CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN

SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DES PROCEDES-SCIENCES DES ALIMENTS

Thèse de Doctorat

Confidentiel
jusqu'au 7 mai 2018

Biotechnologie, Microbiologie

Identification et caractérisation fonctionnelle de nouvelles lipases/acyltransférases de levures

Pisey Mao NEANG

Soutenue le 08 avril 2013 devant le Jury composé de :

Pr Isabelle CHEVALOT	ENSAIA Nancy	Examinatrice
Pr Suzana FERREIRA-DIAS	Université Technique de Lisbonne	Rapporteur
Pr Alain MARTY	INSA Toulouse	Rapporteur
Pr Eric DUBREUCQ	Montpellier SupAgro	Examinateur
Dr Maeva SUBILEAU	Montpellier SupAgro	Examinatrice

Directeur de thèse : Pr Eric DUBREUCQ

Co-encadrante : Dr Maeva SUBILEAU

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'équipe de Génie Microbiologique et Enzymatique (SupAgro-INRA) de l'UMR IATE de Montpellier.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Eric DUBREUCQ, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir encadré mes travaux de thèse. Merci Eric pour vos conseils avisés, vos encouragements permanents et votre aide tout au long de cette thèse. Ce fut un réel honneur de pouvoir travailler sous votre direction.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Madame Maeva SUBILEAU pour m'avoir co-encadré dans ce projet de thèse. Merci Maeva pour tes soutiens, tes critiques constructives, ta patience et ta disponibilité tout au long de mes activités de recherche. Tu as su me former à exprimer en question de recherche un problème scientifique lié à ce domaine multidisciplinaire.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame le Professeur Suzana FERREIRA-DIAS ainsi qu'à Monsieur le Professeur Alain MARTY pour avoir accepté de lire et de juger ce travail.

Que Madame le Professeur Isabelle CHEVALOT soit remerciée pour ses conseils et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de siéger à ce jury.

Je suis aussi reconnaissant à Monsieur François-Xavier SAUVAGE et Monsieur Jullien DRONE pour avoir accepté de participer à mon comité de thèse. Leurs suggestions et leurs nombreuses idées m'ont été d'un grand profit. Merci François pour m'avoir formé à la technique d'analyse de protéines.

Je tiens également à remercier Madame Véronique PERRIER pour sa contribution à ce travail. Merci Véro pour toute l'aide permanente que tu m'as apportée.

Merci à Anne-Hélène pour ton aide et surtout pour la production de CaLA.

Merci à Mickaël, Jean-Michel, Nok et Robin pour pour votre aide et les discussions métaphysiques !

Un grand merci à Brigitte, Céline, Cathy, Patrick et Jacqueline ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué à ce travail notamment les stagiaires (Maelle, Ivan et Emilie), les thésards et les chercheurs du bâtiment 33.

Merci à toi, Leak, pour tes encouragements et la confiance que tu m'as accordée.

Que ma mère et mes grands-mères trouvent ici le témoignage de ma plus grande reconnaissance et de mes sentiments affectueux.

A mon grand-père, Pov Nam

ថៅចងចាំឧបការគុណរបស់តាជានិច្ច

ABREVIATIONS

AflaL0a : Lipase de *Aspergillus flavus*

CaLA : Lipase A de *Candida antarctica*

CaLIP4 : Lipase/acyltransférase de *Candida albicans*

CCM : Chromatographie sur couche mince

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CpLIP2 : Lipase/acyltransférase de *Candida parapsilosis*

CtroL4a : Lipase/acyltransférase de *Candida tropicalis*

DO : Densité optique

kb : Kilobase

LED : Lipase engineering database

NCBI : National center for biotechnology information

SDS : *Sodium dodecyl sulfate*, laurylsulfate de sodium

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacryamide en conditions dénaturantes

U : Unité enzymatique, 1 U correspond à la quantité de l'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmol de produit en 1 min de réaction

v.v.m : Volume d'air par volume de milieu par minute

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 7

1 INTRODUCTION 9

2 LES LIPASES 10

2.1 Généralités 10

2.2 Structure des lipases 12

2.3 Différentes réactions catalysées par les lipases 14

2.4 Mécanisme d'action 15

2.5 Cas de la lipase A de *Candida antarctica* 17

2.5.1 Production et extraction 18

2.5.2 Propriétés catalytiques 18

2.5.3 Structure de CaLA 19

3 LES LIPASES/ACYLTRANSFERASES 24

3.1 La lipase/acyltransférase CpLIP2 de *Candida parapsilosis* 24

3.1.1 Production de CpLIP2 24

3.1.2 Structure 25

3.1.3 Propriétés catalytiques 25

3.2 La lipase/acyltransférase CaLIP4 de *Candida albicans* 27

3.2.1 Production de CaLIP4 27

3.2.2 Propriétés catalytiques 27

3.3 Les diacylglycérol transacylases 28

3.4 Les glycérophospholipide acyltransférases (EC 2.3.1) 29

3.4.1 Lécithine-cholestérol acyltransférases (LCAT) animales 29

3.4.2 Glycérophospholipide-cholestérol acyltransférases (GCAT) bactériennes 32

3.4.3 Phospholipide-diacylglycérol acyltransférases (PDAT) végétales et fongiques 35

3.5 Mécanisme d'action des lipases/acyltransférases et de leurs homologues 36

4 CONCLUSION 37

MATERIEL ET METHODES 39

1 MATERIEL BIOLOGIQUE 41

1.1 Souches de bactéries 41

1.2 Souches de levure 41

2 PRODUITS CHIMIQUES 41

3 MILIEUX DE CULTURE 43

3.1 Milieu YPD 43

3.2 Milieu YPD tamponné 43

3.3 Milieu YPD + Zéocine 43

3.4 Milieu YPDS + Zéocine solide 43

3.5 Milieu LB + Zéocine 44

3.6 Milieu SOC 44

3.7 Milieu YPDH 44

3.8 Milieu YNBH 44

3.9 Milieu synthétique pour les transformants de *P. pastoris* 45

3.10 Milieu G liquide 46

3.11 Milieu YNB + Rhodamine B 48

3.12 Milieu G + Rhodamine B 48

4 PREPARATION ET CONSERVATION DES SOUCHES 49

5 CULTURE SUR MILIEU SELECTIF (YNB+RHODAMINE B OU G + RHODAMINE B) 49

6 TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ENZYMES 50

6.1 Culture dans les fioles d'Erlenmeyer (milieux YNBH) : souches sauvages 50

6.2 Culture dans les fermenteurs 50

6.2.1 Production d'enzymes par les souches sauvages 51

6.2.2 Production d'enzyme par les transformants de *P. pastoris* 51

6.3 Préparation des échantillons 52

6.3.1 Echantillons issus des prélèvements au cours de la culture dans les fioles d'Erlenmeyer 52

6.3.2 Echantillons issus du milieu en fin de la culture dans les fioles d'Erlenmeyer 52

6.3.3 Echantillons issus des prélèvements au cours de la culture en fermenteur 54

6.3.4 Echantillons issus de la récolte finale après culture en fermenteur 56

7 TECHNIQUES DE MANIPULATION GENETIQUE 56

7.1 Vecteurs d'expression des lipases CtroL4a, AflaL0a, CaLA, CdubL0e et CalbL3a 56

7.2 Minitransformation d'*E. Coli* XL1-Blue MRF' 57

7.3 Minipréparation d'ADN plasmidique 58

7.4 Linéarisation de l'ADN plasmidique 59

7.5 Gels d'agarose pour la visualisation d'ADN 59

7.6 Transformation de *P. pastoris* X33 60

7.6.1 Préparation des cellules compétentes de *P. pastoris* X33 60

7.6.2 Transformation de *P. pastoris* X33 par électroporation 60

7.7 Criblage et sélection des clones transformés 61

8 TECHNIQUES D'ANALYSE 61
8.1 Dosage de l'activité enzymatique par CPG 61
8.1.1 Réactions enzymatiques 62
8.1.2 Préparation des produits de la réaction pour l'analyse 63
8.1.3 Analyse par CPG 63
8.1.4 Détermination du coefficient 1/α (spécificité de substrat) 64
8.2 Analyse des lipides par CCM 65
8.3 Dosage des protéines totales 66
8.4 Analyse des protéines par électrophorèse 67
8.4.1 Préparation du gel d'électrophorèse 68
8.4.2 Préparation des échantillons 68
8.4.3 Migration des protéines 69
8.4.4 Révélation des protéines 70
8.5 Estimation spectrophotométrique de la densité cellulaire 70
8.6 Détermination de la matière sèche cellulaire 70
8.7 Détermination de l'activité thermodynamique 71
9 TECHNIQUES DE BIOINFORMATIQUE 71
9.1 Analyse des séquences 71
9.2 Construction d'arbre phylogénétique 71

CHAPITRE 1 DIVERSITE DES LIPASES/ACYLTRANSFERASES CHEZ LES LEVURES 73

1 INTRODUCTION 75
2 ETUDE PRELIMINAIRE DES SOUCHES SAUVAGES 76
2.1 Présélection des souches de levures 76
2.2 Production d'enzymes 77
2.2.1 Mise au point des conditions de culture : choix du milieu et de la température 77
2.2.2 Cinétiques de croissance et de production de lipases en fioles d'Erlenmeyer 79
2.3 Caractérisation des extraits protéiques obtenus 83
2.3.1 Capacité de catalyser la réaction de transestérification 83
2.3.2 Identification des protéines contenues dans les extraits enzymatiques 85
2.3.3 Séquençage peptidique 86
2.4 Conclusions 88

3 SELECTION D'UNE SOUCHE DE LEVURE SECRETANT UNE NOUVELLE LIPASE/ACYLTRANSFERASE 89

3.1 Amélioration du milieu de culture 89

3.2 Production et caractérisation de lipases 92

4 PRODUCTION ET CARACTERISATION DE LA LIPASE/ACYLTRANSFERASE DE *C. VISWANATHII* 98

4.1 Cinétiques de production en fermenteur 98

4.2 Caractérisation biochimique des extraits enzymatiques de *C. viswanathii* 99

4.2.1 Contenu protéique 99

4.2.2 Specificité de substrat 101

4.2.3 Influence du pH sur l'activité catalytique 102

5 CONCLUSION 103

CHAPITRE 2 A LA RECHERCHE DES LIPASES/ACYLTRANSFERASES DANS LES BASES DE DONNEES 105

1 INTRODUCTION 107

2 SELECTION DES SEQUENCES 107

2.1 Interrogation dans la base de données et étude des séquences 107

2.2 Etude des séquences protéiques 109

2.2.1 Alignement 109

2.2.2 Arbre phylogénétique des protéines 113

2.3 Sélection et préparation des séquences pour la synthèse de gènes 119

3 SYNTHESE ET SOUS-CLONAGE DES GENES 125

4 TRANSFORMATION DE *P. PASTORIS* X33 128

4.1 Caractérisation de la croissance de *P. pastoris* X33 129

4.2 Transformation de *P. pastoris* par électroporation 131

4.3 Sélection des transformants 131

5 SUREXPRESSION HETEROLOGUE DES PROTEINES 137

6 CONCLUSION 140

CHAPITRE 3 CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES NOUVELLES LIPASES 143

1 INTRODUCTION 145

2 ACTIVITE DE TRANSESTERIFICATION EN MILIEU AQUEUX 145

3 EFFET DE LA NATURE DE L'ALCOOL SUR LA TRANSESTERIFICATION 148

4 INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ESTER SUR LA TRANSESTERIFICATION 153

4.1 Saturation, insaturations et groupements alkyles 153

4.2 Spécificité vis-à-vis de la longueur de la chaine acyle du substrat 158

4.2.1 Hydrolyse du mélange d'esters éthyliques ou méthyliques 158

4.2.2 Transestérification du mélange d'esters éthyliques avec du méthanol 160

4.3 Conclusion 163

5 INFLUENCE DU PH SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE 165

6 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE 168

7 CONCLUSION 172

CONCLUSION GENERALE 175

ANNEXES 183

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 197

PRODUCTION SCIENTIFIQUE 215

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des deux voies de transesterification catalysées par une lipase 15

Figure 2 : Structure de la lipase A de *C. antarctica* (CaLA) 21

Figure 3 : Site actif de CaLA 22

Figure 4 : Docking d'un ester de p-nitrophenyle dans le site actif de CaLA 22

Figure 5 : Mécanisme proposé de la réaction d'hydrolyse catalysée par CaLA 23

Figure 6 : Procédure de préparation des échantillons à partir des prélèvements effectués au cours de culture en fiole d'erlenmeyer 53

Figure 7 : Procédure de préparation des échantillons à partir des prélèvements de milieu culture issus de la fermentation par les souches sauvages 55

Figure 8 : Screening de 17 souches sur milieu YNB+Rhodamine B 76

Figure 9 : Croissance *vs* production de lipase (activité d'hydrolyse) dans le milieu YNBH3 ensemencé à 1/10 avec les souches S0 (a), S4 (b), S11cnl (c), S11cl (d), S6 (e) et S12 (f) 80

Figure 10 : Dégradation enzymatique des composés lipidiques dans le milieu de culture YNBH3 82

Figure 11 : SDS-PAGE (14 % d'acrylamide) des extraits enzymatiques obtenus après cultures en fioles d'Erlenmeyer 84

Figure 12 : Activité d'hydrolyse sur l'oléate d'éthyle dans le surnageant de culture et quantité de biomasse pour les quatre souches cultivées dans différents milieux de culture 90

Figure 13 : Activité d'hydrolyse de la trioléine dans le surnagent de culture et quantité de biomasse pour les souches S6 et S12 cultivées dans différents milieux 91

Figure 14 : Variation de la quantité de biomasse (trait continu) et de l'activité d'hydrolyse du surnageant sur l'oléate d'éthyle (trait pointillé) au cours de la culture en fermenteur pour les quatre souches 94

Figure 15 : Cinétique réactionnelle de l'hydrolyse de la trioléine par les extraits enzymatiques de S4, S11cl, S6 et S12 95

Figure 16 : SDS-PAGE (14 % d'acrylamide) des extraits enzymatiques obtenus après des cultures en fermenteur 95

Figure 17 : Ratio de transestérification en fonction de la concentration en méthanol dans le milieu réactionnel contenant différentes préparations enzymatiques (Extrait S4, Extrait S11cl, enzyme CpLIP2, enzyme CaLA) 96

Figure 18 : Activité totale (transestérification + hydrolyse compétitive) en fonction de la concentration en méthanol dans le milieu réactionnel contenant différentes préparations enzymatiques (Extrait S4, Extrait S11cl, CpLIP2, CaLA) 97

Figure 19 : Evolution de la biomasse, des protéines totales et de l'activité lipasique au cours de la culture en fermenteur de la souche S4 dans le milieu YNBH2 99

Figure 20 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques prélevés à différents temps au cours de la culture en fermenteur dans le milieu inducteur YNHB2 100

Figure 21 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques prélevés à différents temps au cours de la culture en fermenteur dans le milieu inducteur YNBH2 (1,2) et le milieu répresseur YNBH0 (3-5) 100

Figure 22 : constante de spécificité (1/α) pour l'hydrolyse d'un mélange d'esters d'acides gras saturés C8-C18 catalysée par l'extrait enzymatique de *C. viswanathii* 102

Figure 23 : Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité d'hydrolyse de l'extrait enzymatique de *C. viswanathii* 103

Figure 24 : Identité (%) de séquences protéiques issues de différentes espèces par rapport à CpLIP2 108

Figure 25 : Alignement multiple des séquences protéiques par Clustal 110

Figure 26 : Arbre phylogénétique non raciné des 76 séquences protéiques homologues à CpLIP2 (> 35 % d'identité), obtenu à l'aide de PhyML version 3.0.1 115

Figure 27 : Arbre phylogénétique des 76 séquences protéiques homologues à CpLIP2 (> 35 % d'identité), obtenu à l'aide de PhyML version 3.0.1 116

Figure 28 : Arbre phylogénétique non raciné construit à l'aide de PhyML version 3.0.1 avec 76 séquences protéiques (d'identité supérieur à 35 %) et 11 nouvelles séquences (d'identité inférieure à 35 %) de la superfamille « *C. antarctica* lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED 117

Figure 29 : Arbre phylogénétique construit à l'aide de PhyML version 3.0.1 avec 76 séquences protéiques (d'identité supérieur à 35 %) et 11 nouvelles séquences (d'identité inférieure à 35 %) de la superfamille « *C. antarctica* lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED 118

Figure 30 : Alignement multiple par Clustal des séquences de protéines sélectionnées pour la synthèse des gènes correspondants 123

Figure 31 : Configuration des vecteurs pPICZαA, B, C (Invitrogen) 126

Figure 32 : Séquence nucléotides synthétisées par GeneArt 127

Figure 33 : Analyse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose 0,8 % (p/v) 128

Figure 34 : Caractérisation de *P. pastoris* X33 130

Figure 35 : Croissance des 96 clones *P. pastoris-CTROL4A* sur les milieux sélectifs (YNB + méthanol + Rhodamine B) additionnés de l'huile (a) ou de l'oléate d'éthyle (b) après 48-72 h de culture à 28 °C 133

Figure 36 : Croissance des 96 clones *P. pastoris-AFLAL0A* sur les milieux sélectifs (YNB + méthanol + Rhodamine B) additionnés de l'huile (a) ou de l'oléate d'éthyle (b) après 48-72 h de culture à 28 °C 134

Figure 37 : Croissance (48-72 h, 28 °C) des 40 clones *P. pastoris-CALBL3A* (a) et 19 clones *P. pastoris-CDUBL0E* (b) sur le milieu sélectif (YNB + méthanol) additionné de la tributyrine 135

Figure 38 : Croissance (72 h, 28 °C) des 96 clones de *P. pastoris-CTROL4A* sur le milieu YPD additionné de 1 mg.mL^{-1} de zéocine (*Pointage : clone sélectionné*) 136

Figure 39 : Production des protéines en fermenteur par les clones de CtroL4a, CalbL3a, CdubL0e et AflaL0e 138

Figure 40 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques de CpLIP2, CaLA, CtroL4a et AflaL0a 139

Figure 41 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques de CdubL0e et CalbL3a 139

Figure 42 : Comportement catalytique des enzymes en présence de différentes concentrations en méthanol dans le milieu réactionnel 147

Figure 43 : Effet du méthanol sur l'activité catalytique totale (transestérification + hydrolyse compétitive) des enzymes (▲ CpLIP2; ■ CtroL4a; ● CaLA; ◆ AflaL0a). 147

Figure 44 : Réactions de transestérification (■) et d'hydrolyse compétitive (□) catalysées par CpLIP2 (a1, a2), CtroL4a (b1, b2), CaLA (c1, c2) et AflaL0a (d1, d2) 149

Figure 45 : Relation entre l'activité thermodynamique relative des alcools et de l'eau ($a_{alcool}/(a_{alcool}+a_w)$) et le ratio de transestérification pour les quatre enzymes ((▲△) CpLIP2 ; (■□) CtroL4a ; (●○) CaLA ; (◆◇) AflaL0a) 151

Figure 46 : Activité catalytique totale des enzymes CpLIP2 (a) et CtroL4a (b) vis-à-vis de divers substrats 154

Figure 47 : Activité catalytique totale des enzymes CaLA (c) et AflaL0a (d) vis-à-vis de divers substrats 155

Figure 48 : Ratios de transestérification pour chaque enzyme, obtenus après la transestérification de divers esters saturés et insaturés 157

Figure 49 : Constante de spécificité (1/α) pour l'hydrolyse d'un mélange d'esters éthyliques (□) ou méthyliques (▥) d'acides gras saturés C8-C18 catalysée par CpLIP2 (a), CtroL4a (b), CaLA (c) et AflaL0a (d) 159

Figure 50 : constante de spécificité (1/α) pour la transestérification (■) et l'hydrolyse compétitive (□) catalysées par diverses lipases (CpLIP2 (a); CtroL4a (b); CaLA (c); AflaL0a (d)) lors de la transestérification du mélange d'esters éthyliques d'acides gras saturés C8-C18 161

Figure 51 : Ratios de transestérification pour chaque enzyme, obtenus après la transestérification du mélange d'esters saturés 162

Figure 52 : Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité catalytique des enzymes en condition sans alcool (○ hydrolyse) et en condition de transestérification avec MeOH (▲ transestérification; △ hydrolyse compétitive) 166

Figure 53 : Influence du pH du milieu réactionnel sur le ratio de transestérification (■ CpLIP2 ; ▲ CtroL4a ; ● CaLA; ◆AflaL0a) 167

Figure 54 : Influence de la température sur l'activité catalytique des enzymes en condition sans alcool (○ hydrolyse) et en condition de transestérification avec MeOH (▲ transestérification; △ hydrolyse compétitive) 169

Figure 55 : Influence de la température sur le ratio de transestérification (■ CpLIP2 ; ▲ CtroL4a ; ● CaLA; ◆AflaL0a) 170

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des souches de levures étudiées 42

Tableau 2 : Marqueurs de taille des protéines (GE Healthcare) 66

Tableau 3 : Compositions de gels de polyacrylamide 67

Tableau 4 : Ratio « diamètre halo/diamètre colonie » pour différentes souches cultivées dans différentes conditions de température et de milieu..... 78

Tableau 5 : Activité lipolytique dans divers extraits enzymatiques avant et après concentration par ultrafiltration 81

Tableau 6 : Activités de transestérification (alcoolyse) et d'hydrolyse pour différents extraits enzymatiques..... 84

Tableau 7 : Résultats du séquençage peptidique obtenus à partir des extraits enzymatiques analysés par gel SDS-PAGE (Figure 11) 87

Tableau 8 : Protéines sélectionnées et leurs originalités des séquences, en vert les protéines caractérisées biochimiquement dans cette étude 120

Tableau 9 : Matrice d'identités entre les 6 séquences sélectionnées pour l'étude, obtenue avec le programme SIM [Huang and Miller, 1991] 121

Tableau 10 : Nombre de clones sélectionnés sur le milieu YPDS additionné de 0,2 mg.mL^{-1} de zéocine..... 130

Tableau 11 : Quantité de protéine et activité lipolytique sur l'oléate d'éthyle des cinq extraits enzymatiques..... 138

Tableau 12 : Récapitulatif des activités spécifiques totales maximales (substrat préférentiel) et minimales pour chaque enzyme, en condition d'hydrolyse seule et avec 2,2 M de méthanol dans le milieu réactionnel..... 164

Tableau 13 : composition des tampons utilisés pour l'étude de l'effet de pH sur l'activité catalytique d'enzymes..... 164

Tableau 14 : Energie d'activation (Ea) pour les quatre enzymes 170

INTRODUCTION GENERALE

Les lipases/acyltransférases constituent une famille à la frontière entre les lipases « classiques » et les acyltransférases. Par rapport aux lipases « classiques » actuellement très utilisées dans divers domaines, notamment en chimie des détergents, en agroalimentaire et en pharmacie, les lipases/acyltransférases permettent la synthèse de dérivés lipidiques dans des systèmes comportant une forte proportion d'eau (conditions macro-aqueuses), sans avoir besoin d'en contrôler l'activité thermodynamique de l'eau (a_w). A titre d'exemple, la lipase/acyltransférase CpLIP2 de *Candida parapsilosis*, identifiée et étudiée dans notre laboratoire, catalyse l'alcoolyse préférentiellement à l'hydrolyse même en présence d'une très forte a_w (>0,9) [Briand *et al.*, 1995b]. Cette particularité des lipases/acyltransférases présente trois avantages majeurs. Tout d'abord, ces biocatalyseurs permettent de travailler dans des milieux macro-aqueux exempts de solvants organiques, ce qui représente des conditions respectueuses de l'environnement. Egalement, le fait que ces enzymes ne requièrent pas de contrôle de l'a_w simplifie grandement le procédé de synthèse. En outre, étant donné que le produit de la réaction de synthèse n'est pas hydrosoluble, le système macro-aqueux facilite la séparation entre le produit et le milieu. Enfin, contrairement aux acyltransférases, ces biocatalyseurs ne nécessitent pas de substrats activés du type acyl-CoA, ce qui allège le coût du procédé.

Les études menées jusqu'alors dans notre laboratoire se concentrent sur deux aspects : (1) exploration et caractérisation de nouvelles lipases/acyltransférases et (2) amélioration de ces biocatalyseurs. Ainsi, CpLIP2 de *C. parapsilosis* CBS 604 [Riaublanc *et al.*, 1993] et CaLIP4 de *C. albicans* [Roustan *et al.*, 2005], qui partagent 60 % d'identité, ont été décrites par notre laboratoire. La découverte de ces deux lipases/acyltransférases contribue à la diversité des biocatalyseurs, avantageux par rapport aux catalyseurs chimiques du point de vue de la spécificité et des conditions opératoires. CpLIP2 est la plus étudiée du fait qu'elle a été identifiée pour la première fois en 1993 [Riaublanc *et al.*, 1993] et que sa spécificité de réaction est la meilleure. Le gène codant pour cette enzyme exocellulaire a été cloné (gi/21954332 dans la base de données NCBI), puis la protéine correspondante surexprimée chez *Saccharomyces cerevisiae* [Neugnot *et al.*, 2002] et *Pichia pastoris* [Brunel *et al.*, 2004]. Les études de caractérisation de cette enzyme de 54 kDa ont porté essentiellement sur la catalyse de l'alcoolyse en milieu aqueux [Briand *et al.*, 1994; Briand *et al.*, 1995a; Lecointe *et al.*, 1996], la régio-sélectivité [Briand *et al.*, 1995b], la spécificité de substrat [Briand *et al.*, 1995c], l'aptitude à catalyser d'autres réactions telles que l'aminolyse [Fournand *et al.*, 1998; Husson *et al.*, 2011; Vaysse *et al.*, 1997] ainsi que la mise en œuvre de bioréacteurs enzymatiques [Brunel, 2005; Osorio *et al.*, 2009a; Tecelão *et al.*, 2010]. Dans le but de

comprendre ses propriétés, des variants de CpLIP2 (enzymes recombinantes modifiées par mutagenèse dirigée) [Neugnot, 2001] ainsi que de sa structure tridimensionnelle [Brunel, 2005; Nozac'h, 2008] ont été étudiés. Comme cette protéine tend à s'agréger facilement, sa cristallisation en vue de la résolution de sa structure tridimensionnelle a jusqu'à présent échoué. A l'heure actuelle, la structure 3D disponible de CpLIP2 est basée sur la modélisation bioinformatique [Nozac'h, 2008].

De nombreux variants de CpLIP2 ont donc été créés dans le but de comprendre ce qui lui confie ses particularités. L'étude de nouvelles lipases/acyltransférases est également un enjeu important pour comprendre l'origine et l'évolution de cette famille d'enzymes par rapport aux lipases classiques.

