169	1 837	11	54	35
Mono Q	22	1 811	84	53	273
Phényl-Superose	10	1 080	108	32	360

Au terme de ces étapes de purification, la quantité de thioestérase obtenue est de 10 mg avec une activité spécifique de 108 U/mg. L'enzyme a été purifiée 360 fois par rapport à l'extrait cellulaire avec un rendement de 32 %. La vérification de la pureté de l'enzyme fait l'objet du début du chapitre suivant consacré à sa caractérisation.

Chapitre 7 :
Caractérisation de la thioestérase

Comme il a été expliqué au chapitre 4, les thioestérases jouent un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire des acyl-CoAs (Berge et Aarsland, 1985 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998). Dans ce chapitre, nous allons caractériser la thioestérase purifiée dans le but de trouver un éventuel lien avec l'accumulation intracellulaire du myristoyl-CoA.

Par la même occasion, nous allons essayer de mettre en évidence les spécificités potentielles qui pourraient attester d'une adaptation au froid de cette enzyme. A priori, compte tenu du rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire et vu la parfaite adaptation de *R. aurantiaca* A19 aux basses températures, il est raisonnable de supposer qu'il s'agit d'une enzyme froide.

7.1. Contrôle de la purification de la thioestérase

7.1.1. Contrôle de la purification par électrophorèse sur gel SDS-PAGE

La pureté des échantillons aux différents stades de la purification que nous avons décrits dans le chapitre précédent est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (voir § 10.1 du M.&M.).

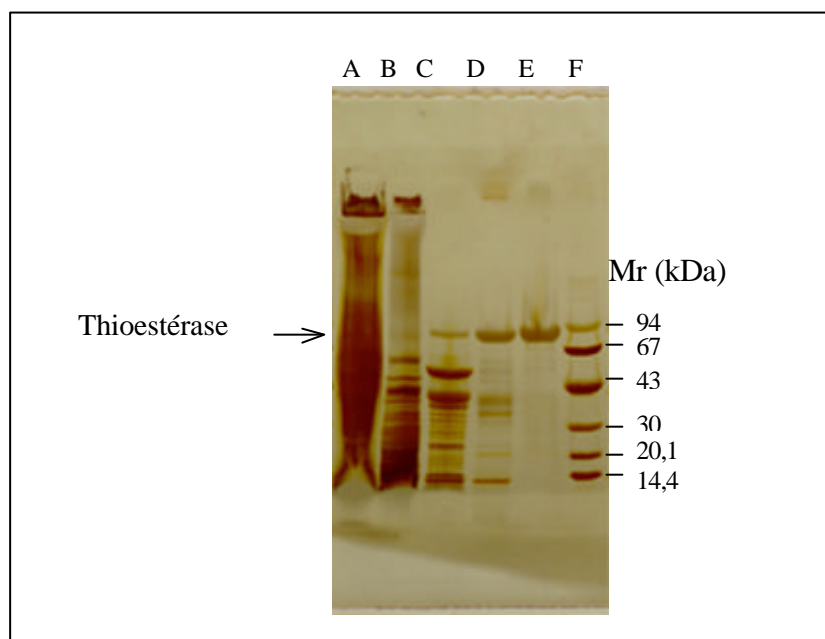


Figure 7.1. Gel dénaturant (SDS-PAGE) montrant l'évolution de la purification de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19. 15 à 40 µg de protéines sont déposés par puits et la révélation est réalisée par une coloration à l'argent.

A: extrait cellulaire de *R. aurantiaca* A19 après disruption mécanique ;

B: après précipitation au sulfate d'ammonium ;

C: après chromatographie sur colonne hydrophobe phényl-Sepharose ;

D: après chromatographie sur colonne d'échange d'anions Mono-Q ;

E: après chromatographie sur colonne hydrophobe phényl-Superose ;

F: standards de masse moléculaire : l' α -lactalbumine (14,4 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de soja (20,1 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), la serumalbumine bovine (67 kDa) et la phosphatase b (94 kDa).

La figure 7.1 montre le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) illustrant la progression de la purification de la thioestérase. Après quatre étapes de purification, on obtient une seule bande de protéine dont la masse moléculaire apparente est de 80 kDa. On remarque par ailleurs que

la bande correspondant à la thioestérase n'est clairement révélée qu'après la troisième étape de purification. Ceci montre que cette enzyme n'est que faiblement exprimée dans les cellules bien que son activité soit aisément détectable dans l'extrait cellulaire brut.

7.1.2. Contrôle de la purification par isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide décrite au § 10.2 du M.§M. nous a permis également de vérifier la pureté de la thioestérase.

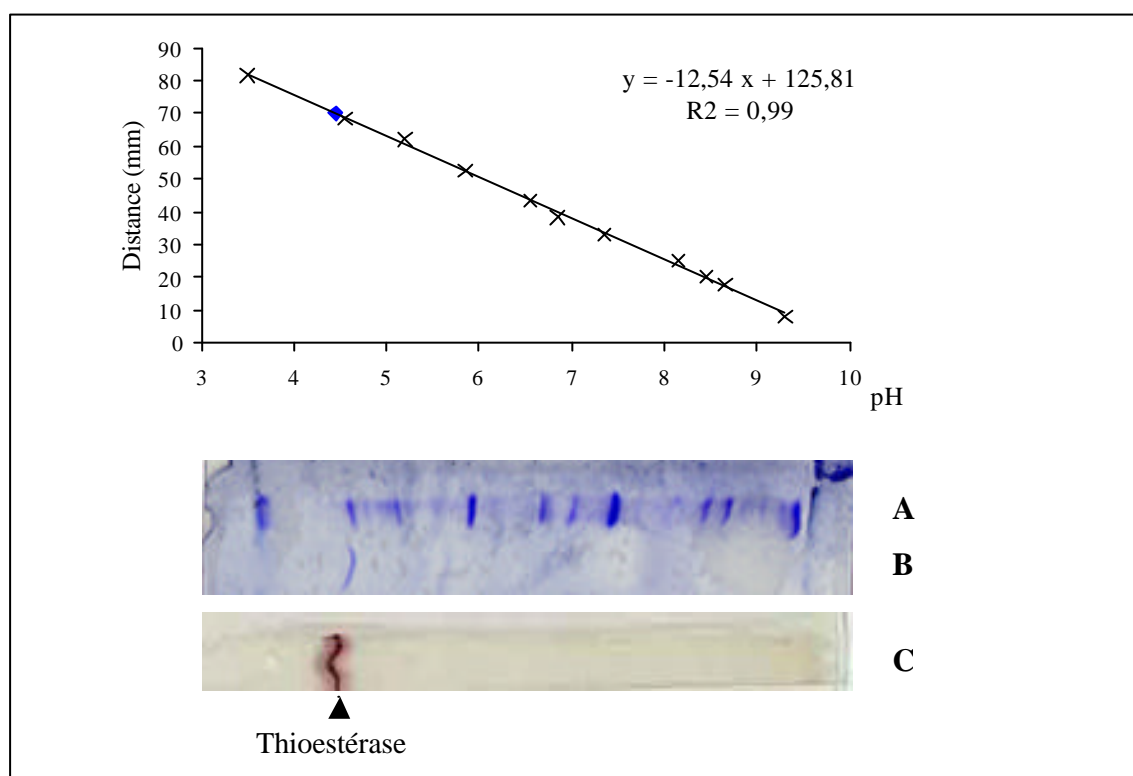


Figure 7.2. Détermination du point isoélectrique de la thioestérase sur gel de polyacrylamide (B) par rapport à des standards (A). 5 µg de thioestérase sont déposés par puits. La révélation des protéines est réalisée par la coloration au bleu de Coomassie. L'activité estérasique est révélée avec le butyrate d'α-naphtyle (C).

La révélation par la coloration au bleu de Coomassie (piste B) montre l'existence d'une seule bande de protéine et confirme le haut degré de pureté de la thioestérase. Cette bande est également révélée par un substrat spécifique des hydrolases des esters et des thioesters (piste C). Le point isoélectrique de la thioestérase est de 4,4 et confirme la valeur déterminée précédemment au moyen du rotator (voir § 5.2.1.2 du chapitre 5).

7.1.3. Discussion

Les masses moléculaires identiques déterminées en conditions native et dénaturante montrent qu'il s'agit d'une thioestérase monomérique d'une taille relativement élevée. En effet, la masse moléculaire apparente de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 est de 80 kDa, ce qui représente 1,5 et 2 fois les masses moléculaires respectives des thioestérases de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida rugosa* (Lee *et al.*, 1989, Diczfalusy *et al.*, 1996). Cette taille importante a déjà été observée, par Feller *et al.* (1996), chez d'autres enzymes d'organismes psychrophiles en comparaison avec des enzymes homologues provenant d'organismes mésophiles. Ces auteurs considèrent que cette caractéristique pourrait constituer un critère d'adaptation au froid, dans la mesure où une grande taille peut être à l'origine d'une grande mobilité des éléments de la structure secondaire.

7.2. Localisation intracellulaire de la thioestérase

Toutes les tentatives de lyse cellulaire par le biais des techniques douces (enzymatiques) se sont avérées inefficaces. La seule méthode qui permet la libération de l'enzyme est la lyse mécanique à la presse de French. Malheureusement, cette technique endommage les organites cellulaires et rend impossible toute tentative de localisation intracellulaire de la thioestérase.

Chez les eucaryotes, certaines caractéristiques structurales et catalytiques, tel la glycosylation et le pH optimal d'activité et de stabilité, peuvent apporter de précieuses indications sur la localisation de plusieurs protéines cellulaires.

7.2.1. Etude de la glycosylation de la thioestérase

La thioestérase native a été soumise à une déglycosylation à l'aide de l'endoglycosidase H de *Streptomyces griseus* (voir §10.7 M.&M.). L'incidence de la déglycosylation sur la masse moléculaire a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure 7.3).

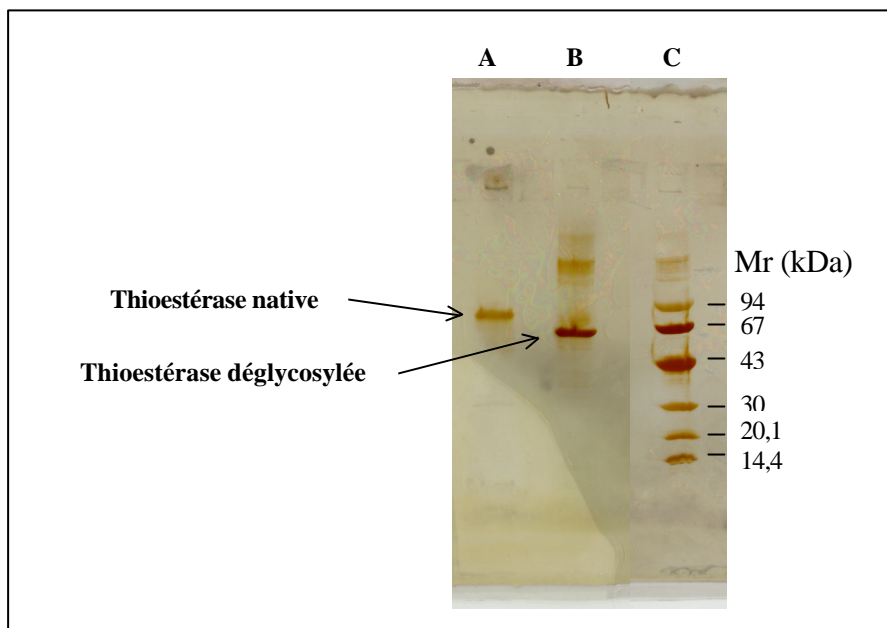


Figure 7.3. Détermination de la masse moléculaire apparente de la thioestérase après déglycosylation à l'endoglycosidase H de *Streptomyces griseus*. L'hydrolyse est réalisée à 25°C pendant 18 h. La quantité de thioestérase déposée est de 10 µg/puits.

A, thioestérase native ;

B, thioestérase déglycosylée ;

C, standards de masse moléculaire. La droite étalon des mobilités relatives sur SDS-PAGE est établie avec les standards suivant : l'α-lactalbumine (14,4 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de soja (20,1 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), la sérumalbumine bovine (67 kDa) et la phosphatase b (94 kDa).

Après déglycosylation, la masse moléculaire apparente est passée de 80 à 66 kDa. Il s'agit donc d'une thioestérase glycosylée dont la partie glycosidique représente environ 19% de sa masse moléculaire.

7.2.2. Influence du pH sur l'activité et la stabilité de la thioestérase

L'influence du pH sur l'activité et sur la stabilité de la thioestérase purifiée est présentée dans les figures 7.4 et 7.5. L'activité est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale observée.