L'objectif de cette thèse était de découvrir et caractériser de nouvelles lipases/acyltransférases homologues à CpLIP2, et d'approfondir notre connaissance des propriétés catalytiques (et structurales) de ces enzymes. Deux approches ont alors été utilisées: une approche classique à travers l'exploration et la caractérisation de nouvelles lipases/acyltransférases chez des souches microbiennes sauvages, et une approche d'ingénierie génétique à travers notamment l'exploitation bioinformatique des séquences de plus en plus abondantes disponibles dans les bases de données. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps la diversité de lipases/acyltransférases produites par différentes souches microbiennes appartenant ou apparentées à l'espèce *C. parapsilosis*. La souche de levure *C. parapsilosis* CBS 604 sécrétant CpLIP2 a servi de référence. Les souches sécrétant les enzymes ayant les caractéristiques les plus originales et intéressantes ont ensuite été sélectionnées pour des études de caractérisation et de mise en oeuvre plus approfondies.

Dans un second temps, des séquences de protéines disponibles dans la base de données NCBI, non caractérisées d'un point de vue fonctionnel, ont été sélectionnées grâce à un travail de bioinformatique, afin de réaliser la synthèse et le clonage des gènes correspondants. *Pichia pastoris* a ensuite été utilisée comme hôte pour l'expression hétérologue des protéines recombinantes. Les protéines actives ont finalement été caractérisées en vue de comprendre les relations séquence/structure/fonction. La lipase/acyltransférase CpLIP2 de *C. parapsilosis* CBS 604 et la lipase CaLA de *C. antarctica*, qui partagent 31 % d'identité, ont servi de références pour comprendre et identifier les séquences clés qui confèrent l'originalité aux enzymes de la famille des lipases/acyltransférases.

Après une synthèse bibliographique et une présentation des matériels et méthodes, la première partie de cette thèse porte sur l'étude de la diversité des lipases/acyltransférases chez des levures sauvages (Chapitre 1). Ce chapitre concerne la sélection de souches potentiellement intéressantes pour les activités enzymatiques qu'elles produisent : les cinétiques de production et la caractérisation biochimique des enzymes qu'elles sécrètent, afin d'identifier des lipases/acyltransférase d'intérêt similaires à CpLIP2.

La deuxième partie de la thèse, subdivisée en deux chapitres, est consacrée à l'étude des enzymes obtenues à partir de séquences informatiques de la base de données NCBI. Pour cela, l'obtention des enzymes d'intérêt, grâce à un travail de bioinformatique, de biologie moléculaire et de microbiologie, est décrite dans le chapitre 2, alors que leur caractérisation structurale et fonctionnelle fait l'objet du chapitre 3.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 INTRODUCTION

Les lipases, en particulier celles issues de microorganismes, font partie des enzymes couramment utilisées pour la bioconversion de lipides. Bien que souvent considérés comme étant complexes, fragiles et coûteux, les procédés enzymatiques de modification des lipides font l'objet d'utilisations croissantes dans divers domaines d'applications, notamment la pharmaceutique, la cosmétique, l'agroalimentaire et la chimie fine. Ils présentent en effet de nombreux avantages par rapport aux procédés de synthèse par voie chimique, qui ne permettent que difficilement d'accéder à une régio- ou stéréospécificité et nécessitent des catalyseurs chimiques souvent polluants et toxiques et des conditions physico-chimiques pouvant dégrader les produits. Les lipases présentent l'avantage d'être souvent régio- ou stéréospécifiques et de fonctionner de façon optimale dans des conditions modérées sans avoir besoin de produits chimiques nuisibles. Leur utilisation dans des procédés de synthèse permet la production de composés spécifiques dans des conditions réactionnelles respectueuses de l'environnement.

La limite des lipases dans des procédés de synthèse d'esters, c'est que la présence d'eau dans le milieu réactionnel favorise la libération d'acides gras, indésirables. La réduction de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) permet cependant de déplacer l'équilibre réactionnel vers les réactions de synthèse au détriment de l'hydrolyse. Pour cette raison, la synthèse des lipides en présence des lipases se fait en général dans des conditions spécifiques où l'on limite et/ou contrôle l'a_w [Goldberg *et al.*, 1990; Halling, 2000; Tweddell *et al.*, 1998].

Cependant, de nombreux travaux ont rapporté la synthèse d'esters en milieu aqueux présentant une activité de l'eau élevée en présence de lipases [Boutur *et al.*, 1995; Briand *et al.*, 1994; Lecointe *et al.*, 1996; Mcneill and Berger, 1995; Nishio *et al.*, 1988; Riaublanc *et al.*, 1993; Roustan *et al.*, 2005]. Dans un système macro-aqueux contenant eau, alcool et ester, une enzyme peut catalyser la synthèse d'ester par deux voies de transestérification : une voie directe assurée par la réaction de transfert d'acyle (alcoolyse) ou une voie indirecte mettant en œuvre deux réactions successives d'hydrolyse et d'estérification. Dans ce cas, trois familles d'enzymes peuvent être distinguées : 1) les lipases « classiques » qui catalysent préférentiellement l'hydrolyse suivie par l'estérification ; 2) les acyltransférases vraies qui ne catalysent que l'alcoolyse mais pas d'hydrolyse et qui nécessitent un substrat activé, par exemple sous forme d'acyl-coenzyme A [Rajakumari and Daum, 2010b; Sandager *et al.*, 2000] ; et 3) les lipases/acyltransférases qui catalysent majoritairement l'alcoolyse, avec

l'hydrolyse réduite, et qui n'exigent pas de substrat activé. De ce fait, les lipases/acyltransférases constituent une famille intermédiaire entre les lipases classiques et les acyltransférases vraies. A titre d'exemple, la lipase/acyltransférase CpLIP2 de *C. parapsilosis* catalyse l'alcoolyse préférentiellement à l'hydrolyse même en milieu aqueux à forte valeur thermodynamique de l'eau (a_w>0,9) [Briand *et al.*, 1995a]. Cette propriété originale est très intéressante en biocatalyse pour des applications de transformation des dérivés lipidiques dans le cadre de la chimie verte ou durable [Dubreucq *et al.*, 2003].

Dans cette synthèse bibliographique, nous nous sommes intéressés tout d'abord à la structure, les propriétés catalytiques et le mécanisme d'action des lipases classiques. La lipase A de *C. antarctica* a ensuite été étudiée comme exemple du fait que sa séquence protéique est la plus homologue (31 % d'identité) à celle de la lipase/acyltransférase CpLIP2 et que sa structure cristallographique a été résolue. Enfin, nous faisons l'état de connaissances sur les lipases/acyltransférases ainsi que sur leurs homologues catalysant le transfert d'acyles à partir d'esters et classées comme acyltransférases ou transacylases. Par contre, les acyltransférases catalysant le transfert d'acyles à partir d'acyl-CoA ne sont pas présentées dans cette étude.

2 LES LIPASES

2.1 Généralités

Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie des carboxyl-estérases (EC 3.1.1) qui hydrolysent spécifiquement des esters carboxyliques. Auparavant, elles étaient considérées comme une classe particulière d'estérases, capables d'hydrolyser les esters carboxyliques insolubles. La distinction entre les lipases et les estérases (EC 3.1.1.1) se faisait alors par leur aptitude ou inaptitude à être activées par la présence d'une interface [Verger and Dehaas, 1976]. En effet, contrairement au estérases, l'activité lipolytique de certaines lipases augmente brusquement lorsque la concentration en substrat dépasse la concentration micellaire critique (CMC, au-dessus de laquelle les molécules de substrat forment une interface eau/corps gras en prenant la forme de micelles, d'une émulsion ou d'un film mono-moléculaire) [Entressangles and Desnuelle, 1968; Sarda and Desnuelle, 1958]. Ce phénomène a abouti à la notion de

« mécanisme d'action interfaciale » assuré par un fragment amphiphile mobile recouvrant le site actif de lipases que l'on appelle le « chapeau » ou le « lid ». Cependant, ce critère s'est avéré non pertinent car d'une part l'activation interfaciale est difficile à mettre en évidence, d'autre part certaines lipases possédant un chapeau ne présentent pas d'activation interfaciale nette, et enfin certaines lipases ne possèdent pas de chapeau [Nini *et al.*, 2001; Verger, 1997]. De ce fait, les lipases sont actuellement définies comme étant les hydrolases des triacylglycérides à longues chaines d'acides gras. Basés sur ce critère de spécificité de substrat, de nombreux travaux ont montré que les lipases, disposant un chapeau ou non, sont actives non seulement sur des esters à longues chaines insolubles dans l'eau, mais aussi sur des esters carboxyliques partiellement hydrosolubles (eg. tributyrine) de la même façon que les estérases [Chahinian and Sarda, 2009; Hjorth *et al.*, 1993; Martinelle *et al.*, 1995]. Au contraire, les estérases sont actives uniquement sur les esters à courtes chaines, mais pas à longues chaines.

Etant donné que de nombreuses enzymes lipolytiques sont actives sur une large gamme de substrats lipidiques [Lopes *et al.*, 2011], cette définition apporte une certaine contradiction au niveau de la classification. En effet, les cutinases, qui dégradent la cuticule des végétaux en clivant les liaisons esters des polymères de cutine, sont également capables d'hydrolyser des triglycérides à courtes et longues chaînes d'acides gras. Bien qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale [Martinez *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1994], leur efficacité de lipolyse est comparable à celle de la lipase pancréatique [Longhi and Cambillau, 1999].

Les lipases sont présentes dans les plantes, les animaux et les micro-organismes. Cependant, les lipases d'origine microbienne sont préférentiellement utilisées dans différents domaines d'applications comme la pharmaceutique, la cosmétique, l'agroalimentaire, le textile, le détergent, le papier et la parfumerie du fait de la simplicité liée à la production et purification de ces enzymes, de la bonne stabilité ainsi que de la diversité de leurs propriétés catalytiques et des moyens d'amélioration [Hasan *et al.*, 2006; Jaeger *et al.*, 1999; Jaeger and Eggert, 2002; Villeneuve *et al.*, 2000]. Cette grande diversité est aussi associée à la diversité de leur origine. Ainsi par exemple, des lipases actives à la basse température peuvent être isolées à partir des microorganismes psychrophiles [Tanaka *et al.*, 2012].

2.2 Structure des lipases

Les lipases microbiennes décrites jusqu'à présent partagent l'architecture structurale de la famille des α/β hydrolases, en dépit de leurs différences de taille (20-60 kDa), de séquence et d'autres propriétés. Cette topologie commune se compose au moins de 5 feuillets β parallèles connectés et emballés par des hélices α [Ollis *et al.*, 1992]. La machinerie catalytique comprend une triade catalytique et un trou à oxyanion, situés dans le site actif recouvert éventuellement par un fragment amphiphile (ou le chapeau) [Abd Rahman *et al.*, 2012; Ericsson *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012].

La triade catalytique est composée de trois acides aminés géométriquement conservés : une sérine (S) polaire non chargée, une histidine (H) polaire chargée positivement et un acide glutamique ou aspartique (E/D) polaire chargé négativement. La sérine catalytique se situe dans le coude nucléophile constitué du penta-peptide GX_1SX_2G conservé presque chez toutes les lipases. La prédominance des résidus glycine (G), de faible encombrement stérique, à la position -2 et +2 par rapport à la sérine du penta-peptide permet la formation de ce coude [Schrag and Cygler, 1997]. La modification ou le changement d'un des trois résidus conservés de la triade catalytique conduit à la perte de l'activité [Feller *et al.*, 1991], ces acides aminés jouant un rôle primordial dans la catalyse.

Le trou à oxyanion est constitué de deux résidus, qui stabilisent l'état de transition. Un résidu (X_2) est localisé dans le coude nucléophile conservé, son amide se positionnant identiquement pour toutes les lipases. Un autre résidu du trou à oxyanion, au contraire, ne se localise pas dans la région de séquence ou de structure conservée, mais sur une autre boucle de la lipase. Lors de l'activation interfaciale, la configuration de ce trou à oxyanion ou encore celle du site actif pourrait changer selon la nature de chaque enzyme [Akoh *et al.*, 2004; Ericsson *et al.*, 2008].

Lorsqu'il est présent, le chapeau se retrouve en général sous forme d'hélices sauf pour quelques lipases dont le chapeau est sous forme de boucles [Xu *et al.*, 2012]. On trouve également des lipases ayant deux chapeaux [Cheng *et al.*, 2012; Cherukuvada *et al.*, 2005]. Ce fragment amphiphile, plus ou moins mobile, est constitué par une ou plusieurs courtes hélices α liées au corps de la lipase par des éléments de structure relativement flexibles. L'accessibilité du substrat au site actif semble dépendre de ce chapeau dont la conformation change en fonction de l'environnement qui l'entoure [Barbe *et al.*, 2009]. En effet, en milieu

aqueux, l'enzyme se retrouve dans un état inactif ou fermé et le site actif ne serait pas accessible au substrat ; la face hydrophobe du chapeau s'orienterait vers le site actif par interaction hydrophobe avec ses résidus et la face hydrophile vers l'extérieur. En présence du solvant organique et/ou de substrat lipidique, le chapeau se déplacerait et sa face interne, devenue accessible au solvant, créerait une surface hydrophobe qui interagirait avec l'interface huile/eau. Le site actif deviendrait alors accessible au substrat [Barbe *et al.*, 2009; Derewenda *et al.*, 1994]. Du point de vue fonctionnel, le chapeau confèrerait à l'enzyme diverses spécificités de substrat ainsi que d'autres fonctionnalités. Par exemple, la lipase de *Malassezia glubosa* est très spécifique vis-à-vis les mono- et di-glycérides, mais elle n'est pas active sur les triglycérides. Cette propriété est due à deux résidus de son chapeau créant un effet d'empêchement stérique qui protège le site actif de l'enzyme de substrat encombrants comme les triglycérides [Xu *et al.*, 2012]

Le rôle et les interactions de la triade catalytique, du trou à oxyanion, du chapeau et de divers résidus sont devenus l'objet de recherches pour comprendre l'activité catalytique, la spécificité des lipases ainsi que les relations entre séquence, structure et fonction [Holmquist *et al.*, 1997; Santarossa *et al.*, 2005]. En plus, la séquence et la structure du trou à oxyanion servent de critère pour classifier les lipases/estérases microbiennes dans la base de données LED (Lipase Engineering Database) [Fischer and Pleiss, 2003; Pleiss *et al.*, 2000]. La première classe (GX) contient 11 superfamilles ou 22 familles homologues. Elle comprend principalement les lipases bactériennes ou fongiques, les lipases eucaryotes, les cutinases, les phospholipases, les acyltransférases. La deuxième classe (GGGX), regroupant 5 superfamilles ou 16 familles homologues, comprend notamment les estérases, les lipases activées par les sels biliaires et les lipases hormono-sensibles. De nombreuses lipases et estérases de cette classe GGGX ont été identifiées comme actives vis-à-vis des acétates d'alcools tertiaires, alors que celles de la classe GX ne catalysent pas l'hydrolyse de ces composés [Henke *et al.*, 2002]. Les avancements des travaux de recherche contribuent sans cesse à l'accumulation des données ; une nouvelle classe Y regroupant le reste des enzymes dont la séquence et la structure du trou à oxyanion ne correspondent pas aux deux premiers cas a été ajoutée dans cette base de données [Widmann *et al.*, 2010]. Dans cette dernière classe, on retrouve la lipase A de *C. antarctica*, qui est la plus homologue à CpLIP2 (31 %) et dont la structure cristallographique a été résolue.

2.3 Différentes réactions catalysées par les lipases

Les lipases ont pour fonction naturelle de catalyser l'hydrolyse des triacylglycérols en di- et mono-acylglycérols ou acides gras libres. Cependant, obéissant au principe de micro-réversibilité comme les réactions chimiques, la réaction inverse d'hydrolyse (estérification) se produit également [Paiva *et al.*, 2000]. L'équilibre de conversion dépend notamment de l'activité thermodynamique de l'eau du milieu réactionnel. En système homogène macro-aqueux à forte a_w, le bilan est favorable aux réactions d'hydrolyse alors que l'estérification est limitée, et inversement. A part l'estérification, les lipases peuvent catalyser d'autres réactions et/ou voies de synthèse d'ester généralement connues sous le terme « transestérification » (Figure 1). L'alcoolyse est une voie directe de synthèse d'ester permettant le transfert d'acyle depuis un ester donneur vers un alcool pour former un nouvel ester. En conditions aqueuses homogènes, cette réaction est généralement minoritaire par rapport à l'hydrolyse libérant l'acide gras. Dans des conditions similaires, les lipases peuvent également catalyser la réestérification de l'acide gras libéré avec de l'alcool pour former l'ester. Autrement dit, la succession des deux réactions constitue la deuxième voie de synthèse, la voie indirecte. Dans tous les cas, la limitation de l'a_w favorise l'alcoolyse et/ou la réestérification au détriment de l'hydrolyse. C'est pour cette raison que la modification des lipides par transestérification en utilisant les lipases s'effectue généralement dans des conditions micro-aqueuses à faible a_w. Il faut noter cependant que l'équilibre peut être également déplacé de plusieurs ordres de grandeur en faveur de l'estérification lorsque le milieu aqueux est biphasique [Halling, 1984; Klibanov *et al.*, 1977; Lecointe *et al.*, 1996; Martinek *et al.*, 1981; Vaysse *et al.*, 2002].

Au contraire, l'utilisation des lipases/acyltransférases permet la synthèse d'ester en condition macro-aqueux (a_w>0,9) du fait que ces enzymes catalysent l'alcoolyse préférentiellement à l'hydrolyse.

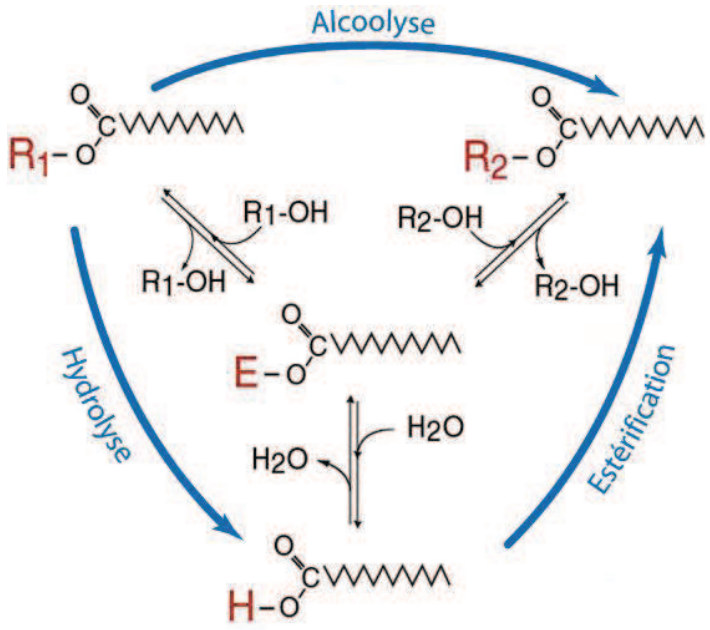


Figure 1 : Représentation schématique des deux voies de transesterification catalysées par une lipase

L'alcoolyse est une réaction de transfert direct du groupement acyle d'un ester vers un alcool (voie directe), formant ainsi un nouvel ester. La succession de la réaction d'hydrolyse et d'estérification constitue une seconde voie de synthèse (voie indirecte).

2.4 Mécanisme d'action

Afin d'expliquer les mécanismes réactionnels mis en jeu, nous proposons une discussion sur différents modèles décrivant le parcours lipolytique et la cinétique réactionnelle des lipases. L'étude du mécanisme d'action des enzymes a vu le jour au début du 19ème siècle grâce à de nombreux travaux des pionniers de l'enzymologie [Henri, 1903; Lineweaver and Burk, 1934; Michaelis *et al.*, 2011]. Le mécanisme dit de Michaelis-Menten est devenu le modèle principal servant à décrire les réactions catalysées par les enzymes les plus couramment étudiées, dites « michaeliennes ».

Les lipases fonctionnant à l'interface lipides/eau, le modèle Michaelis-Menten n'est cependant pas adapté aux cinétiques en milieu hétérogène huile-eau car un des postulats de ce modèle est que la réaction se déroule en milieu isotrope (le substrat et l'enzyme doivent être dans la même phase; l'étape de fixation du substrat doit être relativement rapide par rapport à la vitesse de transformation du complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire qu'il s'établit un

équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme et du substrat (E et S) et le complexe enzyme-substrat (ES)).

Verger et ses collègues ont proposé un mécanisme en deux temps (Modèle de Michaelis-Menten modifié) tenant compte de l'activation interfaciale de la lipase [Schmid and Verger, 1998; Verger and Dehaas, 1976; Verger *et al.*, 1973]. Le premier temps concerne la pénétration réversible de la lipase hydrosoluble à l'interface lipide/eau, conduisant à l'activation de la lipase et donc à l'ouverture du chapeau (s'il existe) qui autrement masque le site actif. Le deuxième temps consiste en la formation du complexe lipase pénétrée-substrat aboutissant à la libération de produit comme décrit dans le modèle classique de Michaelis-Menten. De manière plus détaillée, ce dernier peut être divisé en quatre étapes comme cela a été proposé pour le mécanisme d'action de la lipase A de *C. antarctica* (CaLA) dans la Figure 5 [Ericsson *et al.*, 2008]. Toutefois, les suppositions de ce modèle à deux temps sont que les produits issus de cette réaction catalytique (hydrolyse) sont hydrosolubles, diffusent rapidement loin de l'interface et ne causent aucun changement du substrat au cours du temps [Verger *et al.*, 1973] ce qui n'est pas vraiment vérifié avec la libération d'un alcool plutôt hydrophile d'une part, et d'un acide gras lipophile d'autre part. Par ailleurs, le modèle de Michaelis-Menten et sa version modifiée ne sont valables que pour une réaction avec un seul substrat (hydrolyse). Les réactions séquentielles qui concernent deux ou plusieurs substrats peuvent cependant être décrites par les modèles Ping-Pong, Séquentiel ordonné et Séquentiel aléatoire [Marangoni, 2003] selon l'ordre de la combinaison des substrats à l'enzyme et de la libération des produits au cours de la réaction catalytique. Pour le mécanisme Ping-Pong, un ou plusieurs produits doivent être libérés avant que tous les substrats puissent réagir. Ainsi en présence de deux substrats (mécanisme Bi-Bi Ping-Pong), le substrat A se combine à l'enzyme pour former une enzyme modifiée et le produit P1 libéré, puis le substrat B se fixe à l'enzyme modifiée pour libérer le produit P2 et l'enzyme régénérée. Pour le mécanisme séquentiel, tous les substrats doivent se combiner avec l'enzyme avant que la réaction ne se déroule. Si la combinaison des substrats et la libération des produits se fait dans un ordre spécifique le mécanisme est dit séquentiel ordonné, sinon il est séquentiel aléatoire.

Plusieurs travaux sur la synthèse d'esters par les lipases dans les milieux non-aqueux ont rapporté que le mécanisme réactionnel des lipases suivait le modèle Bi-Bi Ping-Pong, où interviennent deux substrats [Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001; Chulalaksananukul *et al.*, 1990; Martinelle and Hult, 1995; Zaks and Klibanov, 1985]. Par ailleurs, Zaks et Klibanov ont montré que l'alcoolyse de la tributyrine avec l'heptanol catalysée par la lipase pancréatique

porcine en milieu organique était également en accord avec le mécanisme Bi-Bi Ping-Pong et obéissait encore à la cinétique de Michaelis-Menten [Zaks and Klibanov, 1985]. L'utilisation du modèle Ping-Pong dans ces conditions micro-aqueuses considère généralement que la réaction d'hydrolyse est négligeable. L'eau, essentielle pour maintenir l'intégrité structurelle de l'enzyme, est considérée comme un intermédiaire de la réaction catalytique (génération de l'intermédiaire catalytique), sans consommation ni formation nette [Malcata *et al.*, 1992; Paiva *et al.*, 2000]. Or, diverses études ont révélé les effets de l'eau sur le rendement de la synthèse d'ester par estérification [Chulalaksananukul *et al.*, 1990], alcoolyse [Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001] ou en conditions d'interestérification (échange de groupements acyles entre deux esters) [Tweddell *et al.*, 1998]. Par conséquent, en plus de son rôle comme lubrifiant, l'eau devrait contribuer directement aux réactions catalysées par les lipases. Pour illustrer ces considérations, Janssen et ses collègues ont suggéré un modèle modifié – qui tient compte de la présence de l'eau dans le milieu réactionnel – pour décrire la réaction d'estérification catalysée par une lipase en milieu organique [Janssen *et al.*, 1999]. Par ailleurs, le modèle décrivant le mécanisme de transestérification de l'ester par les lipases en milieu aqueux ne semble pas être rapporté dans la littérature, contrairement aux lipases/acyltransférases et leurs homologues (les LCAT) pour lesquelles la notion de compétition entre les nucléophiles (eau et alcool) dans le milieu réactionnel a été mentionnée [Briand *et al.*, 1995c; Dergunov, 2012].

2.5 Cas de la lipase A de *Candida antarctica*

La classe Y dans la Lipase Engineering Database comprend 5 superfamilles, parmi lesquelles on retrouve la superfamille « *C. antarctica* lipase A like » (abH38), qui se divise elle-même en 4 familles homologues. Une de ces familles homologues est celle « *C. albicans* lipase like » (abH38.02), qui comprend 12 séquences de lipases (novembre 2012) dont la lipase/acyltransférase CaLIP4 de *C. albicans*. Malheureusement, seule la structure cristallographique de la lipase A de *C. antarctica* (CaLA) est disponible dans cette superfamille [Ericsson *et al.*, 2008; Fischer and Pleiss, 2003; Pleiss *et al.*, 2000; Widmann *et al.*, 2010]. Bien que CaLA partage seulement 31 et 33 % d'identité respectivement avec CpLIP2 et CaLIP4, elle apparaît à l'heure actuelle comme le meilleur support pour une étude comparative de la structure et des propriétés catalytiques des lipases/acyltransférases et a permis la construction d'un modèle de CpLIP2 par homologie [Nozac'h, 2008].

2.5.1 Production et extraction

La lipase CaLA a été produite par expression hétérologue dans *P. pastoris* et *E. coli* [Hoegh *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 2006; Pfeffer *et al.*, 2007]. De nombreuses méthodes de préparation de cette enzyme ont été rapportées dans la littérature. Par exemple, une méthode d'extraction de CaLA à l'aide de divers liquides ioniques a été récemment décrite [Deive *et al.*, 2012]. L'utilisation d'un mélange de butyle sulfate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium [C_2MIM][C_4SO_4] et de sulfate d'ammonium a permis d'extraire l'enzyme avec un rendement de 99 % tout en préservant au mieux son activité. Une méthode de purification de CaLA par chromatographie sur hydroxyapatite (HAP) en une seule étape, avec un rendement de 94,7 %, a également été publiée récemment [Dimitrijevic *et al.*, 2012]. L'enzyme adsorbée sur HAP est éluée par une solution tampon de phosphate de sodium (10 mM, pH 7) contenant 0,5 % de triton X-100.

2.5.2 Propriétés catalytiques

Connue commercialement sous le nom Novozym 735, la lipase A de *C. antarctica* est un biocatalyseur utile dans de nombreuses applications. D'un poids moléculaire de 45 kDa et avec un pHi de 7,5, CaLA présente des propriétés catalytiques particulières : thermostabilité élevée (opérationnelle même à une température supérieure à 90 °C), acceptation des alcools tertiaires, stabilité dans une large gamme de pH acide, chemo- et énantio-sélectivité vis-à-vis des groupes amine permettant la synthèse d'esters d'acides aminés [Bosley *et al.*, 1997; de Maria *et al.*, 2005; Kirk and Christensen, 2002; Krishna *et al.*, 2002; Solymar *et al.*, 2002].

Yang *et al.* [2012] ont étudié l'effet de différents solvants organiques sur l'activité et la stabilité vis-à-vis du pH et de la température de CaLA recombinante. Les activités d'estérification et d'hydrolyse augmentent en présence d'acétone ou d'acétonitrile mais diminuent, en revanche, en présence d'éthanol ou d'acétate d'éthyle. La thermo- et pH-stabilité est meilleure également quand l'enzyme est traitée avec de l'acétonitrile. Par ailleurs, il a été montré que cette enzyme peut également catalyser les réactions de synthèse d'ester en présence d'une grande quantité d'eau lorsque les deux substrats (ester et alcool) sont insolubles dans l'eau. En effet, la transestérification de déchets lipidiques (triglycérides) par le 2-éthyl 1-hexanol a été réalisée dans une condition avec un ratio massique alcool : ester : eau de 0,84 : 2 : 1,6 à 2. Dans cette condition, la réaction d'hydrolyse reste réduite (acides gras

libérés < 5 %) [Brenneis *et al.*, 2004]. Néanmoins, nous n'avons aucun argument pour montrer que cette formation d'ester se fait par la réaction d'alcoolyse ou par la succession de réactions (hydrolyse + estérification), d'autres lipases classiques étant capable de catalyser l'estérification avec des rendements élevés dans de telles conditions [Mcneill and Berger, 1995]. Par ailleurs, en plus de la transestérification en condition abondante d'eau, l'estérification de l'acide palmitique avec le 2-éthyl 1-hexanol en vue de la synthèse de palmitate de 2-éthyle-1-héxyle a également été étudiée en présence de CaLA. L'activité de catalyse optimale a été obtenue avec un ratio massique alcool : acide gras : eau de 1 : 2 : 2,5 à 3 [Brenneis and Baeck, 2012].

Plusieurs études se sont penchées en particulier sur les propriétés de sélectivité de CaLA. L'évolution combinatoire intensive par saturation du site actif (high combinatorial active-site saturation test : CAST) a été utilisée pour améliorer l'énantiosélectivité de l'enzyme vis-à-vis des esters d'acides carboxyliques α-substitués. Pour cela, des résidus entourant le nucléophile Ser184 de la triade catalytique ont subi des modifications ; l'énantiosélectivité de l'enzyme issue du meilleur variant a améliorée jusqu'à 10 fois pour le 2-méthylheptanoate de 4-nitrophényle [Sandstrom *et al.*, 2009] ou même 30 fois pour certains esters de p-nitrophényle α-substitué [Engstrom *et al.*, 2010]. En plus, cette approche d'ingénierie des protéines (CAST) a permis d'améliorer non seulement l'activité de l'enzyme mais aussi son énanitiosélectivité vis-à-vis de substrats complexes tels que le 2-(4-isobutylphenyl) propanoate (ou ibuprofène) [Sandstrom *et al.*, 2012].

2.5.3 Structure de CaLA

Une première étude de la structure de CaLA a été réalisée par Kasrayan *et al.* [2007] par la caractérisation de variants obtenus par mutagenèse dirigée. En effet, différents variants de CaLA ont été obtenus par mutagenèse dirigée en remplaçant par des résidus alanine des acides aminés supposés importants pour l'activité de l'enzyme. Cela a permis notamment de confirmer la triade catalytique de l'enzyme (Sr184, His366, Asp334) [Kasrayan *et al.*, 2007]. En 2008, la résolution de la structure de CaLA par cristallographie aux rayons X [Ericsson *et al.*, 2008] a permis d'obtenir une représentation réelle de cette enzyme, qui sert de référence pour la superfamille « *C. antarctica* lipase A like » dans la base de données LED [Widmann *et al.*, 2010].

La lipase A de *C. antarctica* a formé une unité de cristallisation contenant deux monomères lors de sa cristallisation. Aucun contact entre ces deux polypeptides n'est cependant observé, ce qui prouve que ceux-ci ne forment pas un dimère. Ces cristaux ont permis d'élucider la structure des résidus 11 à 440 des 441 acides aminés de la protéine [Ericsson *et al.*, 2008]. Ces travaux ont ouvert de grandes possibilités pour l'étude et les recherches d'amélioration, tant pour CaLA que pour ses homologues.

CaLA obéit à l'architecture commune des α/β hydrolases (Figure 2b). Elle se compose de 11 feuillets β (B1 à B11) connectés par 14 hélices α (A1 à A14). Le chapeau est composé de 92 résidus (217 à 308) qui constituent 6 courtes hélices (A5 à A10) insérées entre les feuillets B7 et B8 du corps de la lipase, appelé domaine α/β hydrolase (Figure 2c). Comme montré dans la Figure 2a, deux ponts disulfures connectent les paires de cystéines 101/273 et 350/394. La première relie le chapeau au domaine de α/β hydrolase, alors que la deuxième s'allonge sur le domaine.

La cavité formée entre le domaine α/β hydrolase et le chapeau héberge le site actif dont les trois résidus Ser184, Asp334 et His366 forment la triade catalytique. Dans le site actif, on observe un fragment de molécule de polyéthylène glycol (PEG) issu de la solution de cristallisation (Figure 3a). Le groupe terminal hydroxyle forme des liaisons hydrogène avec la Ser184 et avec l'acide aspartique Asp95 voisin. Dans cette configuration, le volume disponible de la cavité du site actif semble complètement protégé contre le solvant qui l'entoure (Figure 3b). La molécule de PEG est enchassée dans un tunnel bien adapté à sa taille et sa forme. Ce tunnel est structuré en particulier par des résidus non-polaires, sauf un bloc de résidus chargés (Glu249, Glu253 et Arg268) situés à l'extrémité la plus éloignée par rapport à la triade catalytique. Une autre partie inférieure de ce tunnel est aussi très polaire et est attachée par les chaines latérales de Ile150, His188, Trp192 et Glu308.

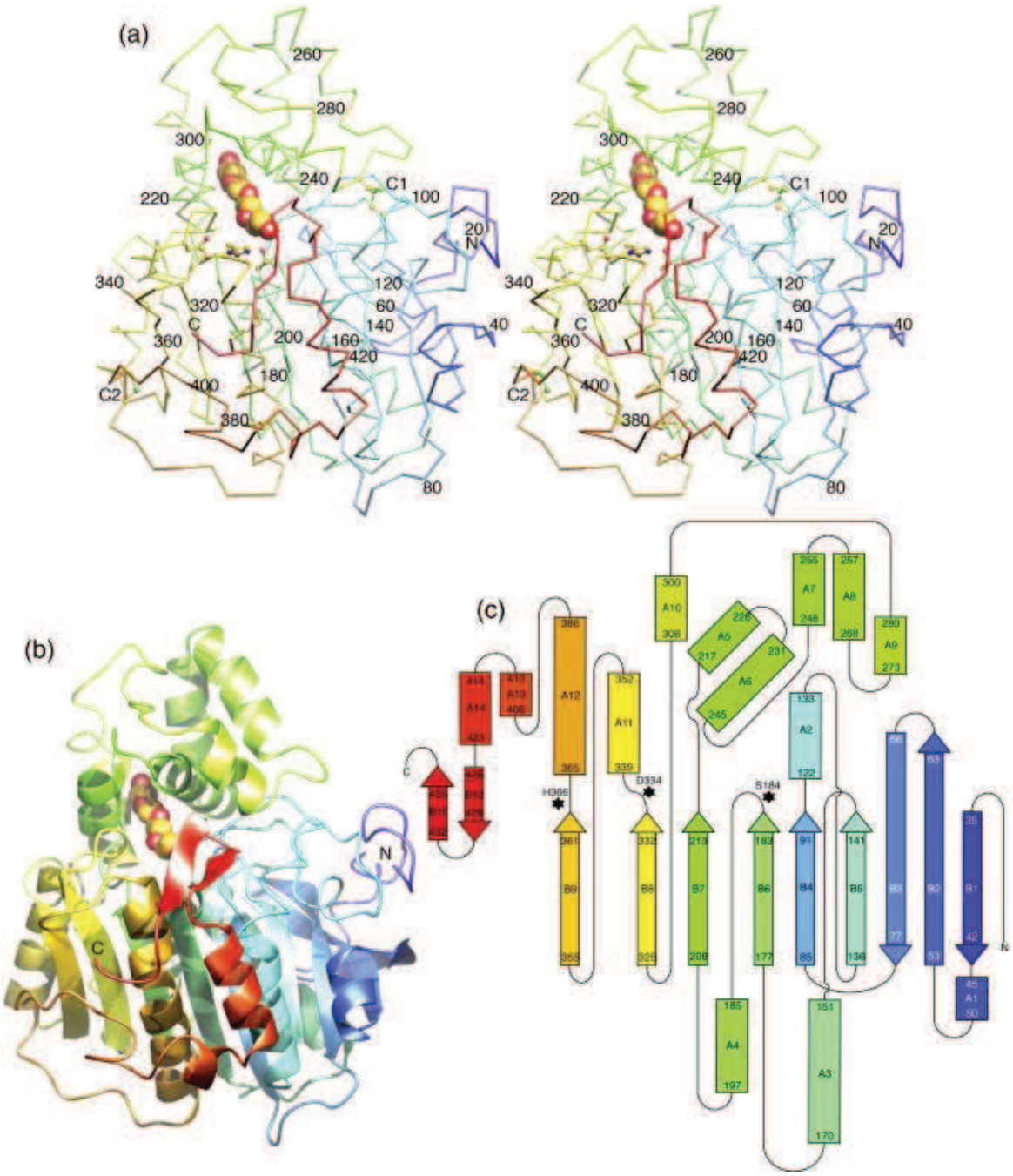


Figure 2 : Structure de la lipase A de *C. antarctica* (CaLA)

(a) vue stéréo du squelette (les deux ponts disulfures sont indiqués par C1 et C2 ; les résidus du site actif Ser184, Asp334 et His366 sont représentés sous forme de boules et bâtons). (b) présentation des structures secondaires. (c) topologie de CaLA (la lipase se forme par 11 feuillets β (B1 à B11 C-terminal) connectés par 14 hélices α (A1 à A14) ; le chapeau est constitué de 6 courtes hélices α (A5 à A10)). La référence de la structure dans la Protein Data Bank (PDB) est 2VEO [Ericsson et al., 2008].

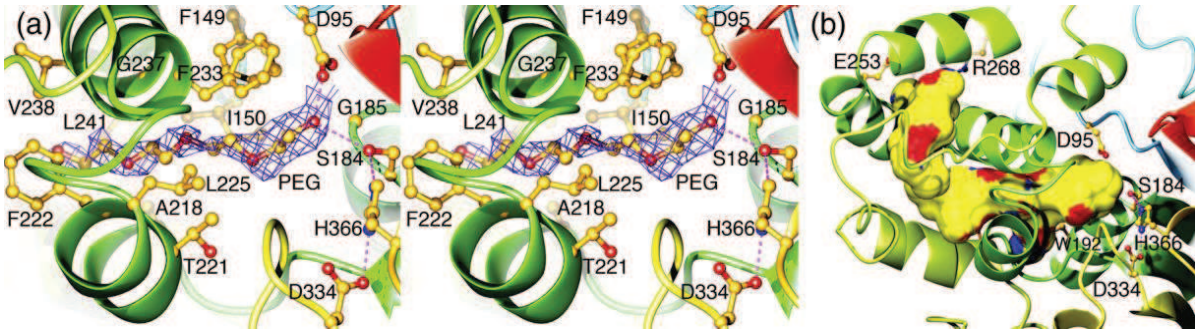


Figure 3 : Site actif de CaLA [Ericsson *et al.*, 2008]

(a) vue stéréo de la triade catalytique formée par Ser184, His366 et Asp334, avec la densité électronique observée pour la molécule de PEG présente dans le cristal. Les lignes pointillées représentent des liaisons hydrogène. (b) mise en évidence de la cavité du site actif avec localisation des résidus chargés dans le tunnel.

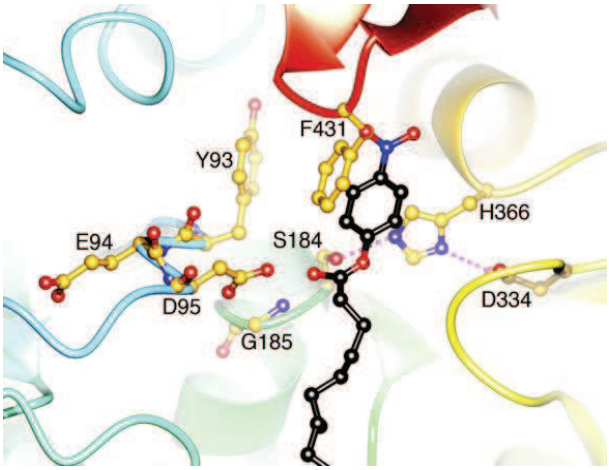


Figure 4 : Docking d'un ester de p-nitrophenyle (atomes de carbone en noir) dans le site actif de CaLA [Ericsson *et al.*, 2008]

Le trou à oxyanion se composerait de Asp95 et de l'atome d'azote de Gly185.

L'atome d'azote du squelette de la glycine Gly185 située à côté de la sérine catalytique a été identifié comme le premier résidu du trou à oxyanion, le deuxième étant l'acide Asp95 [Ericsson *et al.*, 2008]. Pourtant, certains auteurs considèrent que le deuxième résidu serait plutôt la Tyr93 [Widmann *et al.*, 2010]. Le trou à oxyanion a pour rôle de fixer le substrat et de stabiliser les intermédiaires tétraédriques lors de la catalyse enzymatique (Figure 5). En effet, après une attaque nucléophile par la sérine catalytique Ser184, l'intermédiaire tétraédrique formé est stabilisé par les interactions avec l'atome d'azote du squelette de la Gly185 et avec la chaine latérale protonée de Asp95 ou Tyr93 (1). His366 donne son proton au premier produit (alcool), qui quitte le site, et l'intermédiaire tétraédrique se décompose (2). Une molécule d'eau entre dans le site et, après avoir été activée par la paire His366/Asp334, attaque l'acyl-enzyme pour générer le deuxième intermédiaire tétraédrique (3), qui se divise pour libérer le second produit (acide gras) (4).

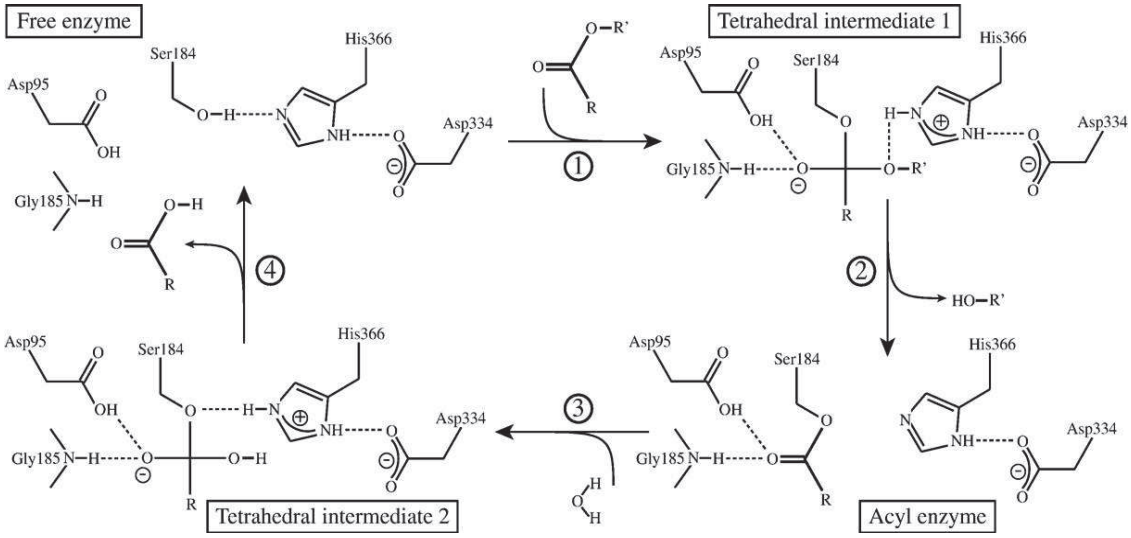


Figure 5 : Mécanisme proposé de la réaction d'hydrolyse catalysée par CaLA [Ericsson *et al.*, 2008]

Le substrat lipidique entre dans le site actif et le nucléophile Ser184, activé par déprotonation par His366/Asp334, attaque le substrat pour former l'intermédiaire tétraédrique stabilisé par les interactions avec l'atome d'azote du squelette de Gly185 et avec la chaine latérale protonée de Asp95 (étape 1). His366 donne son proton au produit alcool, qui sort du site actif, et l'intermédiaire tétraédrique se décompose (étape 2). Une molécule d'eau entre dans le site actif et, après avoir été activée par His366/Asp334, attaque l'acyl-enzyme pour générer le deuxième intermédiaire tétraédrique (étape 3) qui se divise pour libérer le produit carboxylate (étape 4).

3 LES LIPASES/ACYLTRANSFERASES

Les lipases/acyltransférases constituent une nouvelle famille de lipases avec des propriétés intermédiaires entre les lipases classiques et les acyltransférases. En fonction des conditions expérimentales, ces trois groupes d'enzymes peuvent toutes catalyser la réaction de transfert d'acyle. La particularité des lipases/acyltransférases est qu'elles peuvent à la fois catalyser la réaction d'hydrolyse en milieu aqueux et des réactions de transfert d'acyles préférentiellement à l'hydrolyse en présence de nucléophiles tels que les alcools, même en milieu aqueux avec une valeur très forte de a_w. Par ailleurs, les lipases/acyltransférases ne nécessitent pas de substrat activé de type ester de coenzyme A et peuvent par exemple transformer directement des triglycérides. Les acyltransférases classiques présentent généralement un site consensus HX(4)D de liaison de l'acyle-CoA [Rajakumari and Daum, 2010a] dont la modification d'un des acides aminés résulte en une variation de l'activité de transfert par rapport à l'hydrolyse. Ce consensus n'est pas trouvé chez les lipases/acyltransférases, notamment chez CpLIP2 de *C. parapsilosis* [Neugnot *et al.*, 2002] ni dans les lipases classiques comme la lipase A de *C. antarctica*.

Cette étude bibliographique fait le point sur l'état des connaissances actuelles sur les lipases/acyltransférases. Nous nous intéressons aussi à leurs homologues ayant un comportement catalytique similaire (catalyse du transfert d'acyle indépendamment de l'acyl-CoA) mais classés comme acyltransférases ou transacylases.

3.1 La lipase/acyltransférase CpLIP2 de *Candida parapsilosis*

3.1.1 Production de CpLIP2

La lipase/acyltransférase CpLIP2 a été identifiée chez la levure *C. parapsilosis* CBS 604 par notre laboratoire. C'est une enzyme exocellulaire dont la production est induite par la présence d'huile dans le milieu de culture et n'est pas réprimée par le glucose. Le gène codant pour CpLIP2 a été cloné (numéro d'accession gi/21954332 dans la base de donnée NCBI ; [Dubreucq *et al.*, 2003]), puis surexprimé avec succès chez *Saccharomyces cerevisiae* [Neugnot *et al.*, 2002] et *Pichia pastoris* [Brunel *et al.*, 2004]. La protéine recombinante, de

poids moléculaire de 54 kDa avec un pHi de 5,7-6 [Neugnot *et al.*, 2002], ne change pas de spécificité de substrat ni de comportement catalytique par rapport à l'enzyme native.

3.1.2 Structure

CpLIP2 est constituée de 465 d'aminoacides et présente 31 % d'identité par rapport à la lipase A de *C. antarctica* (CaLA), la plus proche des lipases commercialement disponibles. Dans le cadre d'un programme d'amélioration de l'enzyme, plusieurs études structurales et fonctionnelles de CpLIP2 ont été effectuées. La forte tendance naturelle de cette protéine à s'agréger n'a pas permis jusqu'à présent d'obtenir de forme cristallisée [Brunel, 2005]. La résolution de la structure cristalline de CaLA [Ericsson *et al.*, 2008] a cependant permis la modélisation structurale de CpLIP2 par homologie [Nozac'h, 2008]. Le modèle de CpLIP2 a ensuite été validé par la caractérisation fonctionnelle de divers variants obtenus par mutagenèse dirigée. Les effets des mutations générées se sont avérés bien corrélés à la structure 3D prédite [Nozac'h, 2008].

3.1.3 Propriétés catalytiques

Active sur une plage de pH acide allant de 3 à 7, cette lipase/acyltransférase possède la particularité de pouvoir catalyser préférentiellement l'alcoolyse à l'hydrolyse même en milieu aqueux à forte valeur thermodynamique de l'eau ($a_w > 0,9$). Par exemple, elle est capable de catalyser la synthèse des esters méthyliques par méthanolyse d'huile de colza en milieu biphasique aqueux [Briand *et al.*, 1994]. Cette réaction de synthèse est effectuée au détriment de l'hydrolyse qui est inhibée à près de 100 % à la concentration optimale en alcool pour la synthèse (2-4 M de méthanol). La synthèse d'esters à partir d'alcools et d'acides gras libres dans les mêmes conditions est plus lente qu'à partir d'esters, et il a été démontré que CpLIP2 catalyse la transestérification par la voie directe d'alcoolyse [Briand *et al.*, 1995b], contrairement aux lipases classiques [Lecointe *et al.*, 1996]. L'explication de cette caractéristique a été proposée en basant sur la notion de compétition entre les accepteurs d'acyle, dans ce cas l'alcool et l'eau [Briand *et al.*, 1995b].

L'étude de la régiosélectivité a montré que la sélectivité apparente de CpLIP2 vis-à-vis la position 2 de triglycérides n'était que le résultat du réarrangement entre glycérides partiels

au cours de la réaction, catalysé par l'enzyme en utilisant les hydroxyles libres des glycérides partiels et du glycérol comme accepteurs d'acyles en compétition avec l'eau [Briand *et al.*, 1995b]. Cette lipase/acyltransférase n'est ainsi pas régio-spécifique. Plus généralement, elle admet une assez large gamme de substrats. Les substrats lipidiques sont les tri-, di- et mono-glycérides ainsi que des monoesters variés (esters d'alcool courts, de nitrophénol, de sorbitol, d'alcools gras, de stérols..). L'enzyme est plus active sur les esters d'acides gras à longues chaines insaturés en C16-C18 et sur les esters d'acides gras saturés à chaîne moyenne (C10-C14) [Briand *et al.*, 1995c]. Les meilleurs substrats lipidiques présentent un point de fusion situé entre -40 et +20 °C, une chaine acyle comprenant 12 à 18 atomes de carbone et un groupement alkyle avec 1 à 4 atomes de carbone. Les alcools accepteurs d'acyles peuvent être primaires ou secondaires, linéaires ou ramifiés. L'enzyme semble cependant présenter une meilleure affinité pour les alcools primaires à courte chaine carbonée (1 à 5 atomes de carbone).

A part l'alcoolyse, CpLIP2 peut aussi catalyser, en milieu aqueux contenant de l'hydroxylamine, l'aminolyse de l'ester méthylique d'acide gras ainsi que la réaction de condensation d'acides gras libres, aboutissant à la synthèse d'acides hydroxamiques (AH) gras très utiles pour de nombreuses applications [Vaysse *et al.*, 1997]. En effet, les AH, généralement synthétisés chimiquement en milieu fortement alcalin [Altenburger *et al.*, 1992a; Altenburger *et al.*, 1992b; Staszak and Doecke, 1994], présentent des propriétés chélatantes intéressantes et sont utilisés comme constituants de plusieurs composés, notamment des antibactériens, des fongicides, des facteurs de croissance, des drogues neurotoxiques anti-HIV, des drogues anti-malaria, des inhibiteurs d'enzymes, des facteurs de division cellulaire et des anti-cancéreux [Joshi *et al.*, 1999; Kurzak *et al.*, 1992; Lockhart *et al.*, 1995; Lockhart *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 2003; Tischler *et al.*, 2008; Tsafack *et al.*, 1996]. Les AH à longues chaines sont des chélatants hydrophobes intéressants pour de nombreuses applications notamment dans l'extraction et détermination des métaux [Agrawal *et al.*, 1999; Agrawal and Roshania, 1980; Agrawal and Sharma, 2007; Haron *et al.*, 2012a; Haron *et al.*, 2012b; Isha *et al.*, 2007; Sakai, 1963]. La synthèse enzymatique des AH gras a fait l'objet de plusieurs publications [Fournand *et al.*, 1997; Fournand *et al.*, 1998; Jahangirian *et al.*, 2011a; Jahangirian *et al.*, 2011b; Jahangirian *et al.*, 2011c; Servat *et al.*, 1990; Vaysse *et al.*, 1997]. De même, CpLIP2 s'est montrée capable de catalyser la N-acylation d'un dipeptide, la carnosine [Husson *et al.*, 2011].

CpLIP2 a également été étudiée dans le cadre de la synthèse de triglycérides structurés par interestérification d'huile de palme et d'huiles ou acides gras polyinsaturés pour la production de margarines ou de substituants de matière grasse du lait maternel [Osorio *et al.*, 2009a; Osorio *et al.*, 2009b; Tecelão *et al.*, 2010]. Ces réactions ont été effectuées dans un milieu sans solvant à une température de 60 °C en présence de CpLIP2 sous forme immobilisée.

3.2 La lipase/acyltransférase CaLIP4 de *Candida albicans*

3.2.1 Production de CaLIP4

La lipase/acyltransférase CaLIP4 a été décrite par Roustan *et al.* [2005]. Isolée parmi les 10 lipases de *C. albicans*, cette enzyme partage 60 % d'identité avec CpLIP2 sur sa séquence primaire constituée de 459 d'aminoacides (numéro d'accession gi/7769754). Le gène codant pour CaLIP4 a été cloné et surexprimé chez *S. cerevisiae* après remplacement du codon non standard CUG, qui code pour une sérine en position 159, en codon UCU universel pour la sérine. Sur gel SDS-PAGE, elle montre une masse moléculaire de 50 kDa, proche de celle de CpLIP2. Il faut noter que CaLIP4 est la même protéine que la lipase 4 de *C. albicans* (gi/68487419), que l'on trouve dans la superfamille de lipase A de *C. antarctica* de la base de donnée LED [Widmann *et al.*, 2010], malgré la différence entre les gènes qui codent pour les deux protéines. Aucune étude sur la structure 3D de CaLIP4 n'a été décrite.