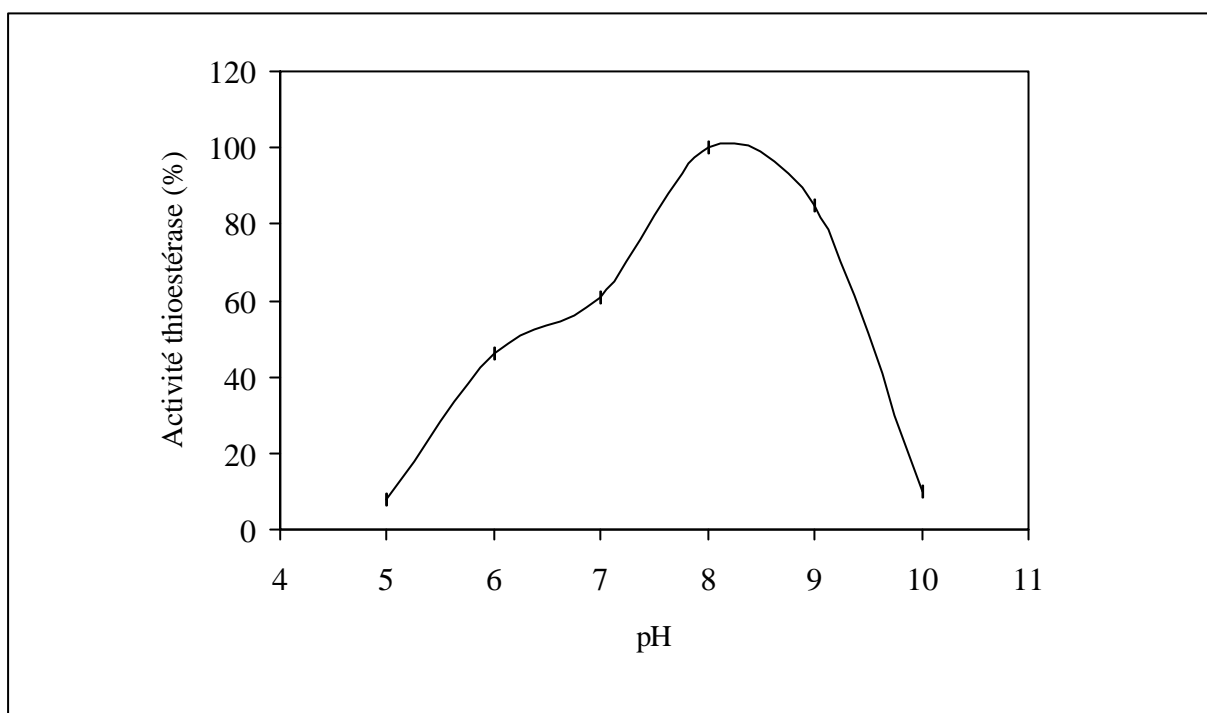


Figure 7.4. Détermination du pH optimum de la thioestérase. L'activité est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale.

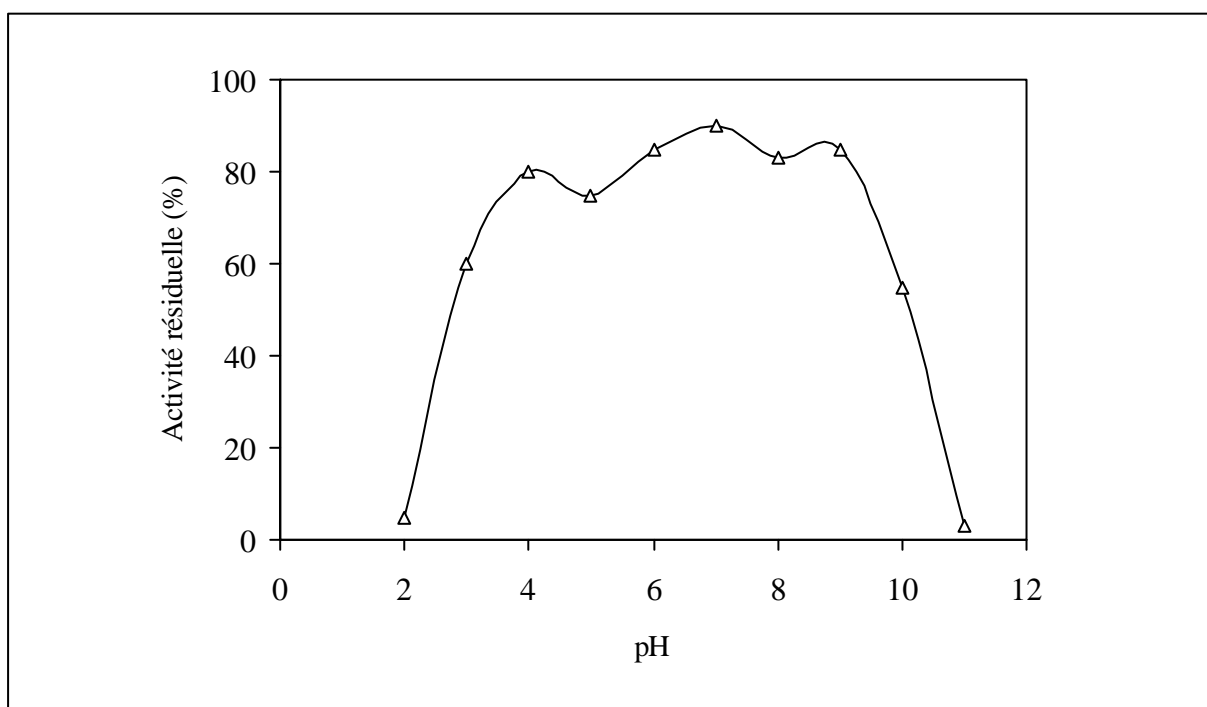


Figure 7.5. Etude de la stabilité en fonction du pH de la thioestérase. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité de départ.

Le pH optimum de la thioestérase psychrophile est légèrement alcalin. Quant à la stabilité en fonction du pH, celle-ci est relativement stable dans une large gamme de pH. Plus de 80% d'activité sont retrouvés après 48 heures de traitement entre les pH 4 et 9.

7.2.3. Discussion

La littérature cite trois thioestérases glycosylées, l'une extracellulaire produite par la levure *Candida rugosa*, les deux autres ont été purifiées à partir des lysosomes et des peroxyosomes des cellules nerveuses de bovins et de rats (Diczfalusy *et al.*, 1996 ; Verkruyse *et al.*, 1996 ; Sleat *et al.*, 1996). La glycosylation de la thioestérase psychrophile serait un élément en faveur d'une localisation soit au niveau du lysosome ou du peroxyosome. Le pH optimum, légèrement alcalin, exclut l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'une thioestérase lysosomale. En effet, l'enzyme serait inactive dans de tels organites puisque leur pH est trop bas (\pm 4) (Horton *et al.*, 1993). Ceci plaiderait, plutôt, en faveur d'une localisation au niveau des peroxyosomes.

Enfin, des études supplémentaires sont requises afin de déterminer la localisation de cette enzyme au niveau cellulaire.

7.3. Etude de la spécificité vis-à-vis du substrat et étude du site actif de la thioestérase

7.3.1. Spécificité vis-à-vis du substrat

Les méthodes relatives à l'étude de la spécificité de la thioestérase vis-à-vis de différents substrats sont décrites au § 10.7.1 du M.&M. Les substrats utilisés sont des acyl-CoAs, des triglycérides, des esters de *p*-nitrophényle et des phospholipides.

Aucune activité n'est détectée concernant l'hydrolyse des triglycérides ni des phospholipides. Quant aux acyl-CoAs et aux esters de *p*-nitrophényle, le tableau 7.1 reprend les constantes cinétiques de leur hydrolyse.

Tableau 7.1. Spécificité et constantes cinétiques d'hydrolyse de différents acyl-CoAs et des esters de *p*-nitrophényle à 25°C (voir § 10.8 M.&M.).

	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
Acyl-CoAs			
Octanoyl-CoA (C8:0)	118 \pm 15	159 \pm 25	1
Décanoyl-CoA (C10:0)	67 \pm 12	136 \pm 23	2
Myristoyl-CoA (C14:0)	18 \pm 2	183 \pm 16	10
Palmitoyl-CoA (C16:0)	23 \pm 4	153 \pm 12	7
Stéaroyl-CoA (C18:0)	24 \pm 4	121 \pm 14	5
Palmitoléoyl-CoA (C16:1)	58 \pm 14	106 \pm 12	2
Esters de <i>p</i>-nitrophényle			
Butyrate de <i>p</i> -nitrophényle (C4:0)	415	27	6.10 ⁻²
Valérate de <i>p</i> -nitrophényle (C5:0)	374	24	6.10 ⁻²
Caproate de <i>p</i> -nitrophényle (C6:0)	400	26	6.10 ⁻²
Caprylate de <i>p</i> -nitrophényle (C8:0)	815	16	2.10 ⁻³

La thioestérase est capable d'hydrolyser des acyl-CoAs à chaîne d'acide gras saturée ou insaturée dont le nombre de carbones varie entre 8 et 18. Elle présente également une faible activité carboxyl-estérase vis-à-vis des esters de *p*-nitrophényle de petites tailles (chaînes d'acide gras contenant de 2 à 10 carbones).

Le myristoyl-CoA, le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA sont les substrats utilisés avec les affinités et les efficacités catalytiques les plus élevées. Cela suggère que l'enzyme a une activité orientée préférentiellement vers les acyl-CoAs de taille intermédiaire et ne présentant pas d'insaturation.

7.3.2. Caractérisation du site actif

La majorité des thioestérases caractérisées jusqu'à présent sont des thioestérases à sérine active. Comme pour la plupart des lipases et les estérases, la sérine active est contenue dans le motif GX SXG (Benning *et al.*, 1998). Il existe cependant quelques thioestérases où la sérine du site actif est remplacée par une cystéine (Broustas *et al.*, 1996 ; yuan *et al.*, 1996).

Dans le but de déterminer le rôle éventuel joué par certains acides dans le cas de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19, une série de modifications chimiques a été réalisée (voir § 10.8 du M.&M.). Ainsi le fluorophosphate de diisopropyle (DFP), le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et le *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB) sont ajoutés à la thioestérase pour mettre en évidence leur effet éventuel sur les activités thioestérase et carboxyl-estérase de l'enzyme. Le DFP et le PMSF sont des inhibiteurs des hydrolases à sérine. Le *p*-CMB inhibe en modifiant les groupements sulfhydryles de la cystéine. Le tableau 7.2 montre l'effet de ces réactifs sur l'activité enzymatique.

Tableau 7.2. La thioestérase est incubée dans du tampon Tris-HCl, 20 mM pH 7.0, en présence des différents réactifs (DFP, PMSF et *p*-CMB). Le temps d'incubation est de 1 heure à 20°C. L'activité résiduelle est mesurée en utilisant le myristoyl-CoA et le butyrate de *p*-nitrophényle comme substrats (voir § 8.1 et § 10.8.2.1 M.&M.).

		Activité résiduelle (%)	
		Thioestérase	Carboxyl-estérase
DFP	1mM	0	0
PMSF	1mM	0	0
<i>p</i> -CMB	1mM	16	88
	5mM	0	76

Le DFP et le PMSF, à faible concentration (en dessous de 1mM), provoquent une inhibition totale des activités thioestérase et carboxyl-estérase. Le *p*-CMB provoque des inhibitions relativement moins importantes. En effet, l'inhibition totale de l'activité thioestérase n'est observée qu'au delà d'une concentration de 1 mM. L'activité carboxylestérase est très peu sensible à ce réactif : seuls 24% d'activité sont inhibés à une concentration de 5 mM.

Discussion

L'inhibition des deux activités, thioestérase et carboxyl-estérase, par le DFP et le PMSF montre qu'il s'agit d'une enzyme possédant une sérine dans son site actif. Ce résultat n'a rien d'étonnant dans la mesure où la majorité des carboxylestérases et thioestérases sont des hydrolases à sérine. En revanche, l'inhibition sélective du *p*-CMB vis-à-vis de l'activité thioestérase est plus inattendue. Des observations similaires ont été rapportées par Diczfalusy *et al.* (1996), concernant la thioestérase de *Candida rugosa*. Ces auteurs suggèrent qu'une cystéine aurait un rôle dans la fixation et l'orientation du substrat au niveau de la cavité catalytique.

Par ailleurs, en comparant les masses moléculaires des substrats utilisés, le myristoyl-CoA a une masse moléculaire de 978 Da contre 209 Da seulement pour le butyrate de *p*-nitrophényle. On pourrait donc supposer, dans le cas de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19, que la fixation covalente du *p*-CMB à une cystéine crée un encombrement stérique au voisinage de la cavité catalytique et empêche les substrats encombrants tels que le myristoyl-CoAs d'accéder au site actif. En revanche, des substrats de petites tailles tels que le butyrate de *p*-nitrophényle pourraient encore être hydrolysés avec une activité relativement élevée (Tableau 7.2).

7.4. Analyse de la composition en acides aminés

Plusieurs caractéristiques structurales, relatives à l'adaptation aux basses températures, sont recensées chez les enzymes d'organismes adaptés au froid. Ces caractéristiques, à l'origine d'un assouplissement des structures tridimensionnelles, sont souvent subtiles et

varient d'un organisme à l'autre. Quelques-unes de ces caractéristiques peuvent être décelées sur base d'une simple analyse de la composition en acides aminés. La figure 7.6 compare les pourcentages des différents acides aminés de la thioestérase froide de la souche psychrophile *R. aurantiaca* A19 aux thioestérases de *Saccharomyces cerevisiae* et du microsome de rat.

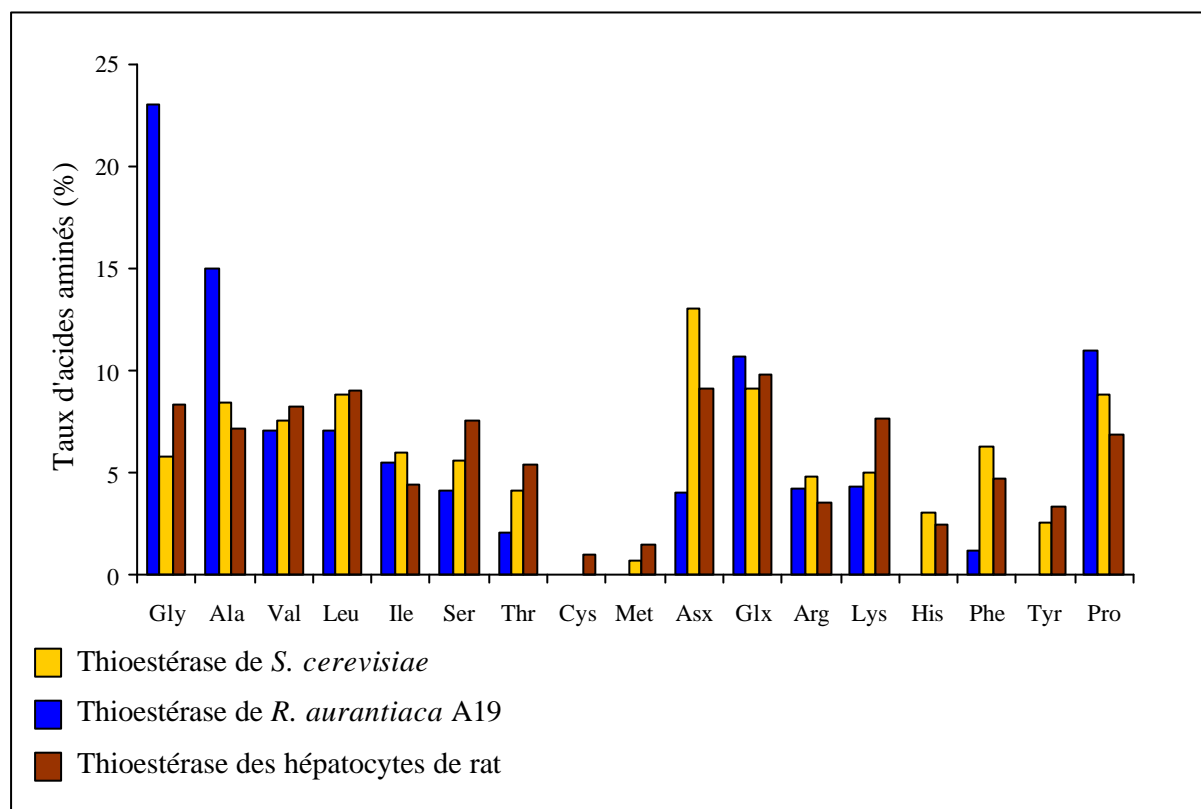


Figure 7.6. Comparaison des pourcentages des différents acides aminés de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 (obtenue comme décrit au § 10.3 du M.&M.) aux thioestérases de *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 1989) et des microsomes des hépatocytes de rat (Alexson et al., 1993).

Discussion

On remarque, à partir de la composition en acides aminés, que la thioestérase psychrophile se distingue des autres thioestérases mésophiles, par un contenu en résidus de petites tailles nettement plus élevé. En effet, la glycine représente 23% des acides aminés totaux de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19, alors qu'elle ne représente que 5,8% et 8,3% respectivement de la composition en acides aminés des thioestérase de *S. cerevisiae* et des peroxysomes des hépatocytes de rat. L'alanine est également fort présente dans la thioestérase psychrophile : son taux est de 15% contre 8,4 et 7,1 respectivement pour les thioestérases de *S. cerevisiae* et des peroxyzomes du foie de rat.

Le pourcentage élevé en glycine et en alanine pourrait être un caractère d'adaptation au froid. En effet, grâce à leur courte chaîne latérale, ces acides aminés confèrent une flexibilité accrue à la protéine (Gerday *et al.*, 1997 ; Feller *et al.*, 1997). Des observations similaires ont été faites dans le cas d'une β -lactamase et d'une α -amylase psychrophiles, dans lesquelles on observe une substitution de certains acides aminés par la glycine et l'alanine (Menendez-Arias et Argos, 1989 ; Arpigny *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1997).

Notons également la faible teneur de la thioestérase psychrophile en phénylalanine et l'absence totale de tyrosine. Ces acides aminés sont capables de s'engager dans des interactions aromatiques et donc de rigidifier la structure enzymatique (Menendez-Arias et Argos, 1989 ; Arpigny *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1997). Le taux de phénylalanine (1,2%) est 4 à 5 fois moins élevé que ceux déterminés pour les deux thioestérases mésophiles.

Quant au taux de proline, acide aminé qui permet également de rigidifier la structure, on remarque, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, qu'il est légèrement supérieur chez la thioestérase psychrophile par rapport aux deux autres enzymes.

L'arginine est connue comme élément stabilisant des protéines par la formation de liaisons électrostatiques. Le rapport Arg/(Arg+Lys) est également souvent cité pour comparer les enzymes psychrophiles et thermophiles à leurs homologues mésophiles. Ce rapport est de 0,49 chez la thioestérase psychrophile et il est très proche de celui calculé pour la thioestérase de *Saccharomyces cerevisiae* et légèrement supérieur à celui de la thioestérase de peroxyosome de rat.

Les informations apportées par cette analyse ne représentent qu'une première approche dans la compréhension de l'adaptation aux basses températures de cette enzyme. La détermination de la séquence en acides aminés et de la structure tridimensionnelle sont requises afin de déterminer la position de ces acides aminés et leur implication dans la stratégie d'adaptation au froid adoptée par cette enzyme.

7.5. Séquençage partiel de la thioestérase

Les tentatives de séquençage partiel de la thioestérase, réalisées en collaboration avec le service de Biochimie de l'Université de Gand, ont révélé un blocage du côté N-terminal de la protéine. Nous avons donc eu recours à une hydrolyse par l'endoprotéinase Lys C et une séparation par HPLC des peptides obtenus (voir § 10.4 du M.&M.). La figure 7.7 montre le chromatogramme obtenu ainsi que les fractions récoltées.

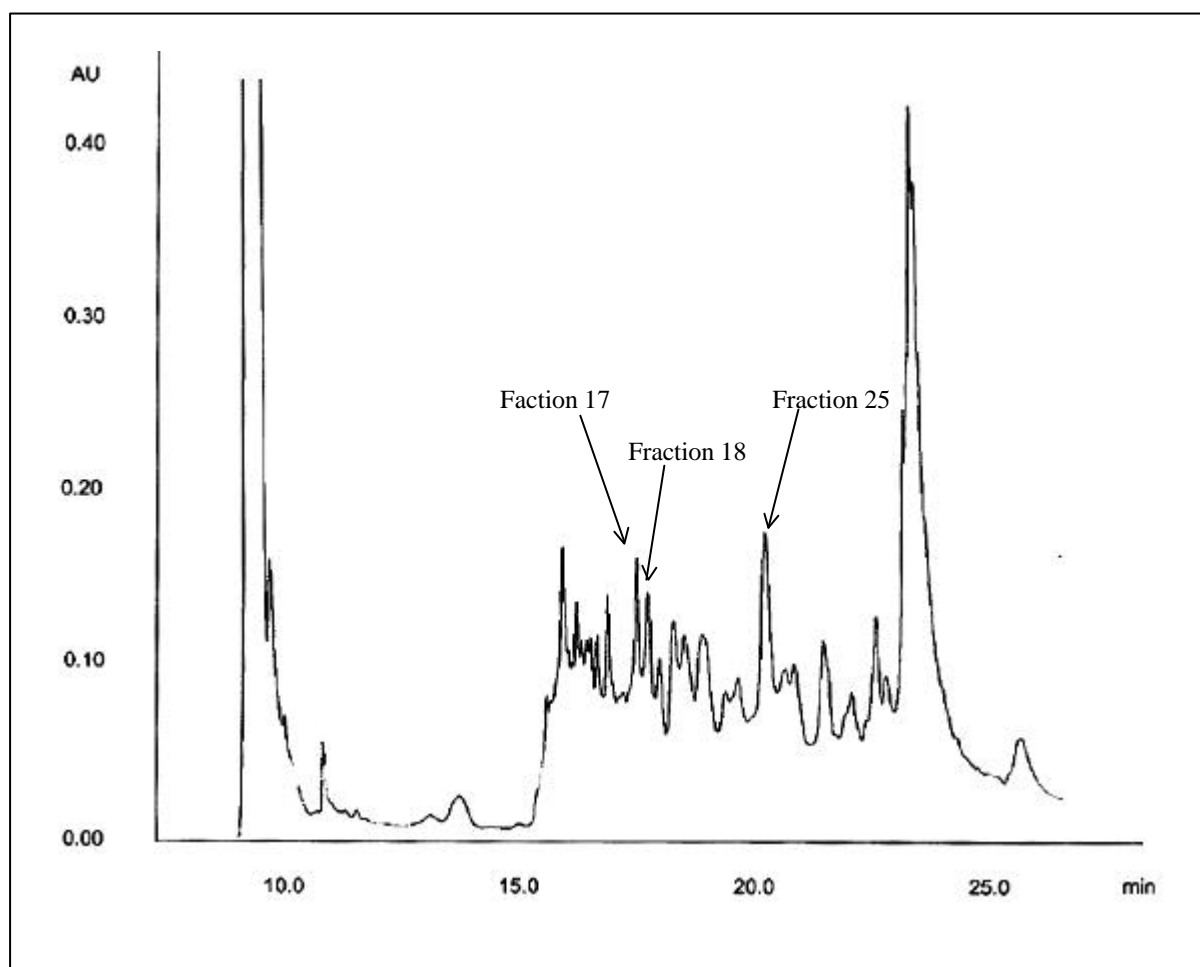


Figure 7.7. Chromatogramme HPLC obtenu lors de la séparation des peptides issus de l'hydrolyse par l'endoprotéinase Lys C de la thioestérase. Les fractions 17, 18 et 25 ont été récoltées et séquencées.

Les peptides correspondant aux fractions récoltées (F 17, F 18 et F 25) dont les temps de rétentions respectifs sont de 17,6, 17,9 et 20,5 min ont été séquencés comme décrit au § 10.4 du M.&M. Les séquences déduites sont représentés dans le tableau 7.3.

Tableau 7.3. Séquences partielles de trois peptides internes obtenus par hydrolyse à l'endoprotéinase Lys C après séparation par HPLC.

Fraction	Séquence
17	Ala Leu Arg Glu Ile Ala leu Met Arg Tyr Ile Ala
18	Asp Pro Glu Val Asp Val Gly Glu Arg Thr Phe
25	Gln Ala Ala Tyr Asp Thr Thr Ala Glu Phe Ala Gly Tyr Ala

Ces séquences ont été soumises à une comparaison à des bases de données génétiques (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, utilisant *Blast network service*). Aucune homologie n'a été observée avec les séquences des thioestérases répertoriées dans ces banques de données. Cependant, cette étude a révélé l'existence d'une homologie intéressante avec la séquence d'une protéine récemment décrite chez *Saccharomyces cerevisiae* et qui est le produit du gène MVP1 (*cf.* figure 7.8).

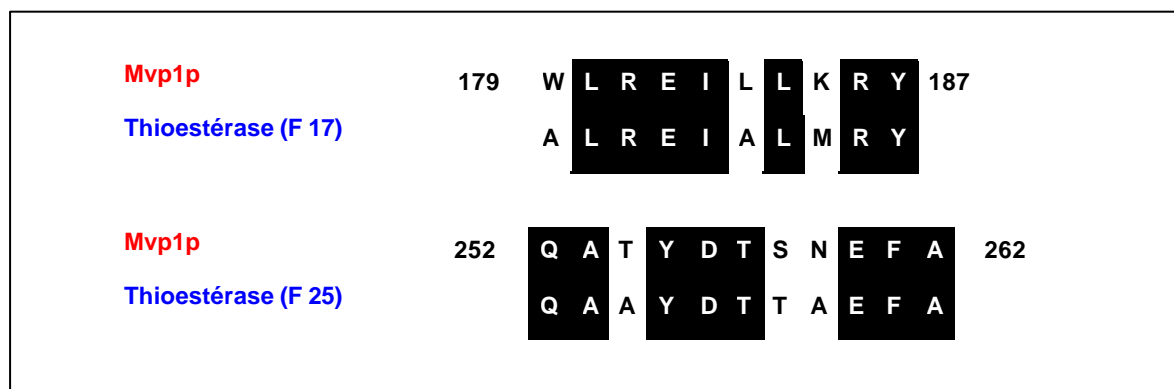


Figure 7.8. Alignement des séquences des peptides des fractions 17 et 25 de la thioestérase avec les séquences correspondantes de la protéine Mvp1p de *S. cerevisiae*.