3.2.2 Propriétés catalytiques

CaLIP4 est active sur une plage de pH allant de 5 à 9, plus alcaline que CpLIP2. L'optimum dépend cependant des conditions de réactions. En milieu aqueux contenant l'oléate d'éthyle et le méthanol comme substrats, l'enzyme montre la capacité de catalyser l'alcoolyse de manière intéressante. Le ratio de transestérification (rapport entre la vitesse initiale de formation d'ester et la vitesse totale de formation d'ester et d'acide gras) est bien supérieur à celui des lipases classiques, comme la lipase de *Pseudomonas fluorescens* et celle de *Mucor miehei*, mais reste néanmoins plus faible que celui de CpLIP2 (85 % pour CaLIP4

contre 95 % pour CpLIP2). La température et le pH optimum sont plus bas en alcoolyse qu'en hydrolyse (respectivement à 40 °C à pH 6,5 et 50 °C à pH 7,5).

CaLIP4 montre une stimulation importante de l'activité catalytique en présence d'alcool. A concentration égale, cette stimulation est plus importante lorsque la longueur de chaîne de l'alcool augmente. Par contre, la concentration en alcool permettant le maximum d'activité catalytique diminue avec la longueur de chaine de l'alcool ($C_{1\text{-propanol}} < C_{\text{éthanol}} < C_{\text{méthanol}}$). Par rapport à CpLIP2, cette enzyme présente une meilleure résistance aux concentrations élevées en alcool (50 % de l'activité sont préservés à 8,2 M de méthanol).

L'étude de la spécificité de substrat montre que l'activité de CaLIP4 est maximale pour les esters en C6 et C8 de p-nitrophényle et diminue continuellement lorsque la chaine de carbone augmente de C8 à C18. De plus, parmi des esters d'acides gras saturés mis en compétition dans le milieu réactionnel, l'enzyme montre une activité maximale vis-à-vis de la chaine en C16, suivie par C14 et C18. Par ailleurs, les esters d'acides gras insaturés sont de meilleurs substrats que les saturés.

3.3 Les diacylglycérol transacylases

La diacylglycérol transacylase (DGTA) est une enzyme originaire de tissus animaux ou de graines oléagineuses qui catalyse le transfert d'acyle entre deux 1,2(2,3)-diglycérides, formant ainsi un triglycéride et un 2-monoglycéride. Cette réaction enzymatique, indépendante de l'acyl-CoA, constitue une autre voie de formation des triacylglycérols [Lehner and Kuksis, 1996].

Lehner et Kuksis [1993] ont étudié la DGTA isolée de fractions microsomales d'intestin de rat. L'enzyme, de masse moléculaire 52 kDa sur gel SDS-PAGE, est régiospécifique vis-à-vis des positions sn-1 ou sn-3 des diglycérides. Seuls les (1,2)- et (2,3)-diglycérides sont substrats de la réaction de transestérification ; l'isomère 1,3-diglycéride n'est pas utilisé par l'enzyme, ni comme donneur ni comme accepteur d'acyle. La DGTA présente une activité *in vitro* très limitée vis-à-vis des triglycérides et de l'acyl-CoA. Les monoglycérides et la phosphatidylcholine ne sont pas ses substrats. L'activité de cette enzyme est inhibée par des réactifs agissant sur la sérine (le fluorure de phénylméthylsulfonyle et le diéthyl p-nitrophényl phosphate) et l'histidine (fluorure de sodium), ce qui indique un rôle possible de la sérine et

l'histidine dans la catalyse. Par rapport à la réaction dépendante de l'acyl-CoA catalysée par la DGAT (diacylglycérol acyltransférase), l'activité spécifique de la DGTA est néanmoins 7 fois plus faible [Lehner and Kuksis, 1996].

Chez les graines oléagineuses, cette réaction de transestérification fait partie d'un ensemble complexe de réactions enzymatiques, comme décrit par Lung et Weselake [Lung and Weselake, 2006], permettant la biosynthèse des triglycérides. En effet, la DGTA catalyse la réaction de transfert d'acyle entre deux diglycérides pour donner un monoglycéride et un triglycéride. Cette réaction est réversible. Dans les microsomes de cotylédons de carthame, son activité spécifique représente 25 % de l'activité de la DGAT dépendante de l'acyl-CoA [Stobart *et al.*, 1997]. Pourtant, certains auteurs soulignent le rôle plus important de la DGTA que la DGAT dans la biosynthèse des triglycérides [Fraser *et al.*, 2000].

3.4 Les glycérophospholipide acyltransférases (EC 2.3.1)

3.4.1 Lécithine-cholestérol acyltransférases (LCAT) animales

La lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT, EC 2.3.1.43) est surtout synthétisée dans le foie des mammifères ainsi que dans le cerveau, et en petite quantité dans le liquide cérébrospinal. Son rôle biologique au niveau du cerveau n'est pas bien défini. Dans le sang, cette acyltransférase, qui s'attache à des lipoprotéines de haute densité (HDL), convertit le cholestérol des tissus périphériques en ester correspondant, ce qui augmente le transfert du cholestérol à partir des tissus périphériques au HDL et donc vers le foie [Jonas, 2000]. Cette réaction de catalyse est activée par un des constituants de la HDL, l'apoprotéine A-I (apo-AI). De ce fait, les études sur la LCAT concernent en général les aspects thérapeutiques de la déficience en LCAT ou de la baisse de son activité [Nakhjavani *et al.*, 2013; Roshan *et al.*, 2011; Shoji *et al.*, 2011; Strom *et al.*, 2011] ainsi que la structure/fonction des apoprotéines [Alexander *et al.*, 2005; Carlucci *et al.*, 2012; Duka *et al.*, 2013; Frank and Marcel, 2000]. A part les LCAT de mammifères, la LCAT de poule, ayant 73 % d'identité avec la LCAT humaine, est aussi connue pour ses fonctions biologiques identiques [Hengstschlager-Ottnad *et al.*, 1995]. Cette dernière est en plus responsable d'un transport unique du cholestérol vers les ovaires permettant le développement normal des oocytes.

3.4.1.1 Propriétés catalytiques

La nature des lipoprotéines s'attachant à la LCAT ainsi que celle de ses substrats modifient le comportement catalytique de cette enzyme. En effet, à la surface des HDL elle catalyse le transfert de l'acyle en position sn-2 de la phosphatidylcholine vers le cholestérol produisant ainsi un ester de cholestérol et une lysophosphatidylcholine. En absence de cholestérol, le transfert de l'acyle se fait vers l'eau (hydrolyse), l'enzyme se comporte alors comme une phospholipase. Ces deux réactions nécessitent dans tout les cas l'apo-AI comme activateur de l'interaction entre l'enzyme et l'interface lipidique [Jonas, 2000; Kitabatake *et al.*, 1979]. Cependant, la LCAT peut se comporter comme une acyltransférase d'isolecithine (LAT) catalysant la synthèse de phosphatidylcholine à partir de lysophosphatidylcholine et d'une autre phosphatidylcholine à la surface des lipoprotéines à faible densité (LDL). Dans ce cas, la réaction est activée par la LDL et plus précisément par l'apoprotéine B contenue dans la LDL alors que l'apo-AI, qui présente aussi dans la LDL, n'est pas exigée [Liu *et al.*, 1992; Subbaiah, 1982; Subbaiah *et al.*, 1980; Subbaiah *et al.*, 1990]. En effet, la suppression de l'apo-AI de la LDL n'a pas d'influence sur l'activité LAT de l'enzyme et la LDL ne peut pas être substituée par l'apo-AI [Subbaiah *et al.*, 1982]. Par contre, l'activité LCAT est stimulée de 30 à 80 % après addition de la LDL [Subbaiah *et al.*, 1990]. La modification chimique ou enzymatique de la LDL a un grand impact sur l'activité LAT [Subbaiah *et al.*, 1985]. En effet, la suppression de tous les lipides de la LDL engendre une perte totale de l'activité catalytique de l'enzyme.

Par ailleurs, la LCAT catalyse aussi l'hydrolyse et la transestérification d'esters à courte chaîne solubles dans l'eau sans avoir besoin d'interface ni d'apoprotéines [Bonelli and Jonas, 1989]. De la même manière, les réactions catalytiques indépendantes de l'apo-AI sont aussi observées dans le métabolisme des facteurs d'activation des plaquettes sanguines (FAP ; 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine). En effet, la LCAT catalyse l'hydrolyse du FAP pour libérer une molécule de lyso-FAP et une molécule d'acétate, ou même le transfert du groupement acétyle du FAP vers une lysophosphatidylcholine sans avoir besoin d'activateur [Liu and Subbaiah, 1994].

A part le cholestérol, qui est l'accepteur d'acyles favori de la LCAT, d'autres stérols sont potentiellement leurs substrats [Jonas, 2000]. En présence d'alcools aliphatiques gras, surtout à longues chaines de carbone (C16), l'enzyme aussi peut catalyser le transfert d'acyles [Kitabatake *et al.*, 1979]. Cependant, le niveau de l'activité de transestérification est plus

faible que celui de l'hydrolyse, ce qui montre que les alcools aliphatiques gras sont des accepteurs d'acyles moins compétitifs que l'eau.

L'enzyme a un ordre de préférence décroissant vis-à-vis de la phosphatidyléthanol-amine, de la phosphatidylcholine et du phosphatidylglycérol. La phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique, les triglycérides et les diglycérides ne sont pas donneurs d'acyles ou, si c'est le cas, sont très peu réactifs [Pownall *et al.*, 1985]. Par ailleurs, bien que l'enzyme soit spécifique vis-à-vis de la position sn-2 de substrat lipidique, la présence d'un groupement acyle saturé à cette position peut inhiber l'activité ou même altérer cette spécificité de position. En effet, Subbaiah *et al.* [2004] ont montré que la formation d'ester de cholestérol insaturé à partir de substrat disposant d'une chaine acyle non saturée en position sn-2 est plus limitée qu'escompté. Cette diminution est due au fait que l'enzyme catalyse en partie le transfert du groupement acyle saturé de la position sn-1 (ou sn-3) pour former l'ester de cholestérol saturé.

3.4.1.2 Structure

Sur gel SDS-PAGE, la LCAT humaine montre une masse moléculaire de 65-69 kDa, ou de 49 kDa après déglycosylation. Sa séquence protéique est constituée de 440 acides aminés dont 24 résidus de peptide signal [Mclean *et al.*, 1986]. Cette enzyme partage une homologie très faible avec les lipases/estérases bien qu'elle ait un motif GXSXG dans lequel se situe la sérine catalytique. L'alignement de séquence avec une bibliothèque de structures tridimensionnelles résolues a permis de prédire, selon l'approche de threading, le repliement de la LCAT [Peelman *et al.*, 1998]. En effet, cette dernière obéit à l'architecture commune des α/β hydrolases. Sa machinerie catalytique se compose d'une triade catalytique constituée de trois résidus (S181, D345, His377) ainsi que d'un trou à oxyanion de deux résidus (F103, L182). La structure 3D a été ensuite établie en utilisant la lipase pancréatique humaine et la lipase B de *C. antarctica* comme modèles, ce qui a permis d'identifier le domaine potentiel du chapeau sur les résidus 50-74 qui participent à l'interaction enzyme-substrat. En effet, la suppression de ce domaine rend la protéine inactive. La modification de W61 en F, L ou G résulte en un changement considérable de l'activité spécifique de l'enzyme vis-à-vis divers substrats testés. En plus, la LCAT a deux ponts disulfures impliquant quatre cystéines (C50, C74, C313 et C356) et peut être inactivée par l'action des agents inhibiteurs de groupements sulfhydryles. Les deux autres cystéines (C31 et C184) n'interviennent pas dans le mécanisme

catalytique de l'enzyme car leur modification par mutagenèse dirigée n'entraîne pas de perte d'activité ni de diminution de la sécrétion de l'enzyme.

3.4.2 Glycérophospholipide-cholestérol acyltransférases (GCAT) bactériennes

Plusieurs microorganismes comme *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* [Owens, 1974] et surtout *Aeromonas hydrophila* et *A. salmonicida,* de la famille des *Vibrio*, sécrètent la glycérophospholipide-cholestérol acyltransférase (GCAT ; EC 2.3.1.43), également appelée lipase/acyltransférase [Buckley *et al.*, 1982; MacIntyre and Buckley, 1978; MacIntyre *et al.*, 1979]. Du fait que ces microorganismes sont nuisibles, l'étude de la GCAT portait sur le fait que cette enzyme exocellulaire dégrade les cellules eucaryotes. Pourtant, grâce à ses particularités enzymatiques en milieu aqueux ainsi qu'à ses propriétés intéressantes liées à la stabilité et à la production et purification, la GCAT peut permettre des applications industrielles [de Kreij *et al.*, 2004; de Kreij *et al.*, 2010]. En effet, l'utilisation de la GCAT d'*Aeromonas* dans l'agroalimentaire réside sur sa capacité à catalyser la formation d'émulsifiants thermorésistants, notamment la lysolécithine à partir de la lécithine contenu dans le jaune d'œuf, utilisée à titre d'exemple dans la préparation de mayonnaise ou de gâteaux [de Kreij *et al.*, 2010]. L'utilisation de cette enzyme est intéressante du fait que la formation des acides gras due à l'hydrolyse est limitée. Par la suite, nous ne présentons particulièrement que la GCAT d'*A. hydrophila* et celle d'*A. salmonicida*, qui sont les plus étudiées. Notons cependant que les études sur la GCAT issue de certaines d'autres espèces comme *Legionella* portent encore sur le domaine de la thérapie [Lang *et al.*, 2012].

3.4.2.1 Production

Les GCAT d'*A. hydrophila* ou d'*A. salmonicida* sont généralement sécrétées sous forme complexée avec des liposaccharides dans le surnagent de culture [Lee and Ellis, 1990; MacIntyre and Buckley, 1978; MacIntyre *et al.*, 1979]. Après purification, la GCAT d'*A. salmonicida* montre une bande protéique de masse moléculaire d'environ 24 kDa sur gel SDS-PAGE [Buckley *et al.*, 1982]. Le gène (X07279) codant pour la GCAT de *A. hydrophila* a par ailleurs été isolé, cloné et finalement exprimé dans *E. coli* et *A. salmonicida*. La protéine

exprimée a une masse moléculaire de 31,1 ou 36 kDa [Hilton *et al.*, 1990; Thornton *et al.*, 1988]. L'expression hétérologue de cette protéine dans d'autres organismes, notamment *Bacilus subtilis,* a été également rapportée [de Kreij *et al.*, 2010].

3.4.2.2 Propriétés catalytiques

Active sur une plage de pH allant de 6 à 8,9, la GCAT est considérée comme un homologue de la LCAT (lécithine-cholestérol acyltransférase, EC 2.3.1.43) car elle partage beaucoup de propriétés avec cette dernière [Buckley *et al.*, 1982] : 1) elle catalyse le transfert d'acyle de la position sn-2 d'un phospholipide vers le cholestérol ainsi que vers l'eau (réaction d'hydrolyse) en absence de l'accepteur d'acyle ; 2) la présence d'ions divalents n'est pas exigée, ce qui distingue la GCAT (ainsi que la LCAT) des phospholipases ; 3) son activité est stimulée par la présence de l'apoprotéine A-I et de l'albumine. Contrairement à la LCAT, la GCAT n'est cependant pas dépendante de l'aporoptéine A-I pour pouvoir fonctionner. Par ailleurs, elle n'est pas sensible à des agents inhibiteurs de groupements sulfhydriques. En plus, la GCAT est capable d'utiliser tout phospholipide naturel comme donneur d'acyle. Concrètement, en présence de la membrane érythrocytaire humaine, qui contient les phospholipides et le cholestérol [Ballas and Krasnow, 1980], la GCAT catalyse deux réactions en même temps : la synthèse de l'ester de cholestérol en tant qu'acyltransférase ainsi que la libération de l'acide gras et du phosphate hydrosoluble en tant que phospholipase [MacIntyre and Buckley, 1978; MacIntyre *et al.*, 1979]. La réaction catalytique dépend surtout du degré d'insaturation ou de longueur de la chaine d'acyle plutôt que de la nature du groupement de phospholipides. Autrement dit, l'enzyme présente une nette préférence pour les phospholipides ayant un groupement d'acyle insaturé ou à courte chaîne carbonée (10 à 12 atomes de carbone) [Buckley, 1982].

Buckley et ses collègues ont montré que la GCAT était une enzyme spécifique vis-à-vis de la position sn-2 de la phosphatidylcholine tant pour la réaction d'hydrolyse que pour le transfert [Buckley *et al.*, 1982]. La configuration L est absolument exigée pour cette position sn-2 [Robertson *et al.*, 1992]. En position 1, la réaction de transfert ne peut pas être catalysée, mais l'hydrolyse de L-phosphatidylcholine est possible. De plus, contrairement aux phospholipases, elle est capable de catalyser l'hydrolyse des diglycérides, ce qui montre que cette enzyme n'est pas spécifique au groupement phosphate du phospholipide. Par ailleurs, les lysophospholipides peuvent aussi être hydrolysés en présence de cette enzyme.

Cette enzyme a une large gamme d'accepteurs d'acyles allant des alcools aliphatiques, notamment le 1-décanol, aux stéroïdes [Buckley, 1982]. Le cholestérol est son accepteur d'acyle préféré. Les substrats de stéroïdes sont uniquement ceux qui, comme le cholestérol, ont une jonction de type *trans* entre les cycles A et B et un groupement hydroxyde en position β3. D'autres stéroïdes ne possédant pas cette conformation sont susceptibles d'être inhibiteurs de la réaction de transfert d'acyles.

3.4.2.3 Structure de la GCAT

La GCAT fait partie de la nouvelle sous-famille des lipases/estérases à sérine, connue actuellement étant comme la sous-famille GDSL (ou GDSLS). A part la GCAT, cette dernière regroupe les thioestérases, les protéases, les arylestérases et les lysophospholipases [Akoh *et al.*, 2004; Brick *et al.*, 1995; Upton and Buckley, 1995]. Le mécanisme catalytique de ce groupe d'enzymes est différent de celui des lipases. En effet, ces enzymes n'ont pas de coude nucléophile. Leur site actif est flexible et peut changer de conformation suite à la présence ou l'attachement de différents substrats. Le motif GDSLS qui héberge la sérine catalytique (la première S) se trouve au début de la séquence alors que son équivalent chez les lipases microbiennes, le pentapeptide du coude nucléophile GXSXG, est presque au milieu de la séquence. La formation du coude nucléophile n'est en effet possible que si les acides aminés en position -2 et +2 par rapport à la sérine catalytique sont de faible encombrement stérique [Schrag and Cygler, 1997], ce qui est le cas pour les lipases. Ainsi la présence de la deuxième sérine sur le motif GDSLS de la GCAT ne semble pas influencer la formation de coude nucléophile car cet aminoacide est aussi petit que la glycine. Pourtant, la sérine est plus polaire que la glycine, ce qui fait que le degré de polarité des alentours de la sérine catalytique de la GCAT est différent de celui de la lipase. En plus, cette deuxième sérine est nécessaire pour l'activité catalytique de la GCAT car le remplacement de celle-ci par la glycine dans le but d'obtenir le motif des lipases résulte en une réduction de la sécrétion de l'enzyme et une perte totale de son activité [Robertson *et al.*, 1994].

La séquence protéique de la GCAT d'*A. hydrophila* (gi/118572649) est constitué de 335 acides aminés y compris 18 premiers aminoacides du peptide signal. Elle contient cinq blocs de séquences I, II, III, IV et V hautement conservés chez toutes les enzymes de la sous-famille GDSL. Comme les lipases, la GCAT possède la triade catalytique constituée des résidus Ser16, Asp116 et His291 situés respectivement dans les trois blocs I, III et V [Brumlik and

Buckley, 1996; Upton and Buckley, 1995]. Le remplacement de l'histidine ou de l'acide aspartique par l'asparagine résulte en l'inactivité des protéines issues des mutants correspondants. Contrairement au mutant H291N qui sécrète l'enzyme dans le surnageant à peu près dans les mêmes quantités que la souche non mutée, le mutant D116N sécrète peu de protéine. Cette altération de la sécrétion protéique est observée également chez les mutants dont les modifications se font autour de la sérine catalytique positionnée du côté N-terminal de la protéine [Robertson *et al.*, 1994]. En outre, certaines modifications sont responsables de la régiospécificité de l'enzyme telles la mutation Y230F qui donne une enzyme n'étant plus spécifique à la position sn-2 du phopholipide.

Contrairement au cas observé chez CpLIP2, seulement un pont disulfure formé par deux résidus cystéines a été observé chez les GCAT d'*A. hydrophila* et d'*A. salmonicida*. Ce pont disulfure joue un rôle dans la stabilité de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, mais pas sur son activité. En effet, l'altération de celui-ci ne conduit pas à l'inactivation de l'enzyme mais à l'augmentation de sa sensibilité aux protéases, et donc à une dégradation plus rapide même à l'intérieur des cellules [Brumlik *et al.*, 1997; Hilton *et al.*, 1990].

3.4.3 Phospholipide-diacylglycérol acyltransférases (PDAT) végétales et fongiques

La glycérophospholipide-diacylglycérol acyltransférase (PDAT ; E.C. 2.3.1.158) catalyse le transfert du groupement acyle de la position sn-2 d'un phospholipide vers un diglycéride, formant ainsi un triglycéride et un lysophospholipide. Ce transfert est indépendant de l'acyl-CoA. La PDAT, considérée comme étant une homologue de la LCAT des mammifères, a été identifiée dans les graines de certaines plantes et dans certaines levures [Dahlqvist *et al.*, 2000; Mhaske *et al.*, 2005].

In vivo, cette enzyme participerait à l'accumulation d'une quantité importante d'acides gras hydroxylés inhabituels (acide ricinoléique, acide vernoléique) observée dans certaines graines oléagineuses. En effet, ces acides gras essentiellement présents dans les triglycérides sont synthétisés par le transfert sélectif des groupements acyles en position sn-2 de la phosphatidylcholine [Banas *et al.*, 2000; Dahlqvist *et al.*, 2000].

L'étude *in vitro* de la spécificité de substrat des PDAT issues de trois espèces de graines oléagineuses (tournesol, graines de ricin et *Crepis palaestina*) a montré que la nature du groupement acyle préféré du phopholipide varie selon les espèces des plantes [Dahlqvist *et al.*, 2000]. Chez les levures, la spécificité de substrat dépend de la tête polaire du donneur d'acyle, du groupement acyle transféré et des chaines acyles présentes sur les DAG accepteurs.

3.5 Mécanisme d'action des lipases/acyltransférases et de leurs homologues

Dergunov [2012] a rapporté un modèle de mécanisme décrivant l'activité catalytique de la LCAT en présence de la HDL discoïdale et des substrats palmitoyl-oléoyl-phosphatidylcholine (POPC) et cholestérol. Cette réaction de transfert se déroule à l'interface eau/lipide et se décompose en trois étapes, qui impliquent la pénétration de l'enzyme à l'interface, la formation de l'acyl-enzyme et la compétition entre l'alcool et l'eau lors de l'étape de déacylation. Le modèle montre que l'augmentation de la concentration en alcool résulte en la diminution de la constants de dissociation interfaciale (K_d^*) pour la pénétration de la LCAT alors que la constante de Michaelis interfaciale (K_m^*) reste stable. Lorsque la concentration en lipide augmente, K_d^* augmente alors K_m^* diminue. L'application de ce modèle aux autres acyltransférases n'a cependant pas été étudiée.

4 CONCLUSION

Nous avons vu au cours de cette synthèse bibliographique l'intérêt des lipases pour des applications de modification industrielle des matières grasses. En effet, les lipases présentent des propriétés de catalyse intéressantes, au-delà de la diversité et de la simplicité souvent liées à la production des enzymes microbiennes. Ces caractéristiques confèrent aux lipases des avantages toujours croissants pour des applications industrielles notamment dans l'agroalimentaire, la diététique, la pharmaceutique, l'oléochimie et la chimie fine. Au-delà des propriétés naturelles des lipases, les outils de génie génétique et de bioinformatique permettent d'améliorer ou modifier à façon leurs propriétés pour répondre aux besoins spécifiques d'utilisation.

Une des principales modifications industrielles des huiles, la transestérification (transformation d'un ester en un autre ester), peut être réalisée en présence de lipases classiques mais généralement en milieux micro-aqueux avec un contrôle strict de l'activité thermodynamique de l'eau. Cependant, les lipases/acyltransférases permettent de mettre en place cette transformation même en présence d'eau, sans avoir besoin de contrôler l'a_w ni d'utiliser des solvants organiques du fait qu'elles catalysent préférentiellement le transfert d'acyle au profit des accepteurs nucléophiles autres que l'eau. Ces enzymes offrent alors encore plus d'avantages tant sur le plan des procédés de transformation que sur l'environnement.

Les lipases/acyltransférases constituent une famille particulière d'enzymes qui présentent une spécificité de réaction intermédiaire entre les lipases et les acyltransférases. Les lipases/acyltransférases identifiées à ce jour, notamment l'enzyme CpLIP2 de *C. parapsilosis*, font partie de la famille « *C. antarctica* lipase A-like », CaLA étant la seule lipase de cette famille à l'heure actuelle dont la structure 3D a été résolue. Il faut noter que cette dernière a cependant un comportement de lipase et non de lipase/acyltransférase. Sur la base de la structure de CaLA, la structure 3D de la lipases/acyltransférase CpLIP2 (31 % d'identité avec CaLA), a été modélisée dans le but d'approfondir les connaissances sur la relation structure/fonction de cette enzyme.

Les travaux sur le mécanisme décrivant la réaction de synthèse d'esters par les lipases ont été beaucoup réalisés en condition micro-aqueuse, et ce en rapport avec leurs propriétés catalytiques. Dans cette condition, la présence d'eau dans le milieu réactionnel est négligée,

ce qui revient à dire que l'eau joue le rôle uniquement de lubrifiant servant à maintenir l'intégrité structurelle de l'enzyme. Or, dans le cas des lipases/acyltransférases, qui fonctionnent en condition macro-aqueuse (a_w>0,9), la compétition entre l'eau et l'alcool doit être prise en compte. Dans ce cas, des modèles de mécanismes tels que celui proposé par Dergunov pour la LCAT (lécithine-cholestérol acyltransférase) pourraient contribuer à une meilleure compréhension de leur comportement.

Nous avons vu divers homologues fonctionnels des lipases/acyltransférases qui ont des propriétés similaires (catalysent la réaction de transfert d'acyle indépendamment de l'acyl-CoA), mais sont classés comme acyltransférases ou transacylases. Ces enzymes sont issues de sources diverses, notamment les microorganismes, les plantes et les mammifères. De nombreux travaux portent essentiellement sur leur rôle métabolique ou thérapeutique. Néanmoins, nous avons pu voir que les glycérophospholipide-cholestérol acyltransférases (GCAT) d'*Aeromonas* ont également été identifiées au cours des dernières années comme présentant un intérêt pour des applications industrielles en agro-alimentaires grâce à leurs propriétés catalytiques de stabilité et la simplicité liée à leur production.