Les deux peptides des fractions 17 et 25 ont un pourcentage d'isologie de 77 et 72% respectivement avec des séquences se situant entre les résidus d'acides aminés 179 à 187 et 252 à 262 de la protéine Mvp1p, déduite à partir de la séquence du gène MVP1 de *S. cerevisiae*.

Discussion

Chez *S. cerevisiae*, Mvp1p régule l'activité d'une GTPase (Vps1p) qui joue un rôle primordial dans la coordination des processus de division cellulaire et de biogenèse de vacuoles à partir de l'appareil de Golgi (Yeh *et al.*, 1991 ; Ekena *et al.*, 1995 ; Pevsner *et al.*, 1996). La nature de l'interaction entre Mvp1p et Vps1p n'est pas encore clairement élucidée. Récemment, on a montré que Mvp1p est impliqué dans les processus d'insertion et de désinsertion de Vps1p dans les membranes (Ekena *et al.*, 1995).

L'homologie entre la thioestérase et Mvp1p laisse penser que Mvp1p aurait une activité thioestérase et serait responsable de la désacylation de la GTPase et donc de son désancrage des membranes (Verkruyse *et al.*, 1996).

7.6. Thermodépendance de la thioestérase

L'accumulation intracellulaire du myristoyl-CoA ne semble pas due à une thermo-inhibition de l'expression génétique de la thioestérase. En effet, l'activité thioestérase est produite, aux différentes températures de culture, dans une proportion constante par rapport à la biomasse cellulaire. Elle est de l'ordre de $1 \text{ U}/10^9$ cellules (voir chapitre 5).

Par ailleurs, la grande flexibilité structurale est une caractéristique assez commune chez les enzymes psychrophiles. Cette caractéristique, nécessaire pour un bon fonctionnement aux basses températures, serait responsable de la grande thermosensibilité et de la faible rigidité de leur site actif (Morita, 1975 ; Hochachka et Somero, 1984 ; Feller *et al.*, 1997 ; Brandsdal *et al.*, 1999). Dès lors, il est concevable que l'accumulation intracellulaire du myristoyl-CoA lors des cultures aux températures modérées soit une conséquence de cette thermosensibilité. Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur la thermodépendance de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 qui sera comparée à une thioestérase issue d'un organisme mésophile.

En raison de la grande diversité de cette famille d'enzymes, il n'a pas été facile de choisir une thioestérase provenant d'un micro-organisme mésophile. Notre choix s'est porté, en définitive, sur la thioestérase de *Candida rugosa*. Cette enzyme semble avoir quelques caractéristiques en commun avec la thioestérase de *R. aurantiaca* A19. En effet, il s'agit d'une thioestérase à sérine hydrolysant les acyl-CoAs dont la chaîne d'acide gras est composée de 12 à 18 carbones. Elle présente également une activité carboxyl-estérase et hydrolyse les esters

de *p*-nitrophényle à courtes chaînes d'acide gras (Diczfalusy *et al.*, 1996). Cette enzyme est glycosylée et son activité est optimale à pH légèrement alcalin.

7.6.1. Thermostabilité des thioestérases

La stabilité des deux thioestérases est déterminée, en fonction du temps, à 40 et 50°C. L'activité résiduelle est mesurée après refroidissement à 25 °C, comme décrit au § 10.10.1 au M.&M.

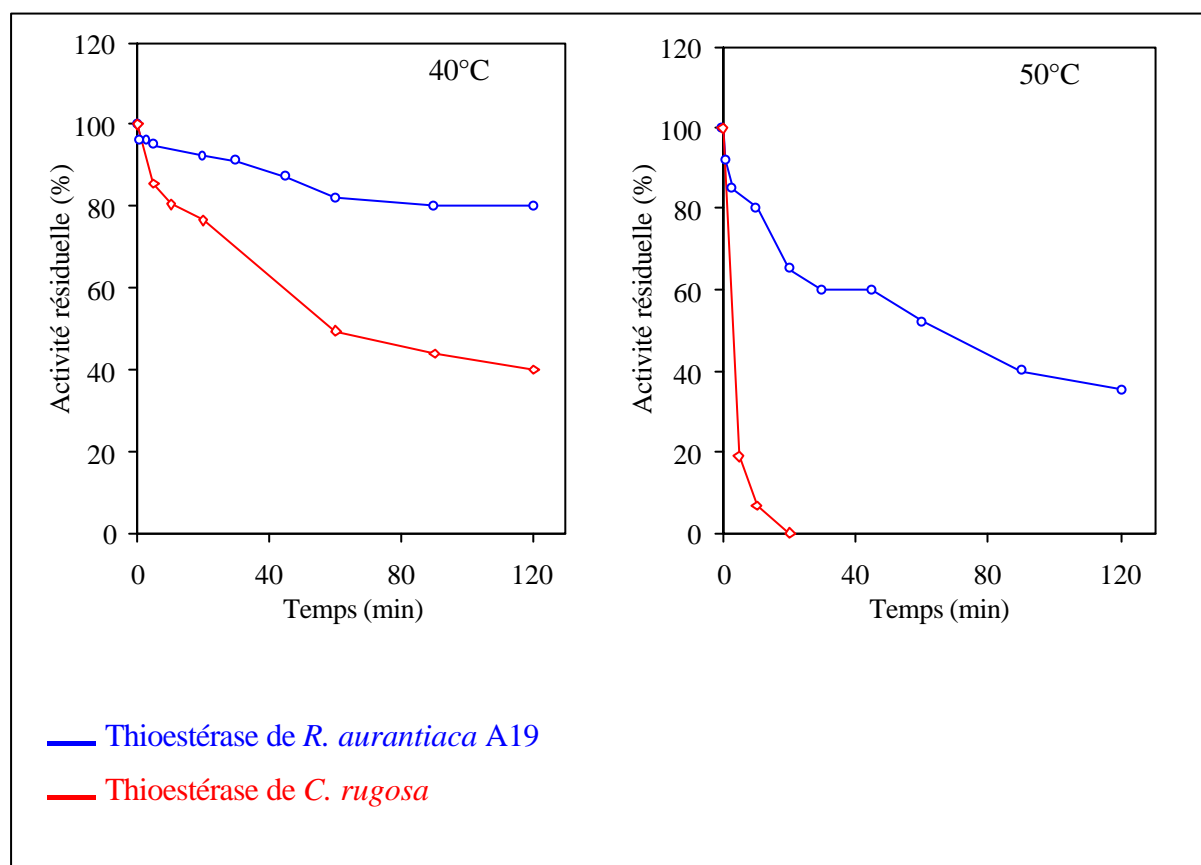


Figure 7.9. Thermostabilité des thioestérases froide et mésophile. Les enzymes sont incubées à 40 et 50°C dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7. L'activité résiduelle est mesurée après refroidissement en utilisant le myristoyl-CoA comme substrat. L'activité est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité initiale.

La thioestérase de la levure psychrophile adopte un profil de thermostabilité assez inattendu pour une enzyme froide. En effet, à 40°C, alors que la thioestérase de la levure mésophile perd 50% de son activité en 60 min, la thioestérase de la souche psychrophile montre un temps de demi-vie supérieur à 3 h. Le temps de demi-vie à 50°C confirme la

thermorésistance inhabituelle de la thioestérase froide : il est de 60 min, alors que celui de la thioestérase mésophile est d'environ 5 min.

7.6.2. Détermination des températures optimales apparentes et des paramètres thermodynamiques d'activation des thioestérases

Les optima thermiques apparents des deux thioestérases ont été déterminés. Les activités ont été mesurées dans une gamme de température comprise entre 0°C et 55°C (voir § 10.10.2. du M.&M.).

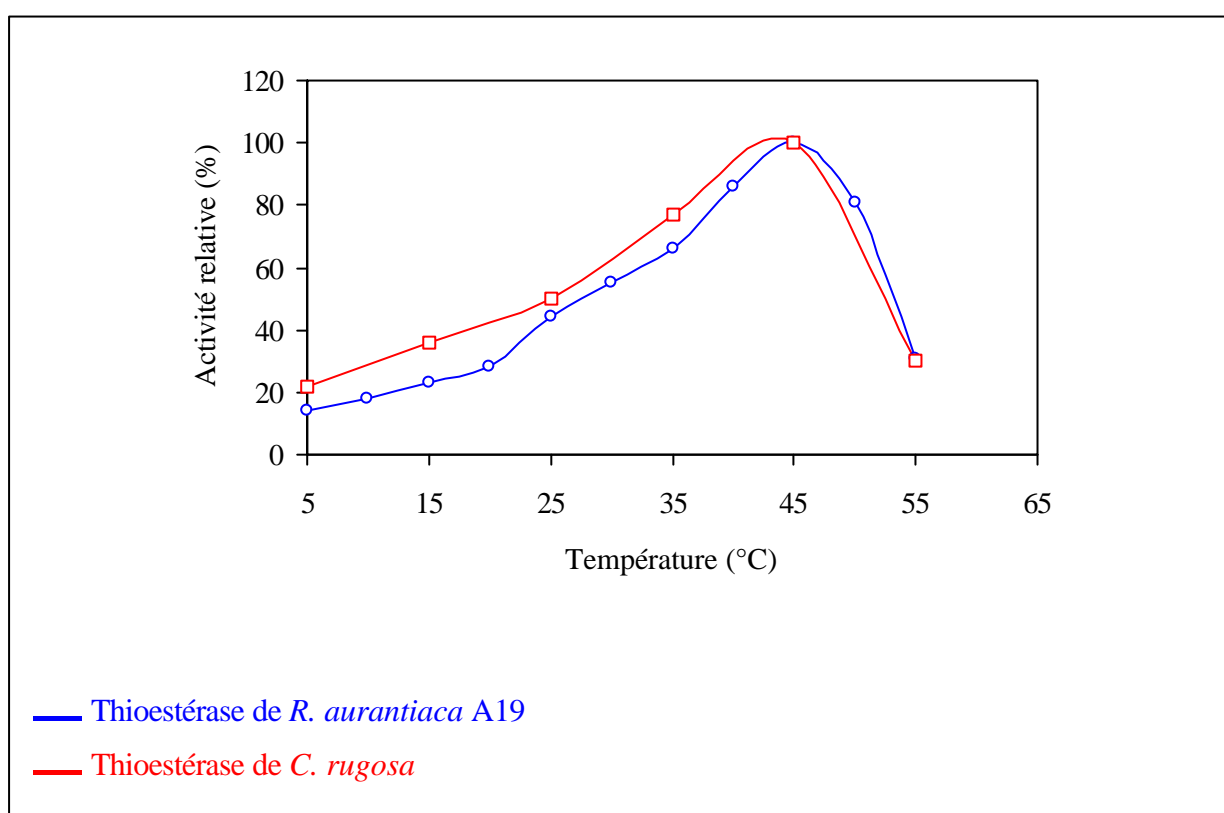


Figure 7.10. Détermination de la température optimale apparente des thioestérases de *R. aurantiaca* A19 (psychrophile) et de *C. rugosa* (mésophile). La réaction enzymatique est suivie directement, pendant les 5 premières minutes, par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté. L'activité est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale.

Sur toute la gamme de température expérimentée, les deux enzymes manifestent des activités très similaires. L'activité maximale dans les deux profils est observée à 45°C. Notons également que le pourcentage d'activité entre 5 et 20°C est relativement élevé pour les deux enzymes.

7.6.3. Thermodépendance des K_m et des efficacités physiologiques des thioestérases

La mesure des vitesses initiales de la réaction enzymatique pour différentes concentrations en substrat, à des températures allant de 0°C à 35°C, permet la détermination des K_m , k_{cat} et le calcul de l'efficacité physiologique (k_{cat}/K_m) (figure 7.11).

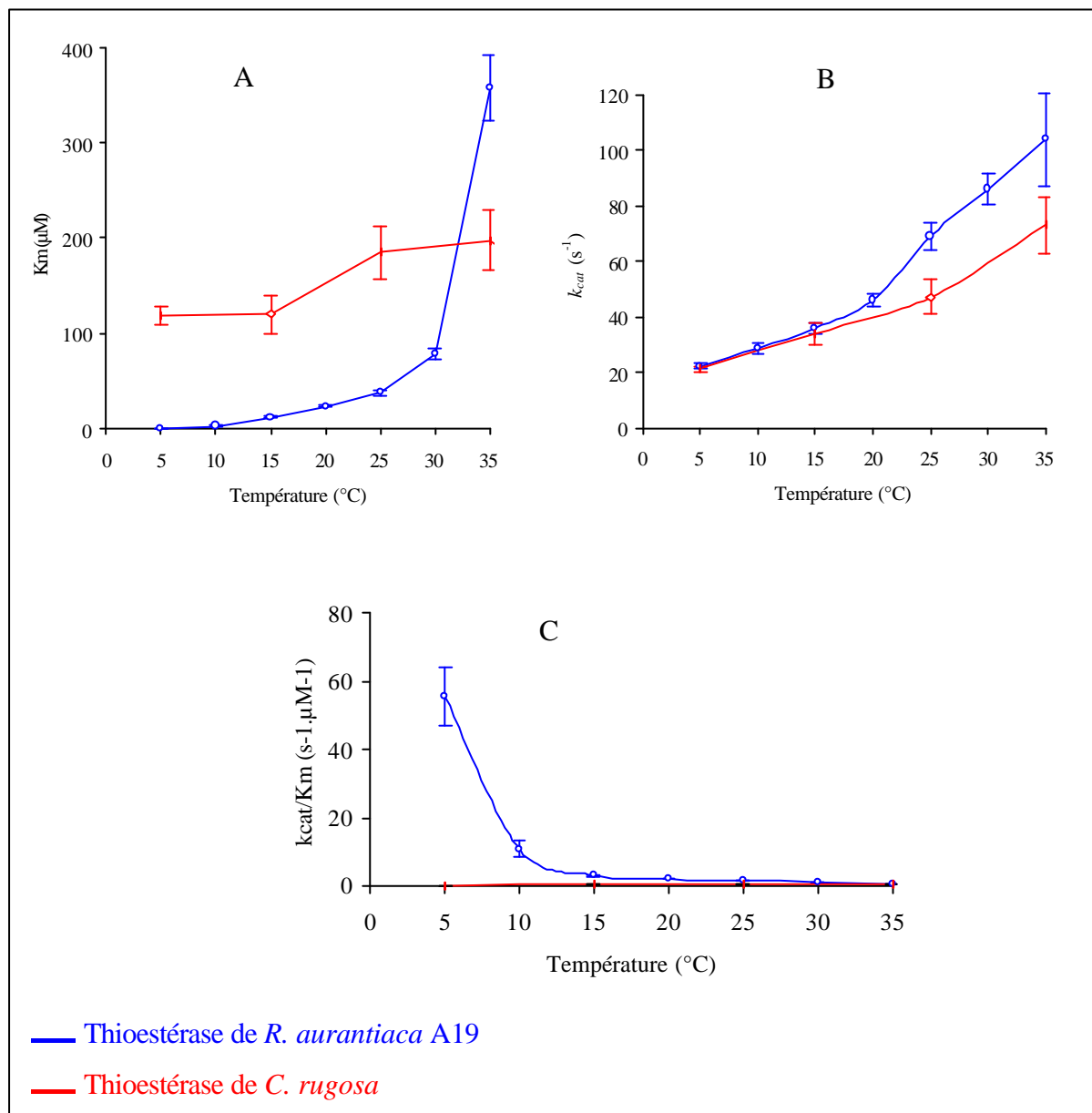


Figure 7.11. Evolution, en fonction de la température du K_m (A), du k_{cat} (B) et de l'efficacité catalytique (C). L'étude est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté. Les valeurs de K_m et k_{cat} sont déduites automatiquement à partir de la représentation de Hanes, grâce au programme informatique 'Kinetics Application Software 2.01' de Pharmacia (voir § 10.10.3. du M.&M.).

Le K_m de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 vis-à-vis du myristoyl-CoA augmente de façon exponentielle avec l'augmentation de la température. Sa valeur minimale, observée à 5°C, est de 0,4 μM et augmente de 895 fois à 35°C. L'efficacité catalytique, quant à elle, montre également une forte dépendance vis-à-vis de la température. Sa valeur à 5°C est de 55 $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ et elle est seulement de 0,6 $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ à 35°C. Le K_m de la thioestérase de *C. rugosa* entre 5 et 15°C est au voisinage de 120 μM et augmente légèrement avec la température pour atteindre 198 μM à 35°C. Son efficacité catalytique est très faible (inférieure à 1 $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) et peu influencée par la température. Quant aux activités catalytiques (K_{cat}), leurs valeurs pour les deux enzymes augmentent avec l'augmentation de la température.

7.6.4. Discussion

Les enzymes d'organismes psychrophiles sont généralement thermolabiles et présentent des optima thermiques apparents décalés vers les basses températures (Somero, 1977 ; Hochachka et Somero, 1984 ; Davail *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1994, 1997). Se basant sur ces constatations, certains auteurs suggèrent que l'incapacité de croissance des organismes psychrophiles aux températures modérées pourrait être liée à cette sensibilité à la chaleur de leurs enzymes (Inniss, 1975 ; Russell, 1990).

Pour *R. aurantiaca* A19, la suggestion que l'accumulation de myristoyl-CoA serait une conséquence de l'inactivation thermique de son activité thioestérase n'est pas vérifiée puisque la thermostabilité de cette enzyme est assez élevée.

D'autre part, les interactions enzyme-substrat jouent un rôle capital dans la thermodépendance des processus catalytiques. En effet selon la nature de ces interactions, la température peut agir favorablement ou défavorablement sur la fixation et l'hydrolyse du substrat. Les paramètres cinétiques, k_{cat} , K_m et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) sont d'excellents indicateurs de la thermodépendance de ces processus (Feller *et al.*, 1997).

Dans le cas de la thioestérase antarctique, l'augmentation exponentielle du K_m avec la température montre l'effet très défavorable de la température sur la formation du complexe enzyme-substrat. Cette augmentation du K_m se reflète directement sur l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) qui diminue considérablement plus on s'éloigne de la température de l'environnement naturel de la souche (0°C). Cette stratégie d'adaptation, focalisée sur une

optimisation de l'affinité au substrat, est observée dans le cas des enzymes intracellulaires, qui catalysent souvent leurs réactions à de très faibles concentrations en substrat (Bentahir *et al.*, 2000 ; Gerday *et al.*, 1997).

Enfin, cette dépendance par rapport à la température de l'affinité et de l'efficacité physiologique de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 serait parmi les causes principales de l'accumulation intracellulaire de myristoyl-CoA. Ces résultats permettent, dès lors, de dévoiler l'un des mécanismes par lesquels agit la température, chez un micro-organisme psychrophile, pour provoquer l'arrêt de sa croissance.

CONCLUSION

Nous avons tenté, au cours de ce travail de mettre en lumière les causes de l'incapacité de croissance aux températures modérées de la levure psychrophile *Rhodotorula aurantiaca* A19. Cette souche présente des caractéristiques propres aux micro-organismes adaptés aux basses températures car elle se développe au voisinage de 0 °C et est incapable de croître au-dessus de 20 °C. Elle a été choisie comme modèle pour notre étude parmi une collection d'une vingtaine de levures sélectionnées en Antarctique. Le choix de cette souche est dû notamment à l'intérêt que porte le CWBI à certaines de ses caractéristiques biotechnologiques telles que sa capacité à produire des arômes (lactones) et à hydrolyser des hydrocarbures (phénanthrène, biphenyle et naphthalène) (Bossrez, 1994 ; Belot, 1995 ; Amrouche, 1999).

Dans une première étape, les paramètres cinétiques de croissance de la souche ont été comparés à ceux d'une souche psychrotrophe de la même espèce, *Rhodotorula aurantiaca* R31345, isolée dans la région ardennaise (Belgique). Nous avons montré que ces deux levures manifestent le même comportement face à une augmentation de la température de culture. Celle-ci, bien que favorable à la vitesse spécifique de croissance (μ_{\max}), entraîne une forte diminution de la capacité à assimiler le substrat carboné (traduite par de faibles valeurs du K_s pour le glucose) et à produire de la biomasse cellulaire. Ce comportement, déjà décrit dans le cas de plusieurs micro-organismes psychrophiles, atteste d'une profonde altération du métabolisme et de l'état physiologique général (Quist et Stokes, 1972, 1969 ; Nedwell *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1994, 1996 ; Gerday *et al.*, 1997). Cependant, le peu de différences entre les deux souches étudiées nous a incité à limiter notre étude comparative et à nous focaliser sur la souche psychrophile, d'autant que ces différences pourraient ne pas être directement liées à une adaptation au froid, mais plutôt à une adaptation à la disponibilité des nutriments dans le milieu d'origine.

L'étude de *R. aurantiaca* A19 a tout d'abord montré que l'effet néfaste des températures modérées est perceptible aux niveaux ultrastructural et moléculaire. De profondes altérations de la morphologie de la levure et de ses membranes cellulaires sont observées lors de la croissance aux températures non permissives. Ces altérations ne s'observent que lorsque les cellules sont transférées des basses températures vers les températures modérées et leur apparition dépend étroitement du stade de croissance puisqu'elles ne se manifestent qu'au

cours de la phase exponentielle. Ce comportement a été également observé avec plusieurs mutants thermosensibles de *Saccharomyces cerevisiae* dont les mutations se situent à différents niveaux du métabolisme des acides gras et des acyl-CoAs. Ces mutants montrent une croissance perturbée au delà de 30°C et sont incapables d'achever leur division à 37°C (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1991, 1992 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Knoll *et al.*, 1995 ; Ashrafi *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'incidence de la température sur le métabolisme des acyl-CoA chez *R. aurantiaca* A19.

Ainsi, l'analyse du contenu cellulaire en acyl-CoAs révèle qu'au voisinage de la limite supérieure de la température de croissance, on observe une concentration de myristoyl-CoA 28 fois supérieure à celle déterminée pour les cellules cultivées à basse température. Cette accumulation constitue un élément important dans l'explication de l'incapacité de la souche *R. aurantiaca* A19 à se développer aux températures modérées car les molécules de type myristoyl-CoA, étant donné leur propriété amphiphile, peuvent être toxiques et provoquer la lyse des membranes cellulaires ainsi que l'inhibition de plusieurs enzymes et voies métaboliques (Boylan *et al.*, 1992 ; Requero *et al.*, 1995 ; Banhegyi *et al.*, 1996 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). Par ailleurs, chez l'Homme, de nombreuses maladies telles que le syndrome neurodégénératif de Reye et le syndrome de la mort subite chez le nourrisson sont connues comme étant dues à une déficience dans le métabolisme des lipides au niveau du système nerveux central qui conduit à une accumulation excessive d'acyl-CoAs dans les cellules (Roe *et al.*, 1986 ; Sleat *et al.*, 1996).

La concentration cellulaire en acyl-CoAs résulte principalement de l'équilibre entre leur synthèse, leur hydrolyse et leur utilisation dans les réactions d'estérification (synthèse de triglycérides, acylation de protéines...) (Berge et Aarsland, 1985 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). L'augmentation du niveau intracellulaire de myristoyl-CoA laisse présager d'une rupture du mécanisme de régulation de sa concentration. Chez les eucaryotes, les acyl-CoAs sont produits principalement par l'acide gras synthétase (FAS), cette enzyme produit essentiellement le palmitoyl-CoA (C16-CoA) et le stéaroyl-CoA (C18-CoA) et en moindre proportion le myristoyl-CoA (C14-CoA) (Lynen *et al.*, 1969, 1980 ; Singh *et al.*, 1985,).

Si les acyl-CoAs se partagent donc les mêmes voies de synthèse, les enzymes qui utilisent ces molécules, en revanche, peuvent être différentes. La S-palmitoylation et la N-myristoylation des protéines utilisent respectivement le palmitoyl-CoA et le myristoyl-CoA (Deschenes *et al.*, 1990 ; Heuckeroth *et al.*, 1990 ; Liu *et al.*, 1996,). Par contre, ces deux

substrats sont vraisemblablement peu ou pas utilisés par les désaturases. Ces dernières, responsables de la production d'acides gras insaturés, présentent en effet plus d'affinité envers les acyl-CoAs dont la chaîne d'acide gras possède plus de 16 carbones (Legrand *et al.*, 1991, 1997 ; Pai *et al.*, 1997).

Les principaux produits des voies de synthèse des acyl-CoAs sont le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA, pour lesquels nous n'avons observé aucune accumulation. L'augmentation de la concentration intracellulaire du seul myristoyl-CoA, chez *R. aurantiaca* A19, suggère que la vitesse de synthèse des acyl-CoAs en générale ne serait pas la cause du phénomène. Celui-ci serait plutôt dû à une déficience dans l'hydrolyse du myristoyl-CoA et/ou dans son utilisation dans les différentes réactions d'estérification et d'acylation. En effet, dans les conditions normales, tout excès en esters d'acyl-CoA devrait être évité grâce à l'activité thioestérase. Cette enzyme, en clivant ces molécules en acide gras et en coenzyme A, réduit considérablement leur toxicité (Berge et Aarsland 1985 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Svensson *et al.*, 1998). Dans le cas de *R. aurantiaca* A19, il pourrait donc s'agir d'une déficience de cette activité thioestérase. C'est pourquoi, dans la suite du travail, nous avons entrepris une caractérisation plus approfondie de cette activité enzymatique afin de vérifier cette hypothèse.