MATERIEL ET METHODES

1 MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1 Souches de bactéries

Après avoir été rendue compétente selon la méthode précédemment décrite [Inoue *et al.*, 1990], la souche d'*Escherichia coli* « Epicurian coli XL1-Blue MRF' » (Strategene, La Jolla, CA, USA) de génotype: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] est utilisée pour le sous-clonage et l'amplification d'ADN plasmidique.

1.2 Souches de levure

La souche de *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen) est utilisée pour la transformation et l'expression des protéines hétérologues.

Les souches sauvages de levures (ou de champignons) utilisées pour l'étude de production et caractérisation des lipases sont des souches de collection du Centraal Bureau vor Schimmelcultures (CBS, Delft, Pays-Bas) conservées à -80 °C après avoir été préparées selon la méthode décrite dans le paragraphe 4 (Tableau 1), sauf pour la souche S1 qui a dû être maintenue sur gélose inclinée à +4 °C. Les souches S11CL et S11CNL ont été isolées à partir d'une aliquote de culture de la même souche S11 (*Pseudozyma antarctica*, CBS 516.83) conservé à -80 °C. Ces deux souches se distinguent par des colonies aux aspects différents (CL : « colonie lisse » et CNL : « colonie non lisse »).

2 PRODUITS CHIMIQUES

Sauf précision autre, tous les produits et réactifs proviennent de Sigma-Aldrich et sont de qualité analytique.

Tableau 1 : Liste des souches de levures étudiées

No	Abré.	Espèce	Souche	No	Abré.	Espèce	Souche
1	S0	*Candida parapsilosis*	CBS 604	**11**	S10	*Issatchenkia orientalis*	CBS 5147
2	S1	*C. parapsilosis*	CBS 1954	**12**	S11CNL	*Pseudozyma antarctica (colonie rugueuse)*	CBS 516.83
3	S2	*C. parapsilosis*	CBS 2215	**13**	S11CL	*Ps. antarctica (colonie lisse)*	CBS 516.83
4	S3	*C. glabrata*	CBS 138	**14**	S12	*Pichia guilliermondii*	CBS 2030
5	S4	*C. viswanathii*	CBS 4024	**15**	S13	*P. guilliermondii*	CBS 6557
6	S5	*C. saitoana*	CBS 940	**16**	S14	*C. fermentati*	CBS 6319
7	S6	*C. maltosa*	CBS 5611	**17**	S15	*C. fermentati*	CBS 5289 s
8	S7	*Rhodotorula araucariae*	CBS 6031	**18**	S16	*P. guilliermondii*	CBS 7099
9	S8	*Rh. mucilaginosa*	CBS 17	**19**	S17	*Lipomyces starkeyi*	CBS 1807
10	S9	*Kluyveromyces marxianus*	CBS 712				

3 MILIEUX DE CULTURE

3.1 Milieu YPD

Le milieu YPD est un milieu riche constitué de 1 % de glucose, 2 % de peptone et 2 % d'extrait de levure (p/v). Ce milieu est stérilisé par autoclavage (20 min, 121 °C).

Pour avoir un milieu solide (gélosé), 1,5 % (p/v) d'agar sont additionnés au milieu YPD liquide. Après l'autoclavage, le milieu est laissé à refroidir (à 50 °C) avant d'être coulé dans des boites de Petri.

3.2 Milieu YPD tamponné

Le milieu YPD est tamponné à pH 6,5 avec 50 mM de sel phosphate mono-potassique et di-potassique (KH_2PO_4/K_2HPO_4).

3.3 Milieu YPD + Zéocine

Pour la sélection des clones de *P. pastoris* X33 transformés avec les vecteurs pPICZαB, de la zéocine (Invitrogen) filtrée sur membrane Millipore GS (0,22 µm) est ajoutée à différentes concentrations (0,01 – 0,02 – 0,05 – 0,1 – 0,2 % ; p/v) au milieu YPD autoclavé et refroidi. La résistance des clones à des concentrations croissantes est théoriquement proportionnelle au nombre de copies du gène d'intérêt.

3.4 Milieu YPDS + Zéocine solide

Ce milieu est utilisé pour cribler les clones positifs de *P. pastoris* X33 après transformation avec les vecteurs pPICZαB. La composition de ce milieu est identique à celle du milieu YPD + Zéocine à 0,01 % (p/v) solide auquel est ajouté 1 M de sorbitol.

3.5 Milieu LB + Zéocine

Ce milieu est utilisé pour la culture des clones *E. coli* XL1-Blue MRF' issus du sous-clonage avec les vecteurs pPICZαB. Il contient 1 % de bacto tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 0,5 % de chlorure de sodium et $2{,}5.10^{-3}$ % de zéocine (p/v). Le pH de ce milieu est ajusté à 7,5. Pour un milieu solide, 1,5 % (p/v) d'agar sont ajoutés au milieu avant autoclavage. La solution de zéocine est stérilisée par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 µm) et ajoutée au milieu pré-stérilisé par autoclavage (121 °C ; 20 min) lorsque celui-ci est refroidi à 50 °C.

3.6 Milieu SOC

Ce milieu est composé de 2 % (p/v) de bacto-tryptone, 0,5 % (p/v) de bacto-extrait de levure, 0,05 % (p/v) de NaCl, 2 % (p/v) de glucose, 10 mM de $MgCl_2$ et 10 mM de $MgSO_4$. Les 3 premiers composés sont autoclavés 20 min à 121 °C avant d'être mélangés avec les solutions de 3 derniers composés, préliminairement stérilisées par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 µm). Le milieu est finalement aliquoté dans des tubes stériles et conservé au congélateur à -20 °C.

3.7 Milieu YPDH

Le milieu YPDH est un milieu YPD additionné de 1 % (p/v) d'huile de colza. Il est utilisé pour étudier les conditions de production de lipases par les souches sauvages de levures testées.

3.8 Milieu YNBH

Ce milieu synthétique est utilisé pour la production de lipases par les souches sauvages. Tamponné à pH 6,5 avec 50 mM de KH_2PO_4/K_2HPO_4, il se compose de différentes concentrations en glucose et en d'huile de colza, 1,34 % de YNB (Yeast Nitrogen Base) et

$0{,}04.10^{-6}$ % de D-biotine (p/v). Les substrats carbonés (glucose et/ou huile) et le tampon sont autoclavés 20 min à 121 °C alors que les solutions de YNB et de D-biotine sont stérilisées par filtration sur membrane (Millipore 0,22 µm type GS). Selon la teneur en substrats carbonés (x % glucose et y % huile de colza), 4 milieux YNBH liquides ont été utilisés : YNBH0 (x=1 % ; y=0 %), YNBH1 (x=0,9 % ; y=0,05 %), YNBH2 (x= 0,1 %; y=0,45 %) et YNBH3 (x=0 %; y=0,5 %).

Pour les cultures en fioles d'Erlenmeyer, la somme x + 2y est ainsi maintenue à 1 % (p/v) (ou à 10 $g.L^{-1}$) afin d'assurer une production de biomasse cellulaire constante (~ 5 $g.L^{-1}$).

Pour les précultures dédiées à la production de lipases en fermenteur, x et y sont doublés en même temps que la teneur en D-biotine. Dans ce cas, le tampon phosphate est remplacé par le tampon tartrate ($C_4H_6O_6$ /Na_2HPO_4) 50 mM pH 5,4. Pour la culture en fermenteur, le milieu est identique à celui des précultures, sauf que le tampon tartrate est remplacé par une régulation automatique du pH à une valeur de consigne de 5,4 par ajout d'une solution NaOH 2 M.

3.9 Milieu synthétique pour les transformants de *P. pastoris*

Ce milieu synthétique est dédié à la culture des clones de *P. pastoris* X33 transformés avec les vecteurs pPICZαB. Cette culture se déroule en deux parties :

1) Une succession de 3 batch pour lesquels le milieu est constitué de :
   - glycérol (4 % (p/v) autoclavé dans le fermenteur 30 min à 121 °C
   - sels minéraux : solution FM21 (0,5 % H_3PO_4; 0,24 % K_2SO_4; 0,012 % $CaSO_4$; 0,095 % $MgSO_4$; 0,065 % KOH ; (p/v)) préparée concentrée 10 fois et autoclavée 20 min à 121 °C
   - d'oligo-éléments : solution PTM1 ($0{,}002.10^{-3}$ % H_3BO_4; $0{,}38.10^{-3}$ % $CuSO_4$; $0{,}01.10^{-3}$ % KI; $0{,}27.10^{-3}$ % $MnSO_4$; $0{,}017.10^{-3}$ % Na_2MoO_4; 2.10^{-3} % $ZnCl_2$; $3{,}5.10^{-3}$ % $FeSO_4$; $3{,}5.10^{-3}$ % H_2SO_4 ; (p/v) préparée concentrée 100 fois et stérilisée par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 µm)
   - de D-biotine à 8.10^{-6} % (p/v) stérilisée par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 µm).

Au cours de la culture, de l'azote est apporté au milieu par addition contrôlée d'ammoniaque à 16 % (v/v). Cet apport régule ainsi le pH (à 4,5 ou 5). Après épuisement des premiers 4 % (p/v) de glycérol, 4% (p/v) de cette source de carbone et d'énergie sont ajoutés, cette opération étant ensuite renouvelée une troisième fois.

2) Une culture en mode fed-batch sur méthanol comme source de carbone qui permet l'induction de l'expression de la protéine. Pour cela, la culture est alimentée avec une solution composée de méthanol (78 % (p/v)), d'oligo-éléments (PTM1 5X) et de D-biotine (100.10^{-6} % (p/v)) avec un débit variable régulé qui permet de fixer le taux de croissance à 0,01 h^{-1}.

Pour ensemencer ce milieu, des précultures en fioles d'Erlenmeyer sont réalisées sur le même milieu que pour la culture batch sur glycérol, qui en plus est tamponné à pH 5,4 par 50 mM de tampon tartrate et contient des sources d'azote (12 % $NH_4H_2PO_4$ et 4 % $SO_4(NH_4)_2$; p/v : solution de FM21+N).

3.10 Milieu G liquide

Le milieu G se prépare à partir de plusieurs solutions séparées et le mélange final est réalisé juste avant utilisation. Tamponné à pH 6,5 avec 400 mM de KH_2PO_4/K_2HPO_4, ce milieu contient :

- Substrat carboné (huile de colza) 2 % (p/v)
- Sels minéraux

$(NH_4)H_2PO_4$	0,6 %
$(NH_4)_2SO_4$	0,2 %
KH_2PO_4	0,1 %
NaCl	0,01 %
$CaCl_2,2H_2O$	0,01 %
$MgSO_4,7H_2O$	0,05 %

- Oligo-éléments

H_3BO_4	50.10^{-6} %
$CuSO_4$, $5H_2O$	4.10^{-6} %
KI	10.10^{-6} %
$MnSO_4$, H_2O	40.10^{-6} %
Na_2MoO_4 ($2H_2O$)	20.10^{-6} %
$ZnSO_4$ ($7H_2O$)	40.10^{-6} %

- Solution de Fer

$FeCl_3$,$6H_2O$	20.10^{-6} %

- Vitamines

Pantothénate Ca	200.10^{-6} %
Thyamine (B1)	200.10^{-6} %
Myo-inositol	200.10^{-6} %
Pyridoxine (B6)	200.10^{-6} %
Ac. Nicotinique (PP)	50.10^{-6} %
Biotine	2.10^{-6} % (p/v)

Les solutions de substrat carboné, de sels minéraux ainsi que le tampon sont autoclavés 20 min à 121 °C. Les autres solutions sont stérilisées par filtration sur membrane (Millipore 0,22 µm type GS, diamètre 45 mm).

3.11 Milieu YNB + Rhodamine B

Basé sur la méthode décrite par Kouker et Jaeger [1987], ce milieu sélectif permet de mettre en évidence l'activité d'hydrolyse (lipase) produite par les souches ou clones étudiés. En effet la formation d'un complexe entre la rhodamine B et les produits de dégradation enzymatique (acide gras libres) du substrat (huile de colza, trioléine ou oléate d'éthyle) dans le milieu, donne un halo rouge fluorescent autour des colonies sécrétant une lipase active.

Tamponné à pH 6,5 par 50 mM de KH_2PO_4/K_2HPO_4, il est constitué de 0,5 % substrat carboné (huile de colza, trioléine ou oléate d'éthyle), 2 % Bacto Agar, 1,34 % YNB, 0,001 % Rhodamine B et $0{,}04.10^{-6}$ % D-biotine (p/v). L'addition de 0,5 % (v/v) de méthanol est nécessaire pour le criblage des clones de *P. pastoris* X33 transformés avec les vecteurs pPICZαB et dont l'expression de la protéine hétérologue est sous contrôle du promoteur AOX1.

Le tampon, le substrat et l'agar sont autoclavés 20 min à 121 °C alors que les solutions de YNB, de rhodamine B, de biotine et de méthanol sont stérilisées par filtration sur membrane (Millipore 0,22 µm type GS ou type GV pour le méthanol). Lorsque la température du milieu autoclavé descend à 50 °C, les solutions filtrées y sont ajoutées. L'ensemble est alors émulsifié par un agitateur de type Ultra-Turrax (10^4 tr.min^{-1}, Janke & Kunkel) pendant 30 sec avant d'être coulé rapidement dans les boîtes de Petri.

3.12 Milieu G + Rhodamine B

Ce milieu sélectif se base sur le même principe que le milieu YNB + Rhodamine B. Ce milieu est tamponné à pH 6,5 par 50 mM de KH_2PO_4/K_2HPO_4. Sa composition en sels minéraux, en oligo-éléments, en fer et en vitamines est identique que celle du milieu G liquide (cf. § 3.10). Le substrat carboné (huile de colza), l'agar et la rhodamine B sont ajoutés à 0,5 %, 2 % et 1.10^{-3} % (p/v), respectivement. Il contient en plus 0,5 % (v/v) de méthanol si le milieu est destiné au criblage des clones de *P. pastoris* X33 transformés avec les vecteurs pPICZαB.

Le tampon, le substrat, l'agar et les minéraux sont autoclavés 20 min à 121 °C alors que les solutions d'oligo-éléments, de fer, de vitamines et de rhodamine B sont stérilisées par

filtration sur membrane (Millipore 0,22 µm type GS ou type GV pour le méthanol). Lorsque la température du milieu autoclavé descend à 50 °C, les solutions filtrées y sont ajoutées. L'ensemble est alors émulsifié par un agitateur de type Ultra-Turrax (10^4 $tr.min^{-1}$, Janke & Kunkel) pendant 30 sec avant d'être coulé rapidement dans les boîtes de Petri.

4 PREPARATION ET CONSERVATION DES SOUCHES

A partir des aliquotes conservées à -80 °C, les souches provenant de la collection CBS sont tout d'abord cultivées dans 50 mL de milieu YPD liquide à 28 °C pendant 24 h. Puis, un isolement sur boite de Petri contenant du milieu YPD solide est réalisé à 28 °C pendant 2 à 3 jours. Cette étape permet de vérifier l'absence de contaminants et de sous-cloner la souche de levure. Pour cela, une colonie est prélevée à partir de la boîte de Petri pour ensemencer 50 mL de milieu YPD liquide mis en culture à 28 °C. Au bout de 24 h, 200 µL de milieu de culture sont mélangés avec un volume équivalent d'eau glycérolée à 40 % (p/v). Les souches ainsi préparées (Tableau 1) sont conservées à -80 °C.

5 CULTURE SUR MILIEU SELECTIF (YNB+RHODAMINE B OU G + RHODAMINE B)

Trois précultures (24 h, 28 °C, sous agitation) sont réalisées successivement dans des microplaques deepwell (VWR) de 2 mL contenant 250 µL de milieu YPD. Pour la première préculture, 50 µL de suspension de levure sont inoculés dans 200 µL de milieu YPD alors que l'ensemencement des deux dernières se fait à partir de 50 µL des premières précultures.

A partir de la troisième préculture, 5 µL sont déposés sur boites de milieux sélectifs. Ces dernières sont ensuite incubées à 28 °C pendant 2 ou 3 jours.

6 TECHNIQUES DE PRODUCTION D'ENZYMES

6.1 Culture dans les fioles d'Erlenmeyer (milieux YNBH) : souches sauvages

Trois précultures successives sont réalisées sur 3×24 h à 28 °C sous agitation à 80 oscillations par minute avec une amplitude de 7 cm. La première préculture est effectuée en ensemençant 20 mL de milieu YPD à partir de 100 µL de suspension glycérolée des souches conservées à -80 °C. De la même manière, les deux dernières sont réalisées dans les milieux YNBH liquide en ensemençant 20 mL de milieu YNBH à partir de 2 mL des premières précultures (cf. § 3.8).

La culture se fait dans des conditions identiques aux précultures. Pour cela, 20 mL de la dernière préculture sont utilisés pour ensemencer 200 mL des milieux YNBH. Au cours de la culture, 3 mL de milieu sont prélevés régulièrement puis préparés selon la méthode décrite dans le paragraphe § 6.3.1 afin de suivre la croissance cellulaire (mesure de DO à 600 nm) et la dégradation des composés lipidiques (analyse par CCM) ainsi que la sécrétion d'enzyme (dosage d'activité lipase dans le surnagent).

6.2 Culture dans les fermenteurs

Un fermenteur de 1 L avec 0,8 L de volume utile (Applikon, Pays-Bas) est utilisé pour réaliser des cultures à 28 °C. L'acquisition des données et le contrôle du débit des pompes d'alimentation sont effectués par le logiciel BioExpert (Applikon). Le pH et la teneur en oxygène du milieu sont contrôlés par un régulateur « Bio Controller » (Applikon). Le pH est mesuré à l'aide d'une sonde Ingold. La régulation du pH est faite par ajout d'ammoniaque 16 % (v/v) pour les transformants de *P. pastoris* ou de NaOH 2 M pour les souches sauvages grâce à une pompe Masterflex® pilotée par le Bio Controller. L'utilisation d'ammoniaque permet également d'apporter l'azote dans le milieu.

La teneur en oxygène dissous, exprimée en % de la saturation, est suivie par mesure polarographique à l'aide d'une sonde Ingold. Le débit d'aération est régulé par un débitmètre massique Brooks (de 0 à 5 volumes d'air insufflé par volume de milieu et par min, v.v.m). Le

transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide est assuré par l'intermédiaire de pales de type Rushton et de contre-pales fixes pour limiter l'effet vortex. Les pales sont mises en mouvement par un moteur Applikon à vitesse variable et contrôlée (de 0 à 2000 tour.min^{-1}). Les fermentations ont été réalisées avec un taux d'oxygénation supérieur à 30 %, maintenu manuellement en ajustant à la fois le débit d'aération et la vitesse de rotation des pales.

6.2.1 Production d'enzymes par les souches sauvages

Trois précultures de 24 h sont réalisées à 28 °C sous agitation. Pour la première préculture, 100 µL de suspension cellulaire sont inoculés dans 10 mL de milieu YPD. Pour la deuxième, 1 mL de la première préculture sont inoculés dans 9 mL de milieu YNBH (cf. § 3.8) tamponné à pH 5,4 par 50 mM de tampon tartrate. Pour la troisième, 10 mL de la deuxième préculture sont inoculés dans 90 mL du même milieu synthétique.

A partir de la troisième préculture, un milieu de culture YNBH est ensuite ensemencé et la culture est ainsi réalisée à 28 °C à pH 5.

6.2.2 Production d'enzyme par les transformants de *P. pastoris*

Trois précultures de 24 h sont réalisées à 28 °C sous agitation. Pour la première préculture, 100 µL de suspension cellulaire sont inoculés dans 10 mL de milieu YPD. Pour la deuxième, 1 mL de la première préculture sont inoculés dans 9 mL de milieu synthétique tamponné (cf. § 3.9). Pour la troisième, 10 mL de la deuxième préculture sont inoculés dans 90 mL du même milieu synthétique.

Pour la fermentation, 400 mL de milieu synthétique (cf. § 3.9) sont ensuite ensemencés par 100 mL de la troisième préculture. Les 3 cultures successives en mode batch sont réalisées à 28 °C, pH 5 et permettent d'atteindre une densité cellulaire d'environ 60 g.L^{-1} en 30 h. Ensuite l'expression de la protéine hétérologue est induite à pH 4,5 par la mise en route de l'alimentation avec la solution contenant le méthanol comme source de carbone. Cette culture en mode fed-batch dure environ 96 h.

6.3 Préparation des échantillons

6.3.1 Echantillons issus des prélèvements au cours de la culture dans les fioles d'Erlenmeyer

La Figure 6 représente procédure globale de traitement des échantillons issus de la culture des souches sauvages dans les milieux YNBH (YNBH1, YNBH2 ou YNBH3). Tout d'abord 3 mL de milieu de culture prélevés au cours de la culture sont délipidés avec trois fois 3 mL d'hexane. Les phases hexaniques rassemblées sont conservées dans des fioles hermétiques à -20 °C en attendant l'analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). La phase aqueuse (+ émulsion intermédiaire) contenant les cellules et le milieu de culture est centrifugée (10000 x *g*, 10 min, 4 °C) et le surnageant, que nous appelons par la suite « extrait enzymatique », est récupéré, aliquoté et conservé à -20 °C en attendant le dosage de l'activité lipase par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) (cf. § 8.1). Le culot cellulaire est repris dans de l'eau, en diluant si nécessaire, pour la mesure de DO à 600 nm.

6.3.2 Echantillons issus du milieu en fin de la culture dans les fioles d'Erlenmeyer

Une centrifugation (10000 x *g*, 10 min, 4 °C) du milieu en fin de culture est effectuée et le surnageant récupéré est délipidé 3 fois avec 3 volumes équivalents d'hexane. Des préfiltrations successives sur membrane (Millipore) de 10 – 5 – 0,45 µm de diamètre de pores sont ensuite entreprises avant d'effectuer la concentration (~5 fois) et éventuellement la diafiltration à l'aide d'un module d'ultrafiltration (Modèle Verder VL 100 constant). La membrane utilisée est une GE Healthcare (Modèle UFP-30-C-MM01A, type 30000 NMWC) dont le seuil de coupure est de 30 kDa. L'extrait enzymatique préparé est aliquoté et conservé à -20 °C.

Vingt-cinq milligrammes de culot de centrifugation sont repris dans 2 mL de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) puis conservés à -20 °C pour un éventuel dosage d'activité enzymatique. Lorsque le dosage d'activité est nécessaire, 200 µL de cette suspension sont déposés un microtube de type Eppendorf de 2 mL contenant 0,45 g de billes (0,45-0,50 mm de diamètre, Braun Biotech. International) préalablement autoclavé. Le tube

est alors soumis à une forte agitation par agitateur Vortex (13000 tours.min^{-1}) pendant 15 s avant d'être refroidi dans de la glace pendant 30 s. Cette étape d'agitation-repos est répétée deux fois. L'extrait enzymatique (surnageant) est alors prêt pour le dosage d'activité.

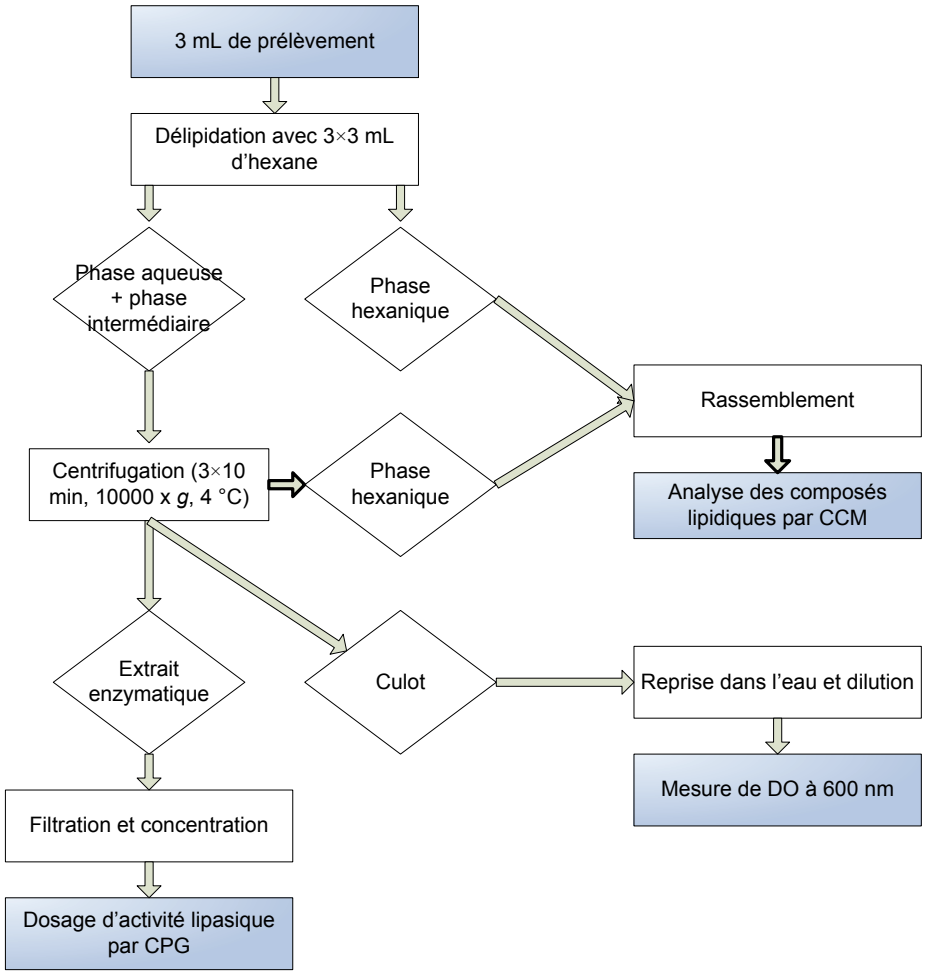


Figure 6 : Procédure de préparation des échantillons à partir des prélèvements effectués au cours de culture en fiole d'erlenmeyer

6.3.3 Echantillons issus des prélèvements au cours de la culture en fermenteur

6.3.3.1 Cultures sur YNBH : souches sauvages

Pour la fermentation par les souches sauvages, 32 mL de milieu de culture sont prélevés puis répartis en deux fractions de 2 mL et 30 mL respectivement (Figure 7). Après centrifugation (2 min, 12000 x *g*) de la première fraction (2 mL), le culot récupéré est lavé une fois à l'hexane (v/v) puis 2 fois à l'eau (v/v) avant d'être repris et/ou dilué dans de l'eau. Cet échantillon sert pour la mesure de DO.

La centrifugation (10 min, 10000 x *g*, 4 °C) de la deuxième fraction (30 mL) est également effectuée. Le culot est traité de la même façon que celui de la première fraction afin d'avoir un échantillon pour déterminer la matière sèche cellulaire. Le surnageant récupéré est délipidé 3 fois (30 mL de phase hexanique recyclée du lavage de culot et 2×30 mL d'hexane (Figure 7)). Après centrifugation, les aliquotes de l'extrait enzymatique et de la phase hexanique sont conservés à -20 °C en attendant les analyses ultérieures.

6.3.3.2 Cultures des transformants *P. pastoris*

Pour la fermentation par les transformants, des prélèvements de 1 mL de milieu sont effectués régulièrement pour suivre la croissance cellulaire. Après centrifugation, le traitement à l'hexane n'est pas nécessaire (pas d'huile dans le milieu) : le culot est lavé 3 fois avec 3×1 mL d'eau, puis repris et dilué dans de l'eau avant la mesure de DO à 600 nm.

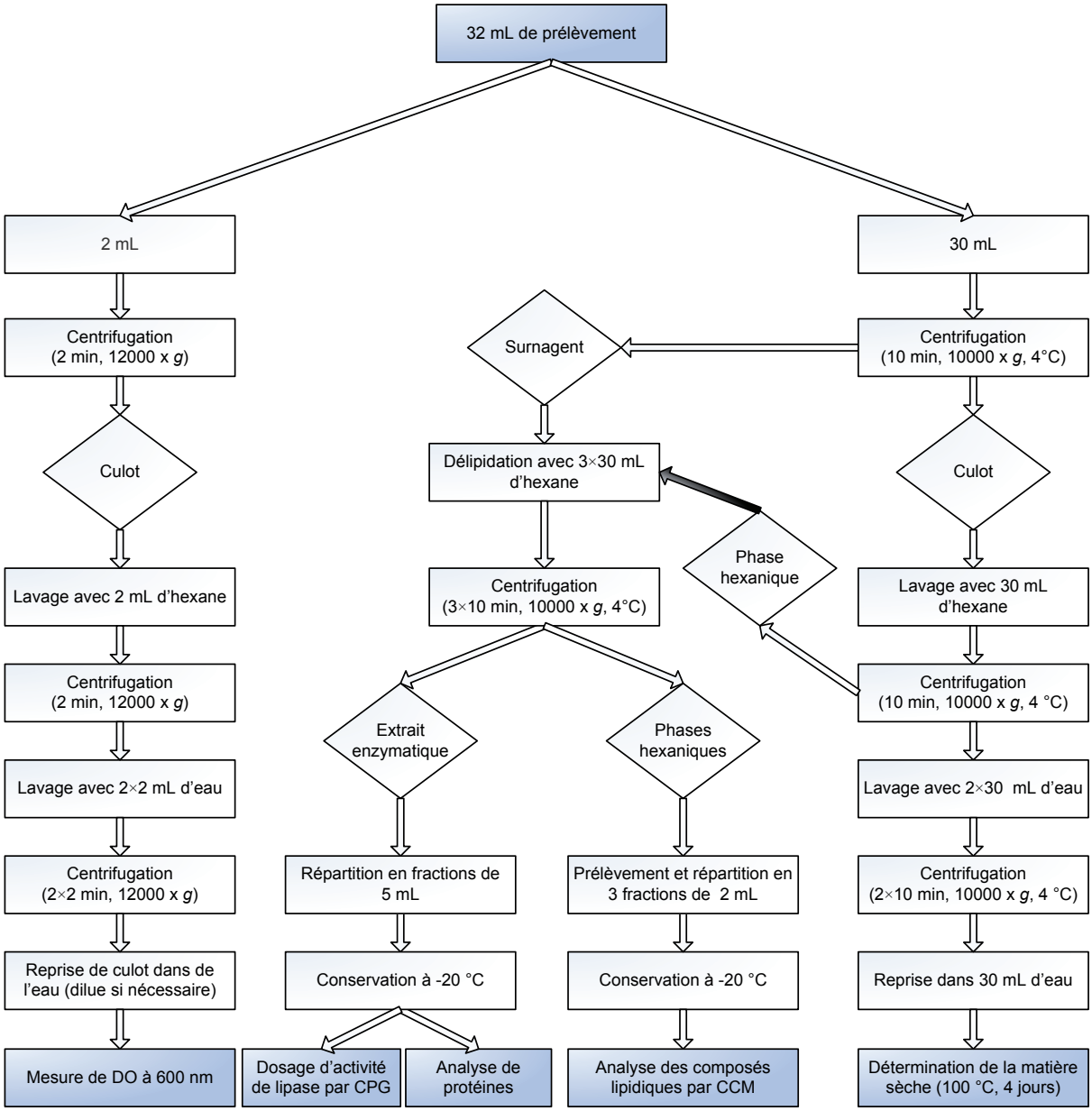


Figure 7 : Procédure de préparation des échantillons à partir des prélèvements de milieu culture issus de la fermentation par les souches sauvages

6.3.4 Echantillons issus de la récolte finale après culture en fermenteur

6.3.4.1 Cultures sur YNBH : souches sauvages

Pour le milieu de culture issu de la fermentation par les souches sauvages, une centrifugation (10000 x *g*, 10 min, 4 °C) est effectuée afin de récupérer le surnageant, qui est ensuite délipidé 3 fois avec 3 volumes équivalents d'hexane. Des préfiltrations sur membrane (Millipore) de 10 – 3 – 0,45 µm de diamètre de pores sont entreprises successivement avant de réaliser la concentration à l'aide d'un module d'ultrafiltration (Modèle Quixstand), équipé d'une membrane de 30 kDa de seuil de coupure (GE Healthcare ; référence UFP-30-C-4MA). Une diafiltration du concentrat contre 5 volumes de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) est enfin entreprise dans le même module d'ultrafiltration. Des aliquotes d'extrait enzymatique sont conservées à -20 °C.

6.3.4.2 Cultures des transformants de *P. pastoris*

Pour le milieu de culture issu de la fermentation par les transformants, aucune délipidation de surnageant n'est nécessaire. Après centrifugation (10000 ×*g*, 10 min, 4 °C) pour éliminer les cellules, les préfiltrations successives du surnageant sont réalisées avec des membranes de 3 – 1,2 – 0,45 µm de diamètre de pores. La concentration, la diafiltration ainsi que la conservation de l'extrait enzymatique se font de la même manière que cité précédemment (cf. § 6.3.4.1).

7 TECHNIQUES DE MANIPULATION GENETIQUE

7.1 Vecteurs d'expression des lipases CtroL4a, AflaL0a, CaLA, CdubL0e et CalbL3a

Les séquences CtroL4a de *C. tropicalis* MYA-3404, AflaL0a de *A. flavus* NRRL3357, CaLA de *C. antarctica*, CdubL0e de *C. dubliniensis* CD36 et CalbL3a de *C. albicans* sont

disponibles dans la base de données NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) avec les numéros d'accession suivants : XP_002548755, XP_002373916.1, 2VEO_A, XP_002422397.1 et Q9P8W2.2. Ces séquences ont été sélectionnées après une recherche Blast utilisant la séquence CpLIP2 comme requête. WoLF PSORT [Horton *et al.*, 2007] et PrediSi [Hiller *et al.*, 2004] ont été utilisés pour prédire les séquences de peptides signaux afin d'éliminer ces derniers de la séquence à synthétiser. Les gènes sont synthétisés et sous-clonés par GeneArt (http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home.html) dans le vecteur pPICZαB (Invitrogen), via PstI/NotI dans le cadre de lecture du signal de sécrétion α-factor de *S. cerevisiae,* sous contrôle du promoteur AOX1 inductible par le méthanol. Les plasmides ainsi obtenus sont nommés pPICZαBCtroL4a, pPICZαBAflaL0a, pPICZαBCaLA, pPICZαBCdubL0e et pPICZαBCalL3a. Ces vecteurs ont été utilisés pour des transformations de *P. pastoris* X33 après linéarisation par SacI (Roche Diagnostics) selon le protocole décrit dans «Pichia expression kit » d'Invitrogen (cf. § 7.4).

7.2 Minitransformation d'*E. Coli* XL1-Blue MRF'

Cette méthode de transformation rapide est utilisée pour des expériences où le taux de transformation ne doit pas être particulièrement élevé (*e.g.* sous clonage). Après la mise en contact des cellules compétentes *E. coli* XL1-Blue MRF' avec le plasmide (pPICZαB) portant le gène de résistance à la zéocine, le passage de l'ADN à travers la paroi bactérienne est provoqué par un choc thermique à une température et d'une durée bien précises [Hanahan, 1983]. La sélection des bactéries transformées se fait sur milieu riche (LB) en présence de zéocine.

Dans un eppendorf 1,5 mL, 100 µL de cellules compétentes stockées à -80 °C et pré-décongelées 10 min dans la glace sont mélangés avec 25-150 ng d'ADN plasmidique. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 min puis incubé à exactement 42 °C pendant 45 sec avant d'être remis sur la glace pendant 2 min. Un volume de 900 µL de milieu SOC (à 42 °C) y est ajouté et les cellules sont incubées à 37 °C pendant 1 heure sur agitateur rotatif. Les tubes sont centrifugés 5 min à 2000 x *g*, et après l'élimination de 800 µL de surnageant, le culot est resuspendu avant d'être étalé sur boites LB + zéocine (cf. § 3.5), puis incubé à 37 °C pendant une nuit ou à 28 °C pendant 3 jours.

7.3 Minipréparation d'ADN plasmidique

Cette méthode de préparation rapide permet l'extraction sélective de l'ADN plasmidique d'*E. coli*. Basé sur la méthode de la lyse alcaline décrite par Birnboim et Doly (1979) et modifiée par Sambrook *et al.* (1989), le principe repose sur une dénaturation sélective de l'ADN génomique de haut poids moléculaire en milieu alcalin. Après neutralisation et en présence de sels, l'ADN génomique et les protéines sont précipités et éliminés par centrifugation.

Cette méthode est utilisée afin d'obtenir les plasmides contenant les gènes synthétiques en quantité suffisante pour ensuite transformer les levures.

Une colonie d'*E. coli* sur boite LB + zéocine (cf. § 3.5), transformée telle que décrit dans § 7.2, est tout d'abord repiquée au cure-dent et déposée dans un tube contenant 2 mL de milieu LB + zéocine. Le tube est alors incubé entre 16 et 20 h à 37 °C sur un agitateur rotatif pour microplaque.

Les cellules d'*E. coli* conservées à -80 °C peuvent également être utilisées pour cette méthode. Dans ce cas, une préculture réalisée dans 2 mL de milieu LB + antibiotique est ensemencée avec 100 µL du mélange glycérol + cellules et incubée entre 16 et 20 h à 37 °C. Un volume de 100 µL de cette préculture sert ensuite à ensemencer à nouveau 2 mL de milieu LB + antibiotique qui sont incubés entre 16 et 20 h à 37 °C.

Après la culture, le milieu est centrifugé 5 min à 1300 x *g* et le surnageant est éliminé. Une aspiration à l'aide d'un dispositif trompe-à-vide/piège est nécessaire pour s'assurer de l'élimination des dernières gouttes de milieu : le culot est alors prêt pour l'extraction et/ou stockage à -20 °C.

Le culot est resuspendu dans 100 µL de solution I à pH 8 contenant 50 mM de glucose, 25 mM de Tris et 10 mM de EDTA. Après homogénéisation à l'aide d'un agitateur vortex, 200 µL de solution II contenant 0,2 N de NaOH et 1 % (p/v) de SDS sont additionnés. Après incubation 5 min sur la glace, 150 µL de solution III contenant 60 % d'acétate de potassium 5 M, 11,5 % d'acide acétique et 28,5 % d'eau (v/v) y sont ajoutés avant d'incuber encore 5 min dans la glace. Le surnageant est transféré dans un tube neuf après 5 min de centrifugation à 17000 x *g*. Neuf cents microlitres d'éthanol absolu à -20 °C sont ensuite ajoutés au surnageant. Après homogénéisation douce par retournement du tube, une

centrifugation de 15 min à 12000 x *g* est effectuée. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est récupéré puis lavé avec 500 µL d'éthanol à 70 % glacé avant la centrifugation de 5 min à 12000 x *g*. L'éthanol est éliminé par aspiration à l'aide du dispositif trompe/piège. Le culot est laissé sécher à l'air pendant 30 min avant d'être dissout par 50 µL d'ARNase (20 $\mu g.mL^{-1}$). Après dosage d'ADN par spectrophotométrie, l'ADN plasmidique récupéré peut être conservé à -20 °C.

7.4 Linéarisation de l'ADN plasmidique

Dans un mélange contenant 15 µL de tampon A 10 X additionné d'eau stérile (qsp 150 µL), 100 µg d'ADN plasmidique sont digérés 6 h à 37 °C par 500 U de Sac I. L'enzyme de restriction est ensuite désactivée par la chaleur (65 °C, 15 min). Une purification peut éventuellement être effectuée ensuite.

Pour la purification d'ADN, le kit « GFX PCR DNA and Gel Band Purif » (GE Healthcare Life Sciences) est utilisé selon le protocole donné par le fabricant. Le rendement de la purification est généralement faible (10 %).

Une vérification de la digestion peut être faite sur gel d'électrophorèse (cf. § 7.5).

7.5 Gels d'agarose pour la visualisation d'ADN

Le gel d'agarose à 0,8 % est préparé dans le tampon TAE à pH 8,2 (Tris 484.10^{-3} %, EDTA $7{,}4.10^{-3}$ %, Acétate de sodium 164.10^{-3} % ; p/v) auquel est ajouté 0,01 % (v/v) de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Un dépôt de 10 µL de mélange contenant 10 % ADN, 10 % de tampon charge et 80 % d'eau (v/v) est effectué sur le gel, parallèlement au marqueur de taille. La migration se fait pendant 1 h sous une tension de 75 V dans le tampon TAE.

7.6 Transformation de *P. pastoris* X33

7.6.1 Préparation des cellules compétentes de *P. pastoris* X33

Deux pré-cultures successives de 24 h à 28 °C sous agitation sont effectuées. Pour la première, 5 mL de milieu YPD sont ensemencés à partir de 100 µL d'une suspension glycérolée de cellules de *P. pastoris* X33 conservées à -80 °C. Pour la deuxième, 20 mL de milieu YPD sont ensemencés à partir de 100 µL de la première pré-culture.

Trois cultures de 500 mL de YPD sont ensuite réalisées pendant 16 h à 28 °C sous agitation. Pour cela, le milieu YPD est ensemencé à partir de 3 volumes différents de la deuxième pré-culture de telle sorte que les cellules obtenues au moment de récolte (après 16 h) soient en début de la phase exponentielle ($DO_{600\ nm}$ = 1,7 à 2). Les volumes d'ensemencement sont calculés en fonction du temps de génération de la souche *P. pastoris* X33 dans nos conditions et de la $DO_{600\ nm}$ de la deuxième préculture (volumes d'ensemencement = volume calculé ± 15 %).

Après 16 h de culture, une $DO_{600\ nm}$ de 1,7-2 est atteinte et le milieu de culture est centrifugé 5 min à 1500 x *g* à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé et centrifugé (5 min, 1500 x *g*, 4 °C) 3 fois (2 fois avec de l'eau stérile à 4 °C et une fois avec une solution de sorbitol 1 M). Le culot est ensuite resuspendu dans 1 mL de sorbitol 1 M, puis le tube est conservé dans de la glace en vue de la transformation. L'ensemble de ces manipulations est effectué en conditions stériles.

7.6.2 Transformation de *P. pastoris* X33 par électroporation

Dans un tube de 0,5 mL stérile, 80 µl d'une suspension de cellules compétentes de *P. pastoris* X 33 obtenue comme décrit au § 7.6.1 sont mélangés avec 5 à 10 µg de vecteur linéarisé (pPICZαBCtroL4a, pPICZαBAflaL0a, pPICZαBCaLA, pPICZαBCdubL0e et pPICZαBCalL3a) puis le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation stérile. Après une incubation de la cuvette de 5 min dans la glace, l'électroporation est réalisée (GenePulseur de Biorad ; 1,5 kv 25 µF; Pulse controler : 200 Ω). Un millilitre de sorbitol 1 M (4 °C) est ajouté immédiatement après dans la cuvette et le contenu est transféré dans un microtube stérile de 2 mL de capacité avant d'effectuer une incubation pendant 2 h à 30 °C

sans agitation. Des volumes de 100, 300 et 500 µL de cette suspension cellulaire sont ensuite étalées sur boites YPDS + zéocine 200 µg.mL^{-1} et la culture est réalisée sur 3 ou 4 jours à 28 °C. Les colonies qui se développent sur ce milieu ont bien intégré le plasmide (crible positif).

7.7 Criblage et sélection des clones transformés

Les transformants sont cultivés dans différents milieux sélectifs afin de choisir le meilleur clone.

Tout d'abord, des colonies obtenues sur boites de YPDS + zéocine (méthode décrite au § 7.6.2) sont repiquées à l'aide de cure-dents dans des microplaques deepwell (VWR) de 2 mL contenant 250 µL de milieu YPD + 100 µg.mL^{-1} zéocine (96 clones par transformation). Trois précultures successives de 24 h sont alors effectuées à 28 °C sous agitation.

Finalement, 5 µL de la dernière préculture sont déposés sur boite YPD + zéocine pour le criblage de la résistance à la zéocine et/ou sur boite YNB + Rhodamine pour le criblage d'activité lipase. Ces cultures se font pendant 3 à 5 jours à 28 °C.

8 TECHNIQUES D'ANALYSE

8.1 Dosage de l'activité enzymatique par CPG

L'activité d'hydrolyse des lipides est déterminée par la vitesse initiale de libération d'acides gras et l'activité de transestérification par la vitesse de formation d'esters. Dans nos conditions, la somme des deux représente l'activité totale. L'activité spécifique est déterminée par rapport à la quantité de protéines (eq. de protéine CpLIP2) contenues dans la préparation enzymatique. Une unité enzymatique U correspond à la quantité de l'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmol de produit en une minute de réaction.

Le dosage de l'activité de lipase comprend trois étapes : réaction catalytique, préparation de l'échantillon pour l'analyse (extraction à l'hexane et silylation des composés

lipidiques) et analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La Chromatographie en Couche Mince (CCM) peut également être utilisée (cf. 8.2). Dans ce cas, après réaction enzymatique, les produits de la réaction sont extraits à l'hexane et déposés directement sur plaque de CCM sans que la silylation se fasse.

8.1.1 Réactions enzymatiques

Le substrat lipidique utilisé est un des esters suivants : oléate de méthyle (C18:1ME), oléate d'éthyle (C18:1EE), oléate de butyle (C18:1BE), linoléate de méthyle (C18 :2ME), linoléate d'éthyle (C18:2EE), palmitate de méthyle (C16:1ME), palmitate d'éthyle (C16:1EE), laurate de méthyle (C12:0ME) et laurate d'éthyle (C12:0EE). Chaque substrat peut être préparé selon deux méthodes différentes, d'où deux conditions de réaction.

Pour la première, 100 mM de substrat sont dissous dans de l'acétone et 100 µL de cette préparation (10 µmol de substrat) sont laissés à évaporer dans une fiole Wheaton (capacité 4 mL) que l'on place ensuite dans un bain-marie à la température voulue. Le mélange des phases est effectué de façon mécanique par de petits barreaux aimantés et un agitateur magnétique (700 tours.min^{-1}). La réaction commence par l'addition de 1 mL d'un mélange constitué d'extrait enzymatique, de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) (réaction d'hydrolyse) et éventuellement de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) contenant un alcool (réaction de transestérification).

Pour la deuxième, 100 mM de substrat sont émulsifiés par un traitement de 20 sec aux ultrasons (à l'aide de l'appareil Branson Sonifier 250 et à la puissance maximale) dans une solution aqueuse d'alcool polyvinylique (PVA) à 2 % (p/v). La réaction commence par l'addition de 100 µL de cette préparation (10 µmol de substrat) dans un tube à hémolyse placé dans un bain-Marie à la température voulue contenant déjà 900 µL d'un mélange constitué d'extrait enzymatique, de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) (réaction d'hydrolyse) ou de tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) contenant un alcool (réaction de transestérification). Pour la réaction de transestérification, divers alcools ont été testés à différentes concentrations : alcools primaires (méthanol, éthanol, propanol-1, méthyle-2 propanol-1 et butanol-1), secondaires (propanol-2, butanol-2 et pentanol-3) ou tertiaire (methyl-2 propanol-2).

Pour un substrat lipidique donné, la quantité d'enzyme utilisée pour la réaction varie d'une enzyme à une autre et est ajustée de telle sorte que la vitesse de réaction soit proportionnelle à la quantité d'enzyme.

A part le tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, adapté aux pH compris entre 6 et 8, d'autres tampons ont été utilisés pour tester les réactions sur d'autres plages de pH : le tampon tartrate (50 mM, pH 5-6) et le tampon glycine (50 mM, pH 8-9).

La réaction catalytique est arrêtée par l'ajout de 950 µL d'une solution d'arrêt constituée d'éthanol et d'acide sulfurique 36 N (100/0,8 ; v/v). Le blanc est effectué en ajoutant de la solution d'arrêt lipase avant de démarrer la réaction. En condition standard pour CpLIP2, la réaction se fait en 15 min à 30 °C, pH 6,5 (sous agitation à 700 tours.min^{-1} pour le substrat non émulsifié).

8.1.2 Préparation des produits de la réaction pour l'analyse

Après la réaction, les composés lipidiques sont extraits avec de l'hexane. Pour cela, 1 mL d'hexane et 50 µL de mélange équimolaire d'étalons internes (pentadécanoate de méthyle, pentadécanoate d'éthyle et acide pentadécanoïque ; 20 mM chacun) sont ajoutés au milieu réactionnel afin de tenir compte du rendement d'extraction. Après 5 sec d'agitation énergique et décantation, 200 µL de phase hexanique sont transférés dans un insert de 300 µL placé dans un flacon à vis de 1 mL. Après l'addition de 25 µL de N-méthyl-N(triméthylsilyl)-fluoroacétamide (MSTFA) et de 25 µL de pyridine, la réaction de silylation des acides gras se fait en 20 min à 50 °C. En effet, en présence de la pyridine comme catalyseur, le MSTFA dérivatise les acides gras libre en ajoutant un groupement $Si(CH_3)_3$ sur l'hydroxyle de la fonction acide, ce qui permet d'accroître leur volatilité pour l'analyse par CPG.

8.1.3 Analyse par CPG

Les produits de la réaction sont analysés par un chromatographe Hewlett Packard 5890 II, équipé d'un passeur d'échantillons automatique (Agilent 6890), d'un injecteur de type Split et d'un détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme). Le signal est enregistré et

analysé par le système de supervision et d'intégration Empower Waters Pro 2 (Milford, MA, USA). Les autres paramètres sont décrits ci-dessous :

- Colonne capillaire en silice DB-5HT (J&W Scientific, Massy, France)
  - Phase stationnaire apolaire : diméthylpolysiloxylane
  - Longueur : 15 m, diamètre intérieur : 0,25 mm
  - Epaisseur du film : 0,1 µm
- Flux d'hélium : 2 $mL.min^{-1}$
- Rapport de division de l'injecteur/diviseur : 1/18
- Volume d'échantillon injecté : 0,1 µL
- Injecteur : 290 °C
- Détecteur : 280 °C
- Gradient de température de four :
  - C16:1 ME, EE ou AG : 180-195 °C à 5 $°C.min^{-1}$
  - C18:2 ME, EE ou AG : 200-225 °C à 10 $°C.min^{-1}$
  - Divers esters de C18:1 : 200-225 °C à 10 $°C.min^{-1}$ puis 225-260 °C à 35 $°C.min^{-1}$

8.1.4 Détermination du coefficient 1/α (spécificité de substrat)

Les conditions de réaction et de préparation des produits de la réaction sont identiques à celles décrites dans § 8.1.1 et 8.1.2 sauf que plusieurs substrats (monoesters) sont mis en réaction en même temps. Pour cela, 100 µL de mélange équimolaire de 6 esters méthyliques ou éthyliques d'acides gras saturés de différentes longueurs de chaine carbonée (C8, C10, C12, C14, C16 et C18 ; 16 mM chacun) préparés en émulsion dans une solution aqueuse de PVA à 2 % (p/v) sont utilisés pour la réaction.

Les produits de réaction sont analysés par CPG dans les conditions suivantes :

- Injecteur : 340 °C
- Détecteur : 370 °C
- Gradient de température de four : 60-260 °C à 25 $°C.min^{-1}$

Le coefficient de spécificité (1/α) est calculé selon la méthode précédemment décrite [Vaysse *et al.*, 2002]. Cette grandeur 1/α est définie par le ratio de logarithmes suivant :

$$1/\alpha = \log ([S_i]_t/[S_i]_{t0}) \ / \log ([S_{ref}]_t/[S_{ref}]_{t0})$$

Où $[S_i]_t$ et $[S_i]_{t0}$ sont les concentrations molaires de susbrat S_i à t et t0. Le substrat S_{ref} est celui pour lequel la conversion est la plus importante au temps t, sa constante de spécificité $1/\alpha$ est donc égale à 1. Les conditions réactionnelles (quantité d'enzyme et durée de réaction) ont été déterminées de façons à ce que les vitesses de conversion des substrats soient toujours des vitesses initiales.

8.2 Analyse des lipides par CCM

Les esters d'acides gras et les acides gras libres contenus dans la phase hexanique (issue de la délipidation du milieu de culture, cf. 6.3) ont été analysés par la technique de chromatographie sur couche mince (CCM). L'analyse des produits de la réaction enzymatique (cf. 8.1) a également été réalisée par cette technique.

Les plaques utilisées sont des préparations commerciales (Merck) de verre recouvertes de silice 60 G (dimensions : 20 cm, 10 cm, 0,25 mm). Les étalons sont un mélange équimolaire de 1 $g.L^{-1}$ dans l'hexane de triglycéride (trioléine), diglycérides (dioléine), monoglycérides (monooléyl glycérol) et acide gras (acide oléique). L'huile de colza (1 $g.L^{-1}$ dans l'hexane) est également utilisée comme l'étalon. L'éluant est un mélange d'hexane, d'éther éthylique et d'acide acétique (50/50/1 ou 80/20/1 ; v/v/v). Après migration, les plaques sont séchées puis les spots sont révélés par vaporisation d'un mélange d'acide phosphorique et d'acétate de cuivre saturé dans de l'eau (50/50, v/v) puis carbonisation à 180 °C pendant 10 min.

Les produits de la réaction enzymatique ont été quantifiés sur la base de l'aire des pics (AU) du chromatogramme obtenu à l'aide d'un densitomètre Scanner 3 (Camag, France) à 360 nm après révélation.

8.3 Dosage des protéines totales

Les protéines totales dans une préparation enzymatique sont analysées par la méthode de Bradford [1976], basée sur la mesure de l'absorbance à 595 nm du complexe anionique formé entre le Bleu Brillant de Coomassie G-250 et les protéines en milieu acide. Le réactif utilisé est le Dye Reagent 5X (Biorad 500-0006). Un volume de 0,2 mL de ce réactif est mélangé à 0,8 mL d'échantillon protéique et incubé pendant 10 min à température ambiance (20-25 °C). L'absorbance est ensuite lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640. Le blanc est effectué avec 0,8 mL d'eau dans des conditions identiques. La protéine CpLIP2 pure lyophilisée est utilisée comme standard pour préparer la courbe d'étalonnage (cf. Annexe 1).