Il existe deux classes de thioestérases qui assurent des fonctions cellulaires différentes. La première classe, dont le rôle est d'arrêter l'élongation des acides gras lors de leur synthèse, fait partie intégrante du complexe multifonctionnel de l'acide gras synthétase (FAS). La masse moléculaire de ce complexe est supérieure à 240 kDa (Knudsen *et al.*, 1975 ; Libertini *et al.*, 1978). Le rôle de la deuxième classe n'est pas encore clairement élucidé. Néanmoins on sait que l'un de ses rôles est de réguler la concentration cellulaire des acyl-CoAs (Berge et Aarsland, 1985 ; Faergeman et Knudsen, 1997 ; Knudsen *et al.*, 1999, 2000). Chez les eucaryotes, cette deuxième classe de thioestérases peut être différenciée de la première par la masse moléculaire qui est souvent inférieure à 100 kDa (Broustas *et al.*, 1996 ; Diczfalusy *et al.*, 1996 ; Poupon *et al.*, 1999).

Le fractionnement de la partie soluble de l'extrait cellulaire sur tamis moléculaire et par isoélectrofocalisation a révélé la présence d'une seule thioestérase dont l'expression est relativement faible (1 U/10⁹ cellules) chez *R. aurantiaca* A19. Afin de disposer d'un matériel biologique suffisant pour la purification et la caractérisation de cette enzyme, nous avons produit la souche en fermenteur de 400 l. Brièvement, la méthode de purification mis au point a fait appel à un fractionnement au sulfate d'ammonium, une chromatographie hydrophobe

sur phényl-Sepharose, une chromatographie sur échangeur d'anions Mono-Q et une chromatographie hydrophobe sur phényl-Superose. Ce procédé a permis d'atteindre un facteur de purification de 360 avec un rendement de 32 %.

La thioestérase de *R. aurantiaca* A19 purifiée a une masse moléculaire apparente de 80 kDa, que ce soit en conditions dénaturantes et non dénaturantes. Elle appartient donc à la deuxième classe précitée. Sa comparaison avec celles isolées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 1989) et à partir des peroxyosomes des hépatocytes de rat (Alexson *et al.*, 1993) a permis de constater que certaines propriétés structurales de la thioestérase de *R. aurantiaca* A19 pourraient être interprétées comme étant des particularités requises pour fonctionner aux basses températures. En effet, sa grande taille, sa teneur élevée en acides aminés de petites tailles (glycine et alanine) ainsi que sa faible teneur en résidus aromatiques sont des caractéristiques qui lui confèreraient une grande flexibilité et une grande efficacité catalytique aux basses températures (Menendez et Argos, 1989 ; Arpigny *et al.*, 1994 ; Feller *et al.*, 1997).

Une des finalités majeures de la caractérisation a été d'étudier la thermodépendance de cette enzyme afin de soulever l'un ou l'autre lien éventuel avec l'accumulation intracellulaire de myristoyl-CoA dans les cultures de *R. aurantiaca* A19 aux températures modérées.

Les enzymes d'organismes psychrophiles sont généralement thermolabiles. Cependant, dans le cas de *R. aurantiaca* A19, il est peu vraisemblable que l'accumulation de myristoyl-CoA, soit une conséquence de la dénaturation thermique de l'activité thioestérase car nous avons démontré que cette enzyme possède une thermostabilité relativement élevée.

L'étude de l'évolution du K_m en fonction de la température montre que ces valeurs sont basses au voisinage de 0°C puis augmentent de façon exponentielle avec l'augmentation de la température. Cette évolution surprenante du K_m se reflète directement sur l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) qui diminue considérablement lorsque la température augmente. Si on admet le rôle des thioestérases dans la régulation de la concentration des acyl-CoAs, ce résultat permet d'établir un lien entre l'accumulation intracellulaire de myristoyl-CoA chez *R. aurantiaca* A19 et l'augmentation de la température de culture et donc de mettre en lumière une des causes possibles de l'incapacité de croissance de cette souche psychrophile aux températures modérées.

Par ailleurs, l'hydrolyse des acyl-CoAs par les thioestérases n'est qu'un dernier recours de la cellule pour éviter des concentrations intracellulaires trop élevées d'acyl-CoAs. Compte tenu de la faible concentration du myristoyl-CoA dans le milieu intracellulaire (0,1 à 8 μ M),

sa simple consommation dans les réactions de myristoylation de protéines devrait suffire pour réguler sa concentration (Duronio *et al.*, 1991 ; Knoll *et al.*, 1992 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Sikorski *et al.*, 1997). On pourrait donc supposer que, chez *R. aurantiaca* A19, les températures modérées affectent également la ou les voies métaboliques qui utilisent cet acyl-CoA.

Chez les eucaryotes, la myristoylation des protéines est l'une des principales voies de consommation du myristoyl-CoA. Cette transformation, catalysée par la N-myristoyltransférase (NMT), concerne plusieurs protéines essentielles et joue un rôle capital dans la régulation de plusieurs voies métaboliques. D'autre part, les interactions entre la NMT et son substrat (le myristoyl-CoA) sont très complexes et dépendent étroitement de la température (Zhang *et al.*, 1996). De nombreuses substitutions de résidus d'acide aminé de cette enzyme affectent ces interactions. Ces substitutions se traduisent par une forte diminution de l'affinité vis-à-vis du myristoyl-CoA quand la température augmente (Letts *et al.*, 1983 ; Ramirez *et al.*, 1983 ; Duronio *et al.*, 1991, 1992 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1995 ; Knoll *et al.*, 1995 a, 1995 b ; Ashrafi *et al.*, 1998). Compte tenu de ces données bibliographiques et vu l'ampleur de l'accumulation du myristoyl-CoA aux températures modérées chez *R. aurantiaca* A19, on pourrait supposer que, outre son hydrolyse par la thioestérase, son utilisation par la NMT serait également affectée à ces températures non permissives.

Dans ce contexte, de larges perspectives sont envisageables pour la suite du travail. la production de souches recombinantes possédant notamment une thioestérase et/ou une NMT d'organismes mésophiles permettrait de vérifier si le caractère psychrophile de la souche *R. aurantiaca* A19 est uniquement lié au métabolisme du myristoyl-CoA. De telles études pourraient proposer des solutions pratiques pour l'utilisation des psychophiles à plus grande échelle.

Une étude plus approfondie du métabolisme du myristoyl-CoA, notamment par le biais de l'isolement de la NMT de *R. aurantiaca* A19, amènerait des informations complémentaires sur les mécanismes responsables de l'inaptitude de cette souche à se développer aux températures modérées. De plus, plusieurs molécules sont connues comme ayant un effet inhibiteur sur l'une ou l'autre des enzymes impliquées dans le métabolisme des acyl-CoAs. Il serait donc intéressant d'utiliser ces inhibiteurs spécifiques pour vérifier l'implication de chacune des enzymes productrices ou utilisatrices de myristoyl-CoA.

Par ailleurs, d'autres voies de recherches méritent d'être entreprises comme par exemple une étude de la localisation exacte de la thioestérase par marquage métabolique radioactif et/ou immunologique ou encore une étude structurale complète de l'enzyme afin de comprendre l'augmentation spectaculaire du K_m avec la température.

Enfin on pourrait vérifier si le lien entre l'incapacité de croissance aux températures modérées et l'accumulation de myristoyl-CoA, observé chez *R. aurantiaca* A19, peut également être établi chez d'autres micro-organismes psychrophiles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexson, S.E., Mentlein, R., Wernstedt, C. and Hellman, U. (1993) Isolation and characterization of microsomal acyl-CoA thioesterase. A member of the rat liver microsomal carboxylesterase multi-gene family. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 719-727.
- Amaki, Y., Tulin, E.E., Ueda, S., Ohmiya, K. and Ymane, T. (1992) Purification and properties of thermostable esterase of *Bacillus stearothermophilus* produced by recombinant *Bacillus brevis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 238-241.
- Amrouche, M. (1999) Rapport d'activité (CWBI).
- Arpigny, J.L. (1997) Lipase d'organismes psychrophiles de l'Antarctique. *Thèse de doctorat* (Laboratoire de Biochimie, Université de Liège).
- Arpigny, J.L., Feller, G., Davail, S., Genico, S., Narinx, E., Zekhnini, Z. and Gerday, C. (1994) Molecular adaptations of enzymes from thermophilic and psychrophilic organisms. *Adv. Comp. Env. Physiol.*, **20**, 269-295.
- Ashrafi, K., Farazi, T.A. and Gordon, J.I. (1998) A role for *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation protein 4 in regulating protein N-myristoylation during entry into stationary phase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 25864-25874.
- Atlas, R.M. and Morita, R.Y. (1986) Bacterial communities in nearshore Antarctic marine ecosystems. In *Perspectives in microbial ecology* ed. F. Megusar & M. Gantar. *Ljubljana : Slovene Society For Microbiology.*, pp. 185-190.
- Banhegyi, G., Csala, M., Mandl, J., Burchell, A., Burchell, B., Marcolongo, P., Fulceri, R. and Benedetti, A. (1996) Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles [letter]. *Biochem. J.*, **320**, 343-344.
- Becht, I., Schrecker, O., Klose, G. and Greten, H. (1980) Purification of human plasma lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **620**, 583-591.
- Belot, J-L. (1996) Rapport d'activité pour le FRIA (CWBI).
- Benning, M.M., Wesenberg, G., Liu, R., Taylor, K.L., Dunaway-Mariano, D. and Holden, H.M. (1998) The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas sp.* Strain CBS-3. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33572-33579.
- Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P. and Gerday, C. (2000) Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas sp.* TACII18. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11147-11153.
- Berge, R.K. and Aarsland, A. (1985) Correlation between the cellular level of long-chain acyl-CoA, peroxisomal beta-oxidation, and palmitoyl-CoA hydrolase activity in rat liver. Are the two enzyme systems regulated by a substrate-induced mechanism? *Biochim. Biophys. Acta.*, **837**, 141-151.

- Berge, R.K. and Farstad, M. (1979) Purification and characterization of long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **96**, 393-401.
- Bertoli, E.A. and Inniss, W.E. (1978) Isolation of active 30S and 50S ribosomal subunits from a psychrotrophic bacterium. *Curr. Microbiol.*, **1**, 195-199.
- Bhakoo, M. and Herbert, R.A. (1979) The effect of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four psychrotrophic *Vibrio spp.* *Arch. Microbiol.*, **121**, 121-127.
- Black, P.N., Faergeman, N.J. and DiRusso, C.C. (2000) Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals [In Process Citation]. *J. Nutr.*, **130**, 305S-309S.
- Bobier, S.R., Ferroni, G.D. and Inniss, W.E. (1972) Protein synthesis by the psychroles *Bacillus psychrophilus* and *Bacillus insolitus*. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1837-1843.
- Bossie, M.A. and Martin, C.E. (1989) Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J. Bacteriol.*, **171**, 6409-6413.
- Bossrez, S. (1994) Sélection et étude de microorganismes capables de dégrader les différents constituants du mazout. *Travail de fin d'études* (CWBI, Université de Liège).
- Boutin, J.A. (1997) Myristoylation. *Cell. Signal.*, **9**, 15-35.
- Boylan, J.G. and Hamilton, J.A. (1992) Interactions of acyl-coenzyme A with phosphatidylcholine bilayers and serum albumin. *Biochemistry*, **31**, 557-567.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brandsdal, B.O., Heimstad, E.S., Sylte, I. and Smalas, A.O. (1999) Comparative molecular dynamics of mesophilic and psychrophilic protein homologues studied by 1.2 ns simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **17**, 493-506.
- Broustas, C.G. and Hajra, A.K. (1995) Purification, properties, and specificity of rat brain cytosolic fatty acyl-coenzyme A hydrolase. *J. Neurochem*, **64**, 2345-2353.
- Broustas, C.G., Larkins, L.K., Uhler, M.D. and Hajra, A.K. (1996) Molecular cloning and expression of cDNA encoding rat brain cytosolic acyl-coenzyme A thioester hydrolase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10470-10476.
- Canillac, N., Pommier, M.T. and Gounot, A.M. (1982) Effet de la température d'incubation sur la composition lipidique de corinébacteriacées du genre *Arthrobacter*. *Can. J. Microbiol.*, **28**, 284-290.
- Casey, P.J. (1995) Protein lipidation in cell signaling. *Science*, **268**, 221-225.
- Chan, M., Himes, R.H. and Akagi, J.M. (1971) Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic and psychrophilic *clostridia*. *J. Bacteriol.*, **106**, 876-881.