Tableau 2 : Marqueurs de taille des protéines (GE Healthcare)

Le mélange de ces protéines est préparé dans une solution Laemmli (tampon charge) contenant 0,0625 M de Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) de glycérol, 0,0025 % (p/v) de bleu de bromophénol et 2 % (p/v) de SDS

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	Quantité de dépôt sur gel (µg)
Phosphorylase b (muscle de lapin)	97	0,67
Albumine (sérum de bovine)	66	0,83
Ovalbumine (blanc d'œuf de poule)	45	1,47
Anhydrase carbonique (erythrocyte bovin)	30	0,83
Inhibiteur de trypsine (soja)	20,1	0,80
α-Lactalbumine (lait de vache)	14,4	1,16

Tableau 3 : Compositions de gels de polyacrylamide

Compositions	Gel de concentration	Gel de séparation (Acrylamide)	
		10 %	5 %
Acrylamide-bisacrylamide (30 : 0,8) (mL)	2,5	10	5
Tampon de gel de stacking (1) (mL)	5	-	-
Tampon de gel de séparation (2) (mL)	-	3,75	3,75
Solution de SDS 10 % (mL)	0,2	0,3	0,3
Solution de persulfate d'ammonium 1,5 % (mL)	1	1,5	1,5
H_2O (mL)	11,3	14,45	19,45
TEMED (mL)	0,015	0,015	0,015

(1) Tampon de gel de concentration pH 6,8 contenant 0,5 M de Tris et environ 0,5 M de HCl

(2) Tampon de gel de séparation pH 8,8 contenant 3 M de Tris et 0,5 M de HCl

8.4 Analyse des protéines par électrophorèse

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Cette technique est basée sur la migration et la séparation des protéines sur gel suivie de la coloration des protéines séparées par des réactifs de révélation. Il existe deux conditions différentes. En condition native (absence de laurylsulfate de sodium : SDS), la migration des protéines se fait à la fois en fonction de leur masse moléculaire et de leur charge. Les protéines, une fois séparées, peuvent être révélées spécifiquement par leur activité catalytique. En condition dénaturante (SDS-PAGE), le SDS confie à toutes les protéines contenues dans l'échantillon la même densité de charge électrique négative ; la migration est uniquement fonction de leur masse moléculaire [Laemmli, 1970]. Pour les protéines glycosylées, la masse de leurs chaines polysaccharidiques a une influence sur la migration [Sambrook *et al.*, 1989] et la déglycolysation est alors nécessaire. Après révélation, les protéines sont identifiées par comparaison de leur poids moléculaire avec celui des témoins (Tableau 2).

8.4.1 Préparation du gel d'électrophorèse

8.4.1.1 Gel dénaturant

Le gel dénaturant se compose de deux couches. La première couche est un gel de concentration (pH 6,8 ; 2,5 % d'acrylamide) qui permet la condensation des protéines alors que la deuxième est un gel de séparation qui permet de les séparer. Le TEMED (tétra-méthyl-éthylènediamine (N,N,N',N')) et le persulfate d'ammonium sont les agents de polymérisation. La taille des pores formés est fonction de la concentration en acrylamide et en bis-acrylamide.

La composition du gel de concentration et du gel de séparation pour différents pourcentages finaux en acrylamide est rapportée dans le Tableau 3. Pour avoir le gel à d'autres pourcentages en acrylamide, nous réglons le volume de solution d'acrylamide et d'eau de telle sorte que la somme des deux soit égale à 24,45 mL.

8.4.1.2 Gel natif

La composition du gel natif est la même que celle du gel dénaturant, sauf que la solution de SDS est remplacée par de l'eau.

8.4.2 Préparation des échantillons

Afin d'avoir des bandes nettes sur le gel d'électrophorèse, les quantités de protéines déposées doivent être d'environ 5 à 20 µg par puits (par rapport au dosage Bradford). Pour cela l'extrait enzymatique est concentré, si nécessaire, par ultrafiltration sur filtre Amicon (Millipore, seuil de coupure de 10 ou 30 kDa) soumis à une centrifugation (6000 x *g*, 15-30 min).

8.4.2.1 Echantillons dénaturés déglycosylés

Les protéines sont dénaturées 5 à 10 min à température ambiante (25 °C) par un dixième volume de solution de SDS 5 % (p/v) ou éventuellement de tampon dénaturant contenant 5 % (p/v) de SDS et 0,4 M de DTT (Dithiothréitol). L'ensemble est ensuite mélangé avec un dixième volume de tampon de réaction (0,5 M de citrate de sodium, pH 5,5) et 0,5 à 2 µL de Endo-H. La réaction de déglycosylation a lieu à 37 °C pendant 1 h ou plus. Après la réaction, le tout est mélangé avec un quart de tampon charge contenant 0,25 M de Tris-HCl (pH 6,8),

40 % (v/v) de glycérol, 0,01 % (p/v) de bleu de bromophénol et 8 % (p/v) de SDS. Finalement, 10 à 50 µL de ce mélange final sont déposés sur gel dénaturant.

8.4.2.2 Echantillons dénaturés non déglycosylés

Les échantillons dénaturés non déglycosylés sont préparés de la même manière que les échantillons dénaturés déglycosylés. Cependant, l'Endo-H est remplacée par de l'eau. Finalement, 10 à 50 µL de mélange final sont déposés sur gel dénaturant.

8.4.2.3 Echantillons non dénaturés

En conditions natives, les échantillons sont mélangés avec un quart de volume de tampon charge contenant 0,25 M de Tris-HCl (pH 6,8), 40 % (v/v) de glycérol et 0,01 % (p/v) de bleu de bromophénol. Finalement, 10 à 50 µL de mélange final sont déposés sur gel natif.

Par ailleurs, un traitement de dénaturation des protéines par une faible quantité de SDS peut être effectué afin de mettre au point les conditions de migration et de révélation spécifique des protéines. Dans ce cas, 10 à 50 µL de mélange final sont déposés sur gel natif.

8.4.3 Migration des protéines

8.4.3.1 Conditions dénaturantes

Le tampon de migration est constitué d'une solution de Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3) contenant 0,192 M de Glycine et 0,1 % (p/v) de SDS. La migration se fait à courant constant, maintenu à 20 mA pendant 45 min pour le premier gel de concentration, puis à 25 mA pendant 90 min pour le gel de séparation.

8.4.3.2 Conditions natives

La migration se fait de la même façon qu'en condition dénaturante. Le gel et le tampon de migration sont par ailleurs exempts de SDS.

8.4.4 Révélation des protéines

8.4.4.1 Révélation au bleu de Coomassie

Cette révélation permet de détecter environ 1 µg de protéines par bande. Après la migration, les gels sont rincés 3 fois dans l'eau puis incubés pendant 2 h dans une solution contenant 0,2 % (p/v) de bleu de Coomassie R250 (Bio-Rad), 40 % (v/v) d'éthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique. La décoloration des gels est ensuite effectuée grâce aux lavages successifs dans une solution d'acide acétique 10 % (v/v). Les gels sont enfin numérisés au scanner après des rinçages avec de l'eau.

8.4.4.2 Révélation spécifique

En conditions natives, les lipases sont révélées par leur activité d'hydrolyse dans un réactif composé de Tris-HCl (50 mM, pH 7) contenant 0,03 % (p/v) de Fast blue B salt, 0,05 % (p/v) de β-naphtyloléate (ou de β-naphtylcaproate), 0,5 % (p/v) de Triton X100 et 1 % (v/v) d'acétone. Le β-naphtol libéré par hydrolyse enzymatique forme un complexe coloré avec le Fast Blue B Salt et les bandes protéiques concernées se colorent rose.

Après la migration de protéines, les gels sont rincés trois fois dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7) avant d'être incubés dans le réactif. La révélation se fait pendant environ une heure en changeant successivement de réactif toutes les 20 minutes.

8.5 Estimation spectrophotométrique de la densité cellulaire

Les échantillons tels que préparés dans § 6.3 sont utilisés pour la mesure de densité optique (DO) à 600 nm. Le spectrophotomètre utilisé est un modèle Beckman DU 640. Si nécessaire, une dilution est réalisée de telle manière que la mesure de DO soit comprise entre 0,05 et 0,4.

8.6 Détermination de la matière sèche cellulaire

Les échantillons tels que préparés dans § 6.3 sont utilisés pour la détermination de la matière sèche cellulaire. Pour cela, les échantillons (culots cellulaires lavés) sont placés dans une étuve à 80 °C pendant 3-4 jours et pesés au temps 0 puis toutes les 24 h. La mesure de la matière sèche cellulaire permet d'exprimer la croissance cellulaire en $g.L^{-1}$.

Pour chaque souche, une relation entre la DO et la matière sèche aux différents stades de culture a été déterminée grâce à des prélèvements utilisés à la fois pour la mesure de DO à 600 nm et pour les deux mesures. Par la suite, ces relations ont permis d'exprimer la croissance cellulaire en $g.L^{-1}$ avec un simple suivi de DO.

8.7 Détermination de l'activité thermodynamique

L'activité thermodynamique des différents constituants du milieu réactionnel (eau, alcool, substrat lipidique) est calculée suivant le modèle UNIFAC (Universal Quasichemical Functional group Activity Coefficient) [Fredenslund *et al.*, 1975; Hansen *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 2000].

9 TECHNIQUES DE BIOINFORMATIQUE

9.1 Analyse des séquences

La visualisation et les alignement multiples de séquences sont effectués à l'aide de Seaview [Galtier *et al.*, 1996] et Clustal [Larkin *et al.*, 2007]. La recherche sur BLAST [Altschul *et al.*, 1990] est réalisée à partir de la version la plus récente de la base de données de NCBI (non-redundant sequence) [Benson *et al.*, 2009] ou de la base de données Lipase Engineering Database [Fischer and Pleiss, 2003].

9.2 Construction d'arbre phylogénétique

Les arbres phylogénétiques sont construits suivant les méthodes de maximum de vraisemblance en utilisant le logiciel PhyML 3.0 [Guindon *et al.*, 2010; Guindon and Gascuel, 2003].

Chapitre 1
Diversité des lipases/acyltransférases chez les levures

1 INTRODUCTION

L'étude de la diversité des lipases/acyltransférases chez les levures avait pour objectif l'obtention de nouvelles lipases/acyltransférases similaires à CpLIP2 mais avec des propriétés différentes. Pour cela, des étapes de sélection de diverses souches microbiennes ainsi que de production et caractérisation de lipases ont été réalisées. Parmi les microorganismes sécrétant des lipases, peu de souches de levures sont connues à l'heure actuelle pour leur capacité de sécrétion de lipases/acyltransférases. En effet, à part la souche *C. parapsilosis* CBS 604 qui sécrète CpLIP2, notre lipase/acyltransférase modèle, seule *C. albicans* a été décrite comme produisant une enzyme homologue fonctionnelle, CaLIP4 [Roustan *et al.*, 2005]. Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier ces enzymes particulières dans d'autres souches de levures, chez des espèces apparentées à *C. parapsilosis* CBS 604. Pour cela, nous avons sélectionné 18 souches microbiennes appartenant à 12 espèces, notamment *C. parapsilosis* (S0 et S2), *C. glabrata* (S3), *C. viswanathii* (S4), *C. saitoana* (S5), *C. maltosa* (S6), *C. fermentati* (S14 et S15), *Candida (Pseudozyma) antarctica* (S11cl et S11cnl), *Rhodotorula araucariae* (S7), *Rhodotorula mucilaginosa* (S8), *Kluyveromyces marxianus* (S9), *Issatchenkia orientalis* (S10), *P. guilliermondii* (S12, S13 et S16) et *Lipomyces starkeyi* (S17) (cf. Matériel et Méthodes, § 1.2). *C. parapsilosis* CBS 604, notée *S0*, a été étudiée comme référence.

Dans un premier temps, une étude préliminaire a été consacrée à présélectionner des souches pour leur capacité de sécrétion de lipases, mise en évidence sur milieu inducteur solide. La caractérisation biochimique des extraits enzymatiques obtenus en milieu inducteur liquide a alors été effectuée et a permis une seconde sélection des souches les plus intéressantes.

Dans un second temps, les souches finalement sélectionnées ont fait l'objet d'études plus approfondies pour l'amélioration de la production de lipases ainsi que la caractérisation biochimique des nouveaux extraits enzymatiques obtenus.

2 ETUDE PRELIMINAIRE DES SOUCHES SAUVAGES

2.1 Présélection des souches de levures

Les souches de la collection CBS sont tout d'abord préparées et conservées comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 4) avant d'être cultivées dans le milieu YNB+Rhodamine B contenant 0,5 % (p/v) d'huile de colza (cf. Matériel et Méthodes, § 3.11 et 5). Cette culture permet l'induction de la production de lipases et la mise en évidence de leur activité par la détection colorimétrique des acides gras libérés par hydrolyse de l'huile.

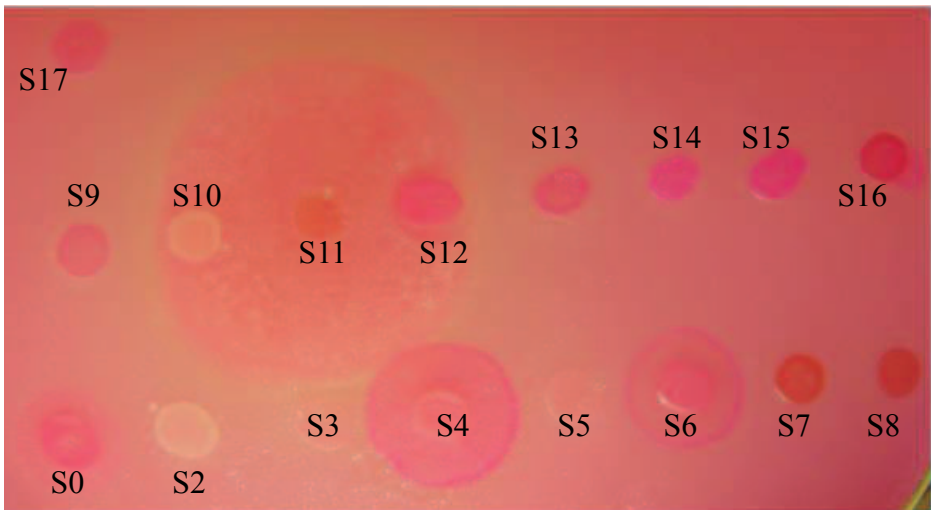


Figure 8 : Screening de 17 souches sur milieu YNB+Rhodamine B

La culture a été effectuée pendant 3 jours à 28 °C. Un halo rouge autour d'une colonie révèle une activité lipasique.

Une sécrétion de lipase a été observée notamment pour les souches S0, S4, S6, S11 et S12, qui ont alors été présélectionnées pour la suite de l'étude. Il est à noter que les souches S11cl et S11cnl sont issues de la même souche S11, mais se différencient par l'aspect de leurs colonies (lisses ou rugueuses), ce caractère phénotypique étant conservé en culture pure.

Afin de sélectionner les souches les plus intéressantes pour une étude approfondie, nous avons cultivé les souches présélectionnées en milieu liquide pour caractériser :

- leur capacité à produire une activité lipolytique détectable dans leur surnageant de culture : étude des cinétiques de croissance et de production de lipase après une mise au point des conditions de culture
- le poids moléculaire des protéines contenues ce surnageant (on recherche des protéines plutôt proches de CpLIP2), et le degré d'homologie de leurs fragments peptidiques comparée aux séquences de lipases connues : étude du contenu protéique des extraits
- la capacité des protéines contenues dans le surnageant de culture à catalyser la réaction de transestérification : mise en évidence de l'activité acyltransférase

2.2 Production d'enzymes

Les souches présélectionnées sont naturellement capables d'hydrolyser l'huile de colza sur milieu solide, la présence d'huile dans le milieu étant vraisemblablement un inducteur de la production de lipase par ces souches. Nous avons donc commencé par une étude sur milieu ne contenant que de l'huile comme source de carbone.

2.2.1 Mise au point des conditions de culture : choix du milieu et de la température

Avec l'huile de colza comme seule source de carbone, nous avons dû sélectionner un milieu synthétique et une température de culture qui permettaient à la fois une bonne croissance des souches et la production de lipases.

Pour cela, des cultures ont été réalisées à deux températures différentes (24 °C et 28 °C) sur deux milieux solides (milieu YNB + Rhodamine B et milieu G + Rhodamine B) contenant 0,5 % (p/v) d'huile de colza comme seule source de carbone et d'énergie. Les critères recherchés étaient à la fois un bon développement de la colonie et la présence d'un halo relativement important autour de cette colonie.

Tableau 4 : Ratio « diamètre halo/diamètre colonie » pour différentes souches cultivées dans différentes conditions de température et de milieu

Souche	Température (°C)	Milieu G + Rhodamine B	Milieu YNB + Rhodamine B
S0	24	1,23± 0,15	1,15± 0,04
	28	1,16± 0,05	1,17± 0,09
S11cl	24	1,37± 0,06	1,38± 0,07
	28	1,53± 0,04	1,34± 0,04
S11cnl	24	1,44± 0,00	1,44± 0,09
	28	1,55± 0,11	1,52± 0,01
S12	24	1,04± 0,00	1,05± 0,01
	28	1,08± 0,05	1,11± 0,07
S4	24	1,37± 0,00	1,47± 0,14
	28	1,75± 0,07	1,59± 0,05
S6	24	1,09± 0,05	1,06± 0,02
	28	1,11± 0,13	1,17± 0,20

Le Tableau 4 nous permet de dire que la sécrétion de lipases par les souches testées n'est pas significativement différente pour les deux milieux. De même, l'augmentation de la température de 24 à 28 °C n'a pas d'effet significatif. Le milieu YNB est alors choisi pour sa simplicité de préparation par rapport au milieu G, ainsi que la température de 28 °C, standard pour les levures dans notre laboratoire. Selon la teneur en substrats carbonés (x $g.L^{-1}$ de glucose et y $g.L^{-1}$ d'huile de colza), 4 milieux YNBH liquides ont alors pu être préparés pour la suite de l'étude : YNBH0 (x = 10 ; y = 0), YNBH1 (x = 9 ; y = 0,5), YNBH2 (x = 1 ; y = 4,5) et YNBH3 (x=0 ; y = 5).

2.2.2 Cinétiques de croissance et de production de lipases en fioles d'Erlenmeyer

La culture dans le milieu YNBH3 (contenant 5 $g.L^{-1}$ d'huile de colza comme seule source de carbone) a été effectuée dans des fioles d'Erlenmeyer selon la méthode décrite dans Matériel et Méthode (§ 6.1). Les cinétiques de divers paramètres tels que la croissance cellulaire, l'activité catalytique dans l'extrait enzymatique et la dégradation du substrat (huile de colza) au cours de la culture ont été étudiées.

La courbe représentant la cinétique de croissance couplée avec celle de l'activité lipolytique des surnageants de culture (déterminée avec l'oléate d'éthyle comme substrat après centrifugation et délipidation comme décrit dans Matériel et Méthodes § 8.1) est rapportée dans la Figure 9. L'activité dans les extraits de S0 et S4 atteint la valeur maximale de 55 et 17 $U.L^{-1}$ respectivement au début de la phase exponentielle (15 h pour S0 et 13 h pour S4). Elle diminue rapidement au-delà de cette durée. Pour S11cnl et S11cl, le maximum d'activité est obtenu à 24 h de culture (100 et 80 $U.L^{-1}$, respectivement). Au-delà de 24 h, l'activité pour S11cl diminue. Pour S11cnl, nous avons arrêté la culture à 24 h et n'avons pas pu vérifier si l'activité diminue de la même façon que pour S11cl. Nous n'avons pas de cinétique d'activité lipolytique des surnagents de S6 et S12 du fait que leur extrait issu des prélèvements au cours de la culture n'a pas d'activité détectable.

Après une concentration par un facteur cinq et une diafiltration (cf. Matériel et Méthodes § 6.3.2), les extraits obtenus ont un niveau d'activité lipolytique qui n'est pas proportionnel au facteur de concentration (Tableau 5). En plus, pour l'extrait de S12 qui n'a pas d'activité détectable tout au long de la culture, nous avons détecté une faible activité (9,7 $U.L^{-1}$) dans son concentrat, contrairement à l'extrait de S6 dont l'activité n'est toujours pas détectable dans nos conditions expérimentales. Une analyse complémentaire dans le culot cellulaire de S6 préparé comme décrit dans Matériel et Méthode (§ 6.3.2) a permis de détecter dans celui-ci une faible activité (0,2 $U.g^{-1}$ de culot). Nous n'avons pas pu conclure si l'absence de l'activité dans le surnagent était due à la dégradation des enzymes au cours de la culture ou au caractère intrinsèque des souches qui ne secréteraient pas d'enzymes.

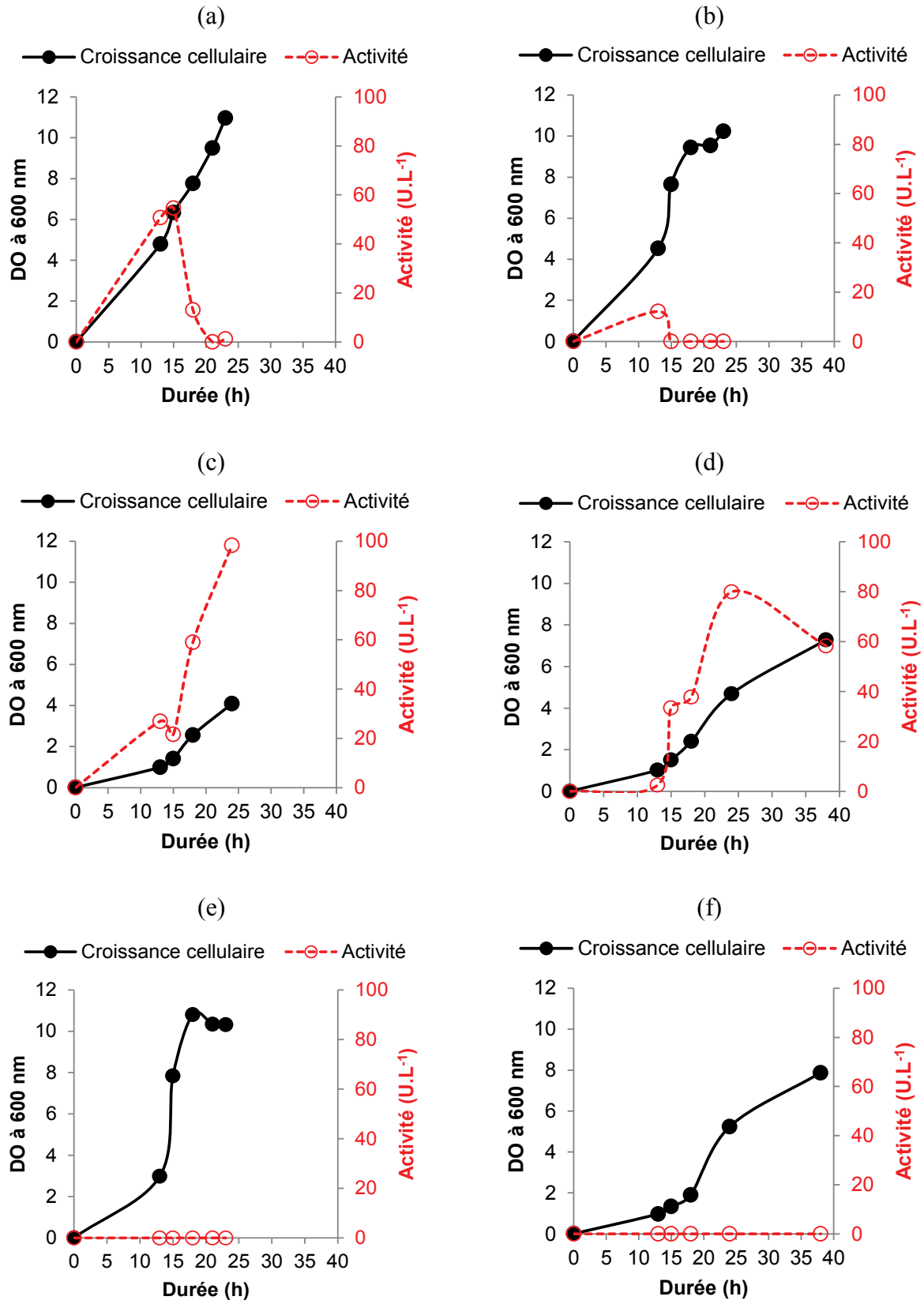


Figure 9 : Croissance *vs* production de lipase (activité d'hydrolyse) dans le milieu YNBH3 ensemencé à 1/10 avec les souches S0 (a), S4 (b), S11cnl (c), S11cl (d), S6 (e) et S12 (f)

L'activité d'hydrolyse dans le surnagent de culture a été déterminée par CPG. Les réactions enzymatiques ont été effectuées pendant 50 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion mécanique)

Tableau 5 : Activité lipolytique dans divers extraits enzymatiques avant et après concentration par ultrafiltration

Les réactions enzymatiques ont été effectuées pendant 50 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion mécanique)

Extraits enzymatiques	Durée de culture (h)	Activité de l'extrait en fin de culture ($U.L^{-1}$)	Activité de l'extrait concentré 5 fois ($U.L^{-1}$)
Extrait de S0	23	1,35	50,6
Extrait de S4	23	nd	32,4
Extrait de S11cnl	24	98,3	141,5
Extrait de S11cl	38	58,5	83,9
Extrait de S12	38	nd	9,7
Extrait de S6	23	nd	nd

nd : non détectable

Une seconde méthode permet de suivre de façon indirecte la production de lipases par les levures. En effet, dans ces conditions de culture les lipases produites par les levures hydrolysent l'huile du milieu et libérent des acides gras et du glycérol, qui servent de sources de carbone et d'énergie. Nous avons donc effectué un suivi de la dégradation de l'huile au cours de la culture (hydrolyse des triglycérides en di- et mono-glycérides, et acides gras, jusqu'à consommation totale). Pour cela des prélèvements de 3 mL de milieu de culture effectués toutes les 3 heures ont été analysés par CCM, qui permet la révélation des composés lipidiques contenus dans le milieu (cf. Matériel et Méthodes § 6.3.1 et § 8.2). Ainsi, la Figure 10 montre que la consommation des composés lipidiques par les souches S4 et S6 est rapide (trace d'acides gras à partir de 15 h de culture) même si l'activité mesurée in vitro est très faible, suivie par S0, S12, S11cl et S11cnl.

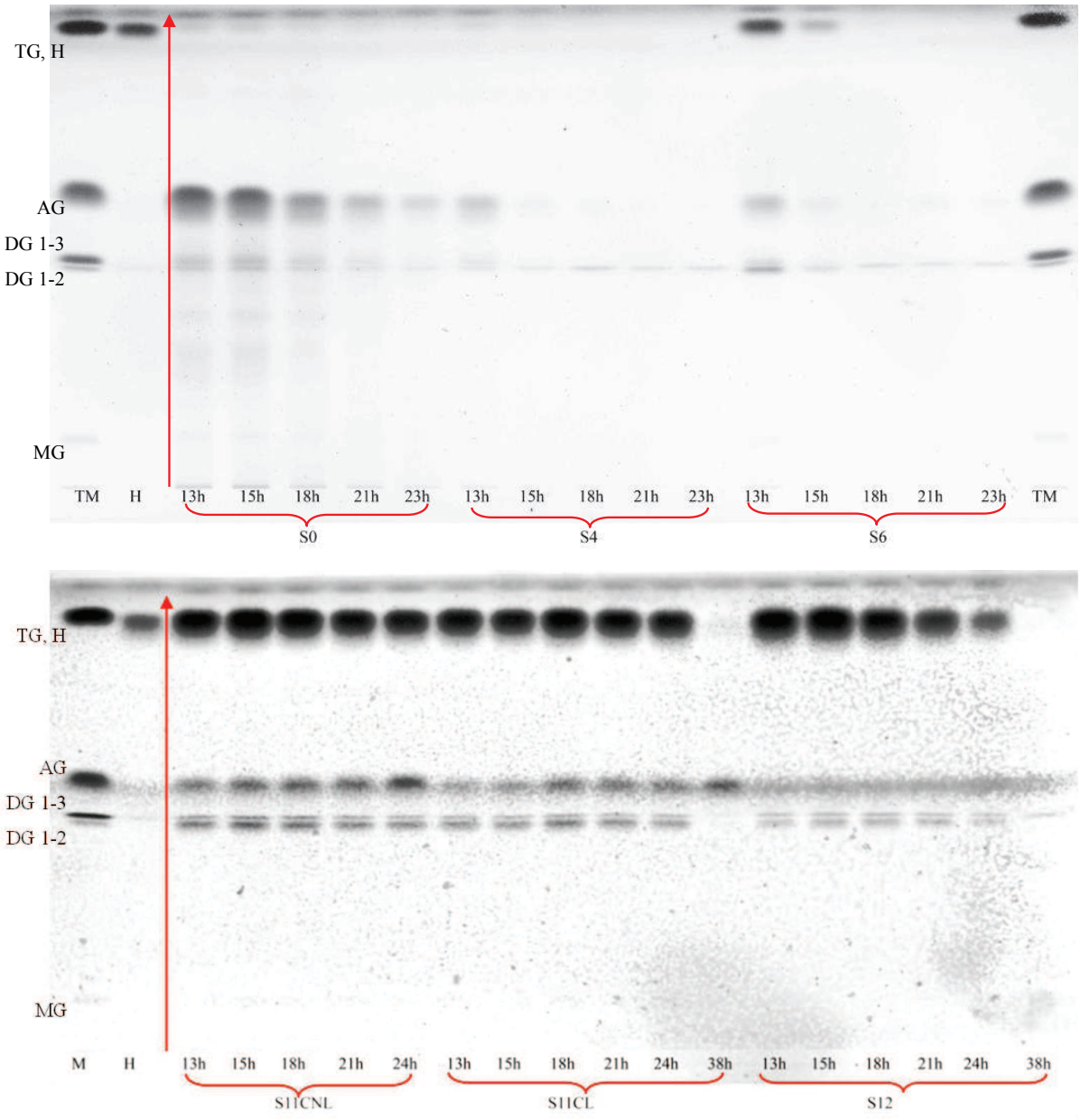


Figure 10 : Dégradation enzymatique des composés lipidiques dans le milieu de culture YNBH3

2.3 Caractérisation des extraits protéiques obtenus

A ce stade, en plus de l'activité lipolytique qui a pu être détectée dans les essais précédents, nous avons étudié l'activité de transestérification des extraits obtenus à partir des surnageants de culture et leur contenu protéique : la pureté des extraits et le poids moléculaire des protéines contenues dans l'extrait par analyse sur gel SDS-PAGE (on recherche des protéines de poids moléculaire proche à celui de CpLIP2) et le degré d'homologie de leurs fragments peptidiques avec ceux de lipases connues.

2.3.1 Capacité de catalyser la réaction de transestérification

L'extrait enzymatique en fin de culture a été concentré 5 fois puis dialysé selon la méthode décrite dans Matériel et Méthodes (§ 6.3.2). La transestérification de l'oléate d'éthyle (émulsion mécanique) avec du méthanol a été testée avec chaque extrait brut concentré. Dans ces conditions, l'activité de transestérification correspond à la formation de l'oléate de méthyle tandis que l'hydrolyse compétitive à celle de l'acide oléique. Le résultat est rapporté dans le Tableau 6.

Le RT le plus important est obtenu avec l'extrait de S0, suivi par celui de S4, S11cl et S11cnl. Pour l'extrait de S0 (contenant CpLIP2), ce résultat paraît logique car avec l'enzyme CpLIP2 recombinante un RT de plus de 90 % est obtenu dans ces conditions expérimentales.

L'extrait de S12 n'a pas d'activité de transestérification détectable bien qu'il y ait une activité d'hydrolyse compétitive. Pour l'extrait de S6 nous n'avons pas pu obtenir de RT car aucune activité n'a pu être détectée dans ces conditions expérimentales.

Dans un mélange de protéines comme notre extrait enzymatique, il est difficile d'avoir un résultat parfaitement interprétable car une ou plusieurs protéines pourraient être actives. Notamment par exemple, la présence simultanée d'une lipase et d'une lipase/acyltransférase pourrait masquer l'activité de la seconde, la lipase catalysant l'hydrolyse des esters au fur et à mesure de leur formation par la lipase/acyltransférase. A défaut de la mise en place d'un protocole de purification, ces éléments devront donc être combinés avec le résultat du séquençage peptidique afin de pouvoir choisir les souches les plus intéressantes pour la suite de l'étude.

Tableau 6 : Activités de transestérification (alcoolyse) et d'hydrolyse pour différents extraits enzymatiques

Les réactions enzymatiques ont été effectuées pendant 50 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 0,5 M de méthanol et de 10 µmol d'oléate d'éthyle (émulsion mécanique)

Extrait en fin de culture concentré 5 fois	Activité d'alcoolyse ($U.L^{-1}$)	Activité d'hydrolyse compétitive ($U.L^{-1}$)	Ratio de transesterification (%)
S0	27,1	0,6	97,8
S4	10,7	17,1	38,5
S6	nd	nd	-
S11cnl	11,0	69,5	13,7
S11cl	8,7	34,8	20
S12	nd	22,2	-

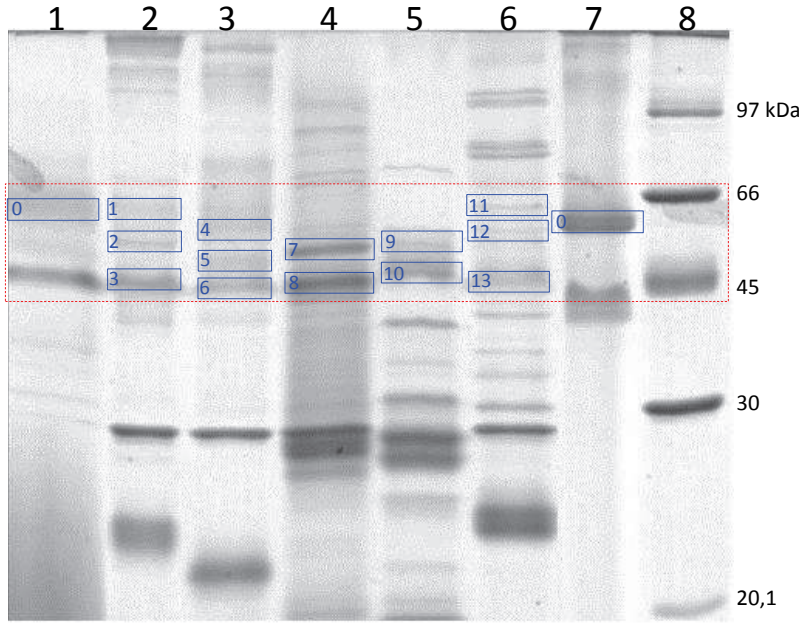


Figure 11 : SDS-PAGE (14 % d'acrylamide) des extraits enzymatiques obtenus après cultures en fioles d'Erlenmeyer

Puits 1 à 8 : extrait S0, S4, S6, S11cnl, S11cl, S12, protéine CpLIP2 et marqueurs de taille. Les échantillons ont été dénaturés (10 min à 25 °C) par une solution de SDS à 5 % (p/v) et déglycolysés (12 h à 37 °C) par l'Endo-H. La bande 0 correspond à CpLIP2. Les bandes 1 à 13 ont fait l'objet de séquençage peptidique.

2.3.2 Identification des protéines contenues dans les extraits enzymatiques

Nous avons analysé des protéines contenues dans les extraits enzymatiques de S0, S4, S11cnl, S11cl, S6 et S12 à partir d'une électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel à 14 % d'acrylamide, selon les méthodes décrites dans Matériel et Méthodes (§ 8.4). Les six extraits enzymatiques concentrés et dialysés par ultrafiltration comme précédemment décrit ont été à nouveau concentrés 30 fois par ultrafiltration en tube Amicon (Millipore, seuil de coupure de 10 kDa). Avant d'être déposés sur gel, les échantillons ont été dénaturés pendant 10 min à 25 °C par une solution de SDS à 5 % (p/v) et déglycosylés pendant 12 h à 37 °C par l'endoglycosidase-H. La protéine CpLIP2 a été utilisée comme référence.

La souche S0 (*C. parapsilosis* CBS 604) est connue pour la production de l'enzyme CpLIP2, de poids moléculaire 54 kDa sous forme déglycosylée (bande 0, puits 1 et 7). Dans la gamme allant de 45 à 66 kDa de poids moléculaire apparent, plus de deux bandes protéiques sont observées dans chaque extrait enzymatique : 3 pour S4 et S6, 6 pour S11cnl dont 2 majoritaires, 3 pour S11cl dont 2 majoritaires et 4 pour S12 dont 3 majoritaires (Figure 11). Nos échantillons sont donc assez riches en protéines, ce qui pourrait s'expliquer par des sécrétions importantes et variées d'enzymes par les souches microbiennes que nous étudions. Une autre explication serait qu'une protéolyse partielle ait eu lieu pendant la préparation des échantillons, multipliant ainsi le nombre de bandes. Nous y reviendrons dans la partie suivante de ce chapitre (§ 3.2). Sous l'hypothèse que ces conditions de préparation et d'analyse soient adéquates, les bandes majoritaires se situant entre 45 et 66 kDa ont été numérotées (1, 2, 3, …13) et isolées à partir du gel en vue du séquençage peptidique dont le résultat est rapporté ci-après.

Nous avons également essayé de mettre au point une méthode d'analyse d'électrophorèse des protéines en conditions natives en vue de l'identification fonctionnelle des protéines actives contenues dans les surnagents de culture. Dans ces conditions, le gel de polyacrylamide, le tampon de migration et le tampon de charge sont exempts de SDS pour que les protéines actives, une fois séparées sur gel, puissent être mises en évidence par la révélation spécifique (cf. Matériel et Méthodes § 8.4). Pourtant, les protéines comme CpLIP2 ne donnent pas de bandes fines et bien séparées, mais au contraire des bandes qui diffusent en formant un fuseau (« smear »). Dans ce contexte, l'idée était de trouver une concentration optimale en polyacrylamide du gel et un ratio massique SDS/protéine permettant une bonne

séparation des protéines (bandes fines) sans les désactiver afin que la révélation spécifique après séparation soit possible. Finalement, nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants et cette piste a été abandonnée.

2.3.3 Séquençage peptidique

L'objectif du séquençage peptidique est d'identifier si, parmi les bandes sélectionnées pour leur poids moléculaire, certaines présentent des homologies avec des lipases connues. Les 13 bandes de protéines identifiées dans les six extraits analysés par SDS-PAGE ont été digérées par la trypsine. Les fragments peptidiques ont été séparés par HPLC avant d'être analysés par spectrométrie de masse. Finalement la masse ainsi obtenue de chaque fragment a été utilisée comme référence pour interroger les bases de données avec le logiciel Mascot, afin d'identifier la ou les potentielles séquence(s) correspondante(s). Le Tableau 7 montre que certains des fragments peptidiques constituants les protéines contenues dans les extraits de S4, S6 et S12 sont appariés à ceux des lipases :

- Extrait de S4 : phospholipases de *Neurospora crassa* (bande 1), et lipases 4, 5, 8 et 9 de *C. albicans* SC5314 (bande 2).
- Extrait de S6 : lipase/acyltranférase CpLIP2 de *C. parapsilosis* (bande 4 remarquable avec 3 fragments peptidiques appariés à ceux de CpLIP2) ce qui est intéressant du point de vue de la séquence, en dépit de l'absence d'activité catalytique détectée dans cet extrait.
- Extrait de S12 : un fragment peptidique issu des bandes 11 et 12 qui s'apparie à celui de la lipase 10 de *C. albicans* SC5314.

Par ailleurs, même si une activité lipasique a pu être détectée dans les extraits de S11cnl et S11cl, aucun de leurs fragments peptidiques séquencés n'est apparié à des lipases connues (ils correspondent surtout à des protéines hypothétiques d'*Ustilago maydis* (Annexe 5 et Annexe 6)).

A partir de ces résultats, les souches S4, S6 et S12 s'avèrent intéressantes pour la suite de notre étude car elles produisent des protéines dont certains fragments sont homologues à ceux de lipases, notamment les lipases de *C. albicans* ou CpLIP2. En effet, les lipases de *C. albicans* sont connues non seulement pour leurs homologies importantes par rapport à CpLIP2 (jusqu'à 60 % d'identité), mais aussi pour la fonctionnalité catalytique que partage avec CpLIP2 la lipase/acyltransférase CaLIP4 [Roustan *et al.*, 2005]. Par ailleurs, avec 3

peptides dans son extrait appariés à la séquence de CpLIP2, S6 est la souche la plus prometteuse sur ce critère d'homologie.

Tableau 7 : Résultats du séquençage peptidique obtenus à partir des extraits enzymatiques analysés par gel SDS-PAGE (Figure 11)

Les résultats détaillés ont été rapportés en annexes 3, 4, 5, 6 et 7.

Souche	**Bande (**Figure 11**)**	**Homologie avec une lipase connue**	**Peptide(s) homologue(s) à ceux d'une lipase connue**	**Lipase homologue**
S4	1	oui	R.VLHGYTLTK.E	Phospholipase C de *Neurospora crassa*
	2	oui	K.QSGQAVLNSIR.A	Lipases 4, 5, 8 et 9 de *C. albicans* SC5314
	3	non		
S6	4	oui	K.STFTVGLQSGR.A ; R.ASNLEYPGTPQSIK.N ; R.NVPNPLTNVFTPVK.V	Lipase/acyltransférase CpLIP2 de *C. parapsilosis*
	5	non		
	6	non		
S11cnl	7	non		
	8	non		
S11cl	9	non		
	10	non		
S12	11	oui	R.QSGKATLNSIR.A	Lipase 10 de *C. albicans*
	12	oui	R.QSGKATLNSIR.A	Lipase 10 de *C. albicans*
	13	non		

2.4 Conclusions

Dans cette étude préliminaire des souches sauvages, notre apport a consisté tout d'abord à présélectionner, parmi 17 souches voisines de *C. parapsilosis* CBS 604, 6 souches sécrétant une lipase sur milieu sélectif. A partir des souches présélectionnées, des essais de culture ont été réalisés dans différentes conditions afin de déterminer des conditions de production en milieu liquide. Divers paramètres tels que la composition du milieu, la température, la cinétique de la croissance cellulaire et de dégradation des composés lipidiques au cours de la culture ont été étudiés. Des surnageants de culture ont été préparés sur le milieu YNBH3 pour toutes les souches présélectionnées et analysés pour leur activité enzymatique et leur contenu en protéines : étude de la complexité des extraits par électrophorèse et sélection de protéines dont la masse moléculaire est proche de celle de CpLIP2. Les protéines alors sélectionnées ont été séquencées (séquençage peptidique) pour la recherche d'homologie de séquence avec des lipases connues. L'ensemble des résultats ont servi de critères de sélection pour retenir quatre souches pour une étude plus approfondie de production et caractérisation d'enzymes en vue de l'obtention de nouvelles lipases/acyltransférases. Les 4 souches finalement sélectionnées sont *Candida viswanathii* CBS4024 (S4), *Candida maltosa* CBS5611 (S6), *Pseudozyma antarctica* CBS516.83 (S11cl) et *Pichia guilliermondii* CBS2030 (S12) :

- S4 a permis la production d'un extrait présentant une activité lipase et acyltransférase et dont deux des protéines présentent une homologie avec des phospholipases de *Neurospora crassa* et des lipases de *Candida albicans*.
- S6 a permis la production d'un extrait dont une des protéines présente une forte homologie avec la lipase CpLIP2.
- S11cl a permis la production d'un extrait présentant une activité lipase et acyltransférase.
- S12 a permis la production d'un extrait présentant une activité lipase et dont deux protéines présentent des homologies avec la lipase 10 de *C. albicans*.

La méthode de dosage d'activité lipolytique en présence de l'oléate d'éthyle émulsifié par agitation mécanique à l'aide de barreau aimanté apparait peu sensible pour permettre de détecter une faible activité dans les extraits enzymatiques tels que celui de S6 et de S12. Par la suite, les analyses d'activité seront basées sur une deuxième méthode, pour laquelle le substrat est émulsifié par sonication en présence de l'alcool polyvinylique (PVA) (cf. Matériel et Méthodes § 8.1) et qui permet de doser des activités près de dix fois plus faibles.

Dans ce contexte, deux pistes de travail ont alors été explorées :

1- La recherche de conditions de culture plus favorables à l'expression de lipases, surtout pour les souches S6 et S12.
2- D'autres substrats que l'oléate d'éthyle ont été testés pour révéler plus largement l'activité des enzymes produites par les souches sélectionnées.

3 SELECTION D'UNE SOUCHE DE LEVURE SECRETANT UNE NOUVELLE LIPASE/ACYLTRANSFERASE

L'étude préliminaire nous a permis de retenir 4 souches de levures (S4, S6, S11cl et S12) présentant des caractéristiques intéressantes**.** Pour la suite de l'étude, nous nous sommes attachés à améliorer les conditions de production d'extraits enzymatiques. Les cultures ont été réalisées en fermenteur, où les paramètres de température, agitation, aération sont mieux contrôlés qu'en fiole et permettent en général de meilleurs rendements. La caractérisation biochimique des extraits obtenus a ensuite été réalisée, en utilisant la lipase/acyltransférase CpLIP2 et la lipase CaLA de *C. antarctica* comme références.

3.1 Amélioration du milieu de culture

Des cultures des quatre souches en fiole d'Erlenmeyer dans différents milieux avec des ratio huile/sucre variables (YNBH1, YNBH2 et YNBH3) ont été menées, sur des durées adaptées aux vitesses de croissance des souches (cf. Matériel et Méthodes § 6.1). Les trois milieux se distinguent par leur teneur en substrats carbonés (x $g.L^{-1}$ de glucose et y $g.L^{-1}$ d'huile de colza) : YNBH1 (x = 9 ; y = 0,5), YNBH2 (x = 1 ; y = 4,5) et YNBH3 (x=0 ; y = 5).

La biomasse dans le milieu de culture ainsi que l'activité d'hydrolyse sur l'oléate d'éthyle de l'extrait enzymatique (surnageant délipidé) sont rapportés Figure 12. Nous pouvons observer que le milieu de culture le mieux adapté pour la souche S4 est YNBH2 et pour la souche S11cl, YNBH1. La sécrétion de lipase par la souche S4 est donc induite par une quantité importante d'huile et semble être réprimée par la présence d'une quantité élevée de glucose.

Contrairement à la souche S4, le glucose n'est pas le répresseur de la sécrétion de lipase pour la souche S11cl, mais est absolument nécessaire pour sa croissance. La sécrétion de lipase par cette souche est induite par juste une petite quantité d'huile.

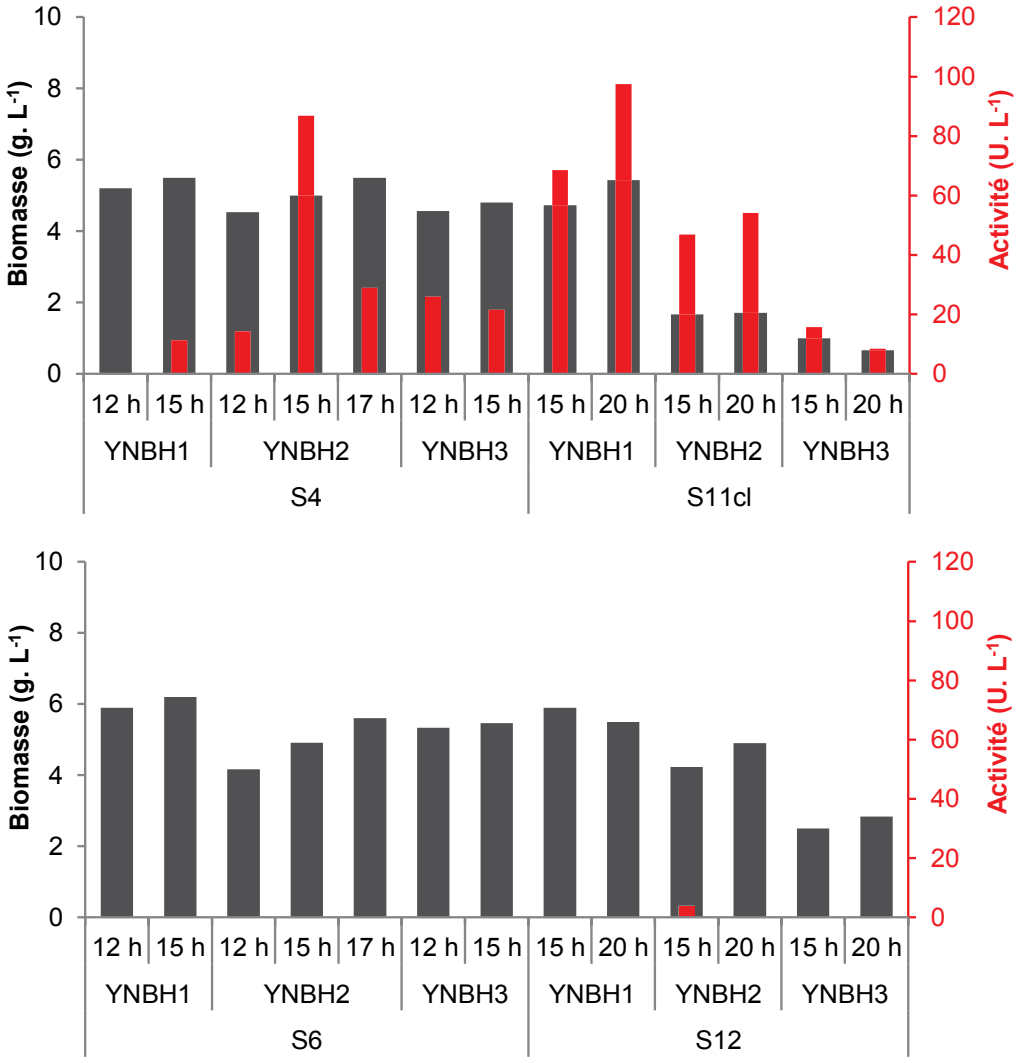


Figure 12 : Activité d'hydrolyse sur l'oléate d'éthyle dans le surnageant de culture et quantité de biomasse pour les quatre souches cultivées dans différents milieux de culture

Selon la teneur en substrats carbonés (x g.L^{-1} de glucose et y g.L^{-1} d'huile de colza), 3 milieux YNBH liquides ont été testés : YNBH1 (x = 9 ; y = 0,5), YNBH2 (x = 1 ; y = 4,5) et YNBH3 (x=0 ; y = 5). Les résultats sur l'activité pour les souches S4, S6, S11cl et S12, donnés en U.L^{-1} d'extrait enzymatique, sont obtenus par analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) après 15 min de réaction catalytique à 30 °C pH 6,5 en présence de chaque extrait enzymatique et de 10 µmol d'émulsion PVA d'oléate d'éthyle.

L'activité d'hydrolyse du surnageant de S12 vis-à-vis de l'oléate d'éthyle n'est détectable que sur le milieu YNBH2 (à 15 h de culture), contrairement au surnageant de S6 pour lequel aucune activité n'a pu être détectée, quel que soit le milieu de culture utilisé. Une analyse complémentaire par CCM des produits de réaction d'hydrolyse de la trioléine (Figure 13) nous a permis de confirmer que le milieu YNBH2 est le mieux adapté pour la souche S12, tandis que le milieu YNHB3 est le seul sur lequel une faible activité sur trioléine est détectable avec l'extrait de la souche S6. En résumé, nous avons retenu les milieux YNBH1, YNBH2, YNBH3 respectivement pour les souches S11cl, S4/S12 et S6 pour la production de lipase en fermenteur.

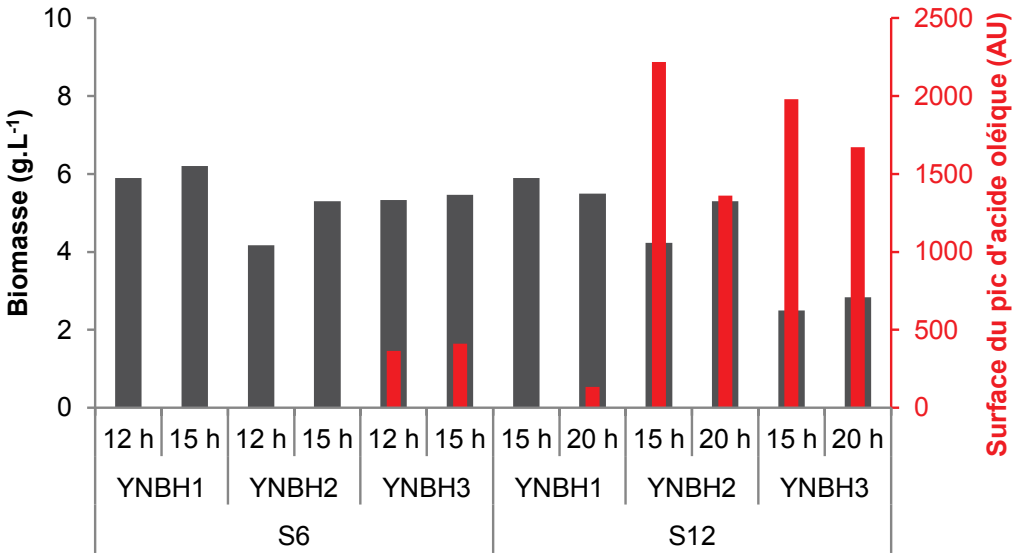


Figure 13 : Activité d'hydrolyse de la trioléine dans le surnagent de culture et quantité de biomasse pour les souches S6 et S12 cultivées dans différents milieux

Selon la teneur en substrats carbonés (x g.L^{-1} de glucose et y g.L^{-1} d'huile de colza), 3 milieux YNBH liquides ont été testés : YNBH1 (x = 9 ; y = 0,5), YNBH