- Chirala, S.S., Huang, W.Y., Jayakumar, A., Sakai, K. and Wakil, S.J. (1997) Animal fatty acid synthase: functional mapping and cloning and expression of the domain I constituent activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 5588-5593.
- Choi, J.Y., Stukey, J., Hwang, S.Y. and Martin, C.E. (1996) Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3581-5389.
- Chow, M., Newman, J.F., Filman, D., Hogle, J.M., Rowlands, D.J. and Brown, F. (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, **327**, 482-486.
- Comerford, J.G. and Dawson, A.P. (1993) Effects of CoA and acyl-CoAs on GTP-dependent Ca²⁺ release and vesicle fusion in rat liver microsomal vesicles. *Biochem. J.*, **289**, 561-567.
- Davail, S., Feller, G., Narinx, E. and Gerday, C. (1994) Cold adaptation of proteins: purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the Antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17448-17453.
- Deschenes, R.J., Resh, M.D. and Broach, J.R. (1990) Acylation and prenylation of proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2**, 1108-1113.
- Diczfalusy, M.A. and Alexson, S.E. (1996) Isolation and characterization of novel long-chain acyl-CoA thioesterase/carboxylesterase isoenzymes from *Candida rugosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 104-112.
- DiRusso, C.C., Heimert, T.L. and Metzger, A.K. (1992) Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8685-8691.
- DiRusso, C.C., Metzger, A.K. and Heimert, T.L. (1993) Regulation of transcription of genes required for fatty acid transport and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* by FadR. *Mol. Microbiol.*, **7**, 311-322.
- Duronio, R.J., Knoll, L.J. and Gordon, J.I. (1992) Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* long chain fatty acyl:CoA synthetase gene (FAA1) and assessment of its role in protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.*, **117**, 515-529.
- Duronio, R.J., Rudnick, D.A., Adams, S.P., Towler, D.A. and Gordon, J.I. (1991) Analyzing the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase by co-expressing it with mammalian G protein alpha subunits in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10498-10504.
- Duronio, R.J., Rudnick, D.A., Johnson, R.L., Johnson, D.R. and Gordon, J.I. (1991) Myristic acid auxotrophy caused by mutation of *S. cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J. Cell. Biol.*, **113**, 1313-1330.

- Ekena, K. and Stevens, T.H. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* MVP1 gene interacts with VPS1 and is required for vacuolar protein sorting. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1671-1678.
- Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Faergeman, N.J. and Knudsen, J. (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem. J.*, **323**, 1-12.
- Feller, G., Arpigny, J.L., Narinx, E. and Gerday, C. (1997) Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A**, 495-499.
- Feller, G. and Gerday, C. (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 830-841.
- Feller, G., Lebussy, O. and Gerday, C. (1998) Expression of psychrophilic genes in mesophilic host: assessment of the folding state of a recombinant α -amylase. *Appl. Env. Microbiol.*, **64**, 1163-1165.
- Feller, G., Lonhienne, T., Deroanne, C., Libioulle, C., Van Beeumen, J. and Gerday, C. (1992) Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5217-5221.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.L., Aittaleb, M., Baise, E., Genico, S. and Gerday, C. (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **18**, 189-202.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.L., Zekhnini, Z., Swings, J. and Gerday, C. (1994) Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 477-479.
- Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M., Hasser, R. and Gerday, C. (1994) Stability and structure analysis of α -amylase from Antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 441-447.
- Ferroni, G.D. and Inniss, W.E. (1973) Thermally caused filament formation in the psychrophile *Bacillus insolitus*. *Can. J. Microbiol.*, **19**, 581-584.
- Ferroni, G.D. and Inniss, W.E. (1974) Reversal of filament formation in the psychrophile *Bacillus insolitus*. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1281-1283.
- Fukunaga, N. and Russell, N. (1990) Membrane lipid composition and glucose uptake in two Psychrotolerant bacteria from Antarctica. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1669-1673.
- Fukuyama, M. and Miyake, Y. (1979) Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin. *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**, 1183-1193.
- Fulceri, R., Gamberucci, A., Scott, H.M., Giunti, R., Burchell, A. and Benedetti, A. (1995) Fatty acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes. *Biochem. J.*, **307**, 391-397.

- Genicot, S., Feller, G. and Gerday, C. (1987) Trypsin from antarctic fish (*Paranotothenia magellanica*) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 601-609.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I. and Feller, G. (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1342**, 119-131.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georgette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A. and Feller, G. (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **18**, 103-107.
- Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1987) Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature*, **326**, 309-312.
- Grand, R.J. (1989) Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.*, **258**, 625-638.
- Gounot, A.M. (1991) Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 386-397.
- Gounot, A.M. (1976) Effects of temperature on the growth of psychrophilic bacteria from glaciers. *Can. J. Microbiol.*, **22**, 839-846.
- Gounot, A.M., Novitsky, T.J. and Kushner, D.J. (1977) Effects of temperature on the macromolecular composition and fine structure of psychrophilic *Arthrobacter* species. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 357-362.
- Guillou, C. and Guespin-Michel, J.F. (1996) Evidence for two domains of growth temperature for the psychrophilic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MF0. *Appl. Env. Microbiol.*, **62**, 3319-3324.
- Haight, R.D. and Morita, R.Y. (1966) Thermally induced leakage from *Vibrio marinus*, an obligately psychrophilic marine bacterium. *J. Bacteriol.*, **92**, 1388-1393.
- Harder, W. and Veldkamp, H. (1967) A continuous culture study of an obligately psychrophilic *Pseudomonas* species. *Arch. Mikrobiol.*, **59**, 123-130.
- Hartwell, L.H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.*, **38**, 164-198.
- Heuckeroth, R.O., Jackson-Machelski, E., Adams, S.P., Kishore, N.S., Huhn, M., Katoh, A., Lu, T., Gokel, G.W. and Gordon, J.I. (1990) Novel fatty acyl substrates for myristoyl-CoA:protein N-myristoyl-transferase. *J. Lipid. Res.*, **31**, 1121-1129.
- Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (1984) Biochemical adaptation. In Press Princeton University, ed. Princeton, NJ.

- Hori, T., Nakamura, N. and Okuyama, H. (1987) Possible involvement of acetyl coenzyme A carboxylase as well as fatty acid synthetase in the temperature-controlled synthesis of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **101**, 949-956.
- Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. and Scrimgeour, K. (1993) Principes de biochimie.
- Inniss, W.E. (1975) Interaction of temperature and psychrophilic microorganisms. *A. Rev. Microbiol.*, **29**, 445-465.
- Irwin, C.C., Akagi, J.M. and Himes, R.H. (1973) Ribosomes, polyribosomes, and deoxyribonucleic acid from thermophilic mesophilic, and psychrophilic *clostridia*. *J. Bacteriol.*, **113**, 252-262.
- Jayakumar, A., Chirala, S.S. and Wakil, S.J. (1997) Human fatty acid synthase: assembling recombinant halves of the fatty acid synthase subunit protein reconstitutes enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 12326-12330.
- Jepson, C.A. and Yeaman, S.J. (1992) Inhibition of hormone-sensitive lipase by intermediary lipid metabolites. *FEBS Lett.*, **310**, 197-200.
- Johnson, D.R., Knoll, L.J., Rowley, N. and Gordon, J.I. (1994) Genetic analysis of the role of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetase genes in regulating protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18037-18046.
- Jones, T.L., Simonds, W.F., Merendino, J.J., Brann, M.R. and Spiegel, A.M. (1990) Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein alpha subunit is essential for its membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 568-572.
- Justice, J.M., Bliziotis, M.M., Stevens, L.A., Moss, J. and Vaughan, M. (1995) Involvement of N-myristoylation in monoclonal antibody recognition sites on chimeric G protein alpha subunits. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6436-9.
- Kamiryo, T., Parthasarathy, S. and Numa, S. (1976) Evidence that acyl coenzyme A synthetase activity is required for repression of yeast acetyl coenzyme A carboxylase by exogenous fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 386-390.
- Kasturi, R., Chirala, S., Pazirandeh, M. and Wakil, S.J. (1988) Characterization of a genomic and cDNA clone coding for the thioesterase domain and 3' noncoding region of the chicken liver fatty acid synthase gene. *Biochemistry*, **27**, 7778-7785.
- Klein, K., Steinberg, R., Fiethen, B. and Overath, P. (1971) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible system for the uptake of fatty acids and further characterization of old mutants. *Eur. J. Biochem.*, **19**, 442-450.
- Knoll, L.J., Johnson, D.R. and Gordon, J.I. (1995 a) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing fatty acid activation gene (FAA) deletions with a mammalian acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10861-10867.

- Knoll, L.J., Levy, M.A., Stahl, P.D. and Gordon, J.I. (1992) Analysis of the compartmentalization of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5366-5373.
- Knoll, L.J., Schall, O.F., Suzuki, I., Gokel, G.W. and Gordon, J.I. (1995 b) Comparison of the reactivity of tetradecenoic acids, a triacsin, and unsaturated oximes with four purified *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation proteins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20090-20097.
- Knudsen, J., Clark, S. and Dils, R. (1975) Acyl-CoA hydrolase(s) in rabbit mammary gland which control the chain length of fatty acids synthesised. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 921-926.
- Knudsen, J., Jensen, M.V., Hansen, J.K., Faergeman, N.J., Neergaard, T.B. and Gaigg, B. (1999) Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport, metabolism and cell signaling. *Mol. Cell. Biochem.*, **192**, 95-103.
- Knudsen, J., Neergaard, T.B., Gaigg, B., Jensen, M.V. and Hansen, J.K. (2000) Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J. Nutr.*, **130**, 294S-298S.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- Langner, C.A., Lodge, J.K., Travis, S.J., Caldwell, J.E., Lu, T., Li, Q., Bryant, M.L., Devadas, B., Gokel, G.W. and Kobayashi, G.S. (1992) 4-oxatetradecanoic acid is fungicidal for *Cryptococcus neoformans* and inhibits replication of human immunodeficiency virus I. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17159-17169.
- Larkin, J.M. and Stokes, J.L. (1968) Growth of psychrophilic microorganisms at subzero temperatures. *Can. J. Microbiol.*, **14**, 97-101.
- Law, A.T. and Button, D.K. (1977) Multiple-carbon-source-limited growth kinetics of marine corineform bacterium. *J. Bacteriol.*, **129**, 115-123.
- Lee, F.J., Lin, L.W. and Smith, J.A. (1989) Purification and characterization of an acetyl-CoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 21-28.
- Lee, F.S., Lin, L.W. and Smith, J.A. (1990) A glucose-responsive gene encodes acetyl-CoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7413-7418.
- Legrand, P. and Bensadoun, A. (1991) Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1086**, 89-94.
- Legrand, P., Catheline, D., Fichot, M.C. and Lemarchal, P. (1997) Inhibiting delta9-desaturase activity impairs triacylglycerol secretion in cultured chicken hepatocytes. *J. Nutr.*, **127**, 249-56.
- Lehrer, G., Panini, S.R., Rogers, D.H. and Rudney, H. (1981) Modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by lipid inhibitors, substrates, and cytosolic factors. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5612-5619.

- Letts, V.A. and Dawes, I.W. (1983) Temperature-sensitive *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **156**, 212-221.
- Libertini, L.J. and Smith, S. (1978) Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1393-1401.
- Liu, L., Dudler, T. and Gelb, M.H. (1996) Purification of a protein palmitoyltransferase that acts on H-Ras protein and on a C-terminal N-Ras peptide. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23269-23276.
- Lodge, J.K., Jackson-Machelski, E., Devadas, B., Zupec, M.E., Getman, D.P., Kishore, N., Freeman, S.K., McWherter, C.A., Sikorski, J.A. and Gordon, J.I. (1997) N-myristoylation of Arf proteins in *Candida albicans*: an in vivo assay for evaluating antifungal inhibitors of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Microbiology*, **143**, 357-66.
- Lodge, J.K., Johnson, R.L., Weinberg, R.A. and Gordon, J.I. (1994) Comparison of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferases from three pathogenic fungi: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2996-3009.
- Low, P.S., Bada, J.L. and Somero, G.N. (1973) Temperature adaptation of enzymes : role of the free energy, the enthalpy and the entropy of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 430-432.
- Lynen, F. (1969) Yeast fatty acid synthetase. *Methods Enzymol.*, **14**, 17-33.
- Lynen, F. (1980) On the structure of fatty acid synthetase of yeast. *Eur. J. Biochem.*, **112**, 431-442.
- Malcolm, N.L. (1969) Enzymic bases of physiological changes in a mutant of the psychrophile *Micrococcus cryophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **190**, 337-346.
- Malcolm, N.L. (1968) Synthesis of protein and ribonucleic acid in a psychrophile at normal and restrictive growth temperatures. *J. Bacteriol.*, **95**, 1388-1399.
- McDonough, V.M., Stuke, J.E. and Martin, C.E. (1992) Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5931-5936.
- Menendez-Arias, L. and Argos, P. (1989) Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in alpha-helices. *J. Mol. Biol.*, **206**, 397-406.
- Millington, D.S., Norwood, D.L., Kodo, N., Moore, R., Green, M.D. and Berman, J. (1991) Biomedical applications of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with continuous-flow fast atom bombardment. *J. Chromatogr.*, **562**, 47-58.
- Morita, R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144-167.
- Mumby, S.M., Heukeroth, R.O., Gordon, J.I. and Gilman, A.G. (1990) G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 728-732.

- Murthy, M.S. and Pande, S.V. (1987) Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochem. J.*, **248**, 727-733.
- Narinx, E. (1995) Adaptations moléculaires des enzymes aux basses températures : Application aux subtilisines de bactéries antarctiques. *Thèse de doctorat* (Laboratoire de Biochimie, Université de Liège).
- Nash, C.H., Grant, D.W. and Sinclair, N.A. (1969) Thermolability of protein synthesis in a cell-free system from the obligately psychrophilic yeast, *Candida gelida*. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 339-343.
- Nedwell, D.B. and Rutter, M. (1994) Influence of temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature Diminishes affinity for substrate uptake. *Appl. Env. Microbiol.*, **60**, 1984-1992.
- Noriyuki, F. and Russell, N.J. (1990) Membrane lipid composition and glucose uptake in two psychrotolerant bacteria from Antarctica. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1669-1673.
- Norwood, D.L., Bus, C.A. and Millington, D.S. (1990) Combined high-performance liquid chromatographic-continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometric analysis of acylcoenzyme A compounds. *J. Chromatogr.*, **527**, 289-301.
- Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z. and Rothman, J.E. (1993) Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell*, **75**, 1015-1025.
- Overath, P., Pauli, G. and Schairer, H.U. (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*, an inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 559-574.
- Pai, T. and Yeh, Y.Y. (1997) Desaturation of stearate is insufficient to increase the concentrations of oleate in cultured rat hepatocytes. *J. Nutr.*, **127**, 753-757.
- Paltauf, F., Kohlwein, S.D. and Henry, S.A. (1992) Gene Expression. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* ed. Cold Spring Harbor, NY, Vol. II, pp. 415-500.
- Pande, S.V. (1973) Reversal by CoA of palmityl-CoA inhibition of long chain acyl-CoA synthetase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **306**, 15-20.
- Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. (1995) Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.*, **164**, 173-179.
- Perrier, V. (1997) Communication personnelle.
- Petrescu, I. (1998) Adaptations moléculaires des enzymes aux basses températures : Comparaison des xylanases sécrétées par la levure antarctique *Cryptococcus adeliae* et son homologue mésophile *C. albidus*. *Thèse de doctorat* (Laboratoire de Biochimie, Université de Liège).

- Peitzsch, R.M. and McLaughlin, S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436-10443.
- Pevsner, J., Hsu, S.C., Hyde, P.S. and Scheller, R.H. (1996) Mammalian homologues of yeast vacuolar protein sorting (vps) genes implicated in Golgi-to-lysosome trafficking. *Gene*, **183**, 7-14.
- Pfanner, N., Glick, B.S., Arden, S.R. and Rothman, J.E. (1990) Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae. *J. Cell. Biol.*, **110**, 955-961.
- Pfanner, N., Orci, L., Glick, B.S., Amherdt, M., Arden, S.R., Malhotra, V. and Rothman, J.E. (1989) Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell*, **59**, 95-102.
- Poupon, V., Begue, B., Gagnon, J., Dautry-Varsat, A., Cerf-Bensussan, N. and Benmerah, A. (1999) Molecular cloning and characterization of MT-ACT48, a novel mitochondrial acyl-CoA thioesterase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19188-19194.
- Powell, G.L., Grothusen, J.R., Zimmerman, J.K., Evans, C.A. and Fish, W.W. (1981) A re-examination of some properties of fatty acyl-CoA micelles. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12740-12747.
- Powell, P.J., Lau, S.M., Killian, D. and Thorpe, C. (1987) Interaction of acyl coenzyme A substrates and analogues with pig kidney medium-chain acyl-coA dehydrogenase. *Biochemistry*, **26**, 3704-10.
- Prasad, M.R., Sauter, J. and Lands, W.E. (1987) Quantitative determination of acyl chain composition of subnanomole amounts of cellular long-chain acyl-coenzyme A esters. *Anal. Biochem.*, **162**, 202-212.
- Quinn, D.M., Shirai, R.L.J. and Harmon, J.A.K. (1982) Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl ester: inhibition by apolipoprotein-II. *Biochemistry*, **21**, 6872-6879.
- Quist, R.G. and Stokes, J.L. (1969) Temperature range for formic hydrogenylase induction and activity in psychrophilic and mesophilic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **35**, 1-8.
- Quist, R.G. and Stokes, J.L. (1972) Comparative effect of temperature on the induced synthesis of hydrogenase and enzymes of the benzoate oxidation system in psychrophilic and mesophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1233-1239.
- Rabecki. (1997) Etude des conditions de culture d'une souche psychrophile, *Rhodotorula aurantiaca* et de sa production d'estérase. *Travail de fin d'études* (CWBI, Université de Liège).
- Ramirez, R.M., Ishida-Schick, T., Krilowicz, B.L., Leish, B.A. and Atkinson, K.D. (1983) Plasma membrane expansion terminates in *Saccharomyces cerevisiae* secretion-defective mutants while phospholipid synthesis continues. *J. Bacteriol.*, **154**, 1276-1283.

- Rasmussen, J.T., Faergeman, N.J., Kristiansen, K. and Knudsen, J. (1994) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochem. J.*, **299**, 165-170.
- Rasmussen, J.T., Rosendal, J. and Knudsen, J. (1993) Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem. J.*, **292**, 907-913.
- Requero, M.A., Goni, F.M. and Alonso, A. (1995) The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study. *Biochemistry*, **34**, 10400-10405.
- Resh, M.D. (1994) Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, **76**, 411-413.
- Rich, G.T., Comerford, J.G., Graham, S. and Dawson, A.P. (1995) Effects of CoA and acyl-CoA on Ca(2+)-permeability of endoplasmic-reticulum membranes from rat liver. *Biochem. J.*, **306**, 703-708.
- Roe, C.R., Millington, D.S., Maltby, D.A. and Kinnebrew, P. (1986) Recognition of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in asymptomatic siblings of children dying of sudden infant death or Reye-like syndromes. *J. Pediatr.*, **108**, 13-18.
- Rolf, B., Oudenampsen-Kruger, E., Borchers, T., Faergeman, N.J., Knudsen, J., Lezius, A. and Spener, F. (1995) Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1259**, 245-253.
- Rosendal, J. and Knudsen, J. (1992) A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: content of individual long-chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat. *Anal. Biochem.*, **207**, 63-67.
- Russell, N.J. (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 326**, 595-611.
- Russell, N.J. and Fukunaga, N. (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **75**, 171-182.
- Rutter, M. and Nedwell, D.B. (1994) Influence of changing temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: competition and survival in non-steady-state temperature environment. *Appl. Env. Microbiol.*, **60**, 1993-2002.
- Rys-Sikora, K.E., Ghosh, T.K. and Gill, D.L. (1994) Modification of GTP-activated calcium translocation by fatty acyl-CoA esters. Evidence for a GTP-induced prefusion event. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31607-31613.
- Saruyama, H., Fukunaga, N. and Sasaki, S. (1980) Effect of low temperatures on protein-synthesizing activity and conserability of polysome in bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 45-50.

- Sarayama, H., Oshima, A. and Sasaki, S. (1979) Change of viability and protein-synthesizing activity in psychrophilic and mesophilic bacteria by chilling at 0°C. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 247-254.
- Shrago, E. (2000) Long-chain acyl-CoA as a multi-effector ligand in cellular metabolism. *J. Nutr.*, **130**, 290S-293S.
- Sikorski, J.A., Devadas, B., Zupec, M.E., Freeman, S.K., Brown, D.L., Lu, H.F., Nagarajan, S., Mehta, P.P., Wade, A.C., Kishore, N.S., Bryant, M.L., Getman, D.P., McWherter, C.A. and Gordon, J.I. (1997) Selective peptidic and peptidomimetic inhibitors of *Candida albicans* myristoylCoA: protein N-myristoyltransferase: a new approach to antifungal therapy. *Biopolymers*, **43**, 43-71.
- Singh, N., Wakil, S.J. and Stoops, J.K. (1985) Yeast fatty acid synthase: structure to function relationship. *Biochemistry*, **24**, 6598-6602.
- Sleat, D.E., Sohar, I., Lackland, H., Majercak, J. and Lobel, P. (1996) Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19191-19198.
- Somero, G.N. (1977) Temperature as selective factor in protein evolution: the strategy of "compromise". *J. Exp. Zool.*, **194**, 175-188.
- Somero, G.N. and Hochachka, P.W. (1968) The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of the rainbow trout and the antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Biochem. J.*, **110**, 395-400.
- Somero, G.N. and Hochachka, P.W. (1984) Temperature adaptation. *Biochemical adaptations*. Princeton University Press, New Jersey, pp. 354-449.
- Storey, K.B. and Storey, J.M. (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.*, **68**, 27-84.
- Stymne, S. and Stobart, A.K. (1985) Involvement of acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine in the remodelling of phosphatidylcholine in microsomal preparations of rat lung. *Biochim. Biophys. Acta.*, **837**, 239-250.
- Svensson, L.T., Alexson, S.E. and Hiltunen, J.K. (1995) Very long chain and long chain acyl-CoA thioesterases in rat liver mitochondria. Identification, purification, characterization, and induction by peroxisome proliferators. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12177-12183.
- Svensson, L.T., Engberg, S.T., Aoyama, T., Usuda, N., Alexson, S.E. and Hashimoto, T. (1998) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial peroxisome proliferator-induced acyl-CoA thioesterase from rat liver. *Biochem. J.*, **329**, 601-608.
- Swenson, L., Green, R., Smith, S. and Derewenda, Z.S. (1994) Crystallization of thioesterase II from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **236**, 660-662.

- Taylor, D.C., Weber, N., Hogge, L.R. and Underhill, E.W. (1990) A simple enzymatic method for the preparation of radiolabeled erucoyl-CoA and other long-chain fatty acyl-CoAs and their characterization by mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **184**, 311-316.
- Thonart, Ph. (1976) Recherche et étude de mutants thermosensibles chez *Saccharomyces cerevisiae*, affectés dans la biosynthèse des Acides Ribonucléiques. *Thèse de doctorat*, (Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux).
- Thonart, P., Bechet, J., Hilger, F. and Burny, A. (1976) Thermosensitive mutations affecting ribonucleic acid polymerases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **125**, 25-32.
- Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P. and Glaser, L. (1988) The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 69-99.
- Verkruyse, L.A. and Hofmann, S.L. (1996) Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15831-15836.
- Vishniac, H. and Klinger, J. (1986) *Yeast in Antarctic deserts* In *Perspectives in microbial ecology*, ed. F. Megusar and M. Gantar, Ljubljana : Slovene Society For Microbiology pp. 46-51.
- Waku, K. (1992) Origins of fates and fatty acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1124**, 101-111.
- Weston, S.A., Camble, R., Colls, J., Rosenbrock, G., Taylor, I., Egerton, M., Tucker, A.D., Tunnicliffe, A., Mistry, A., Mancina, F., de la Fortelle, E., Irwin, J., Bricogne, G. and Paupit, R.A. (1998) Crystal structure of the anti-fungal target N-myristoyl transferase. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 213-221.
- Wichman, A. (1979) Affinity chromatography of human plasma low- and high-density lipoproteins. Elution by selective cleavage of a bond in the spacer. *Biochem. J.*, **181**, 691-698.
- Wiktorsson, B., Ryberg, M., Gough, S. and Sundqvist, C. (1992) Isoelectric focusing of pigment-protein complexes solubilized from non-irradiated and irradiated prolamellar bodies. *Physiologia plantarum*, **85**, 659-669.
- Yamada, J., Furihata, T., Tamura, H., Watanabe, T. and Suga, T. (1996) Long-chain acyl-CoA hydrolase from rat brain cytosol : purification, characterization, and immunohistochemical localization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **326**, 106-114.
- Yamakawa, N., Shimeno, H., Soeda, S. and Nagamatsu, A. (1990) Inhibition of proline endopeptidase activity by acyl-coenzyme A esters. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1037**, 302-306.
- Yeh, E., Driscoll, R., Coltrera, M., Olins, A. and Bloom, K. (1991) A dynamin-like protein encoded by the yeast sporulation gene SPO15. *Nature*, **349**, 713-715.
- Yuan, L., Nelson, B.A. and Caryl, G. (1996) The catalytic cysteine and histidine in the plant acyl-acyl carrier protein thioesterases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3417-3419.

Zhang, L., Jackson-Machelski, E. and Gordon, J.I. (1996) Biochemical Studies of *Saccharomyces cerevisiae* Myristoyl-coenzyme A:Protein N-Myristoyltransferase Mutants. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33131-33140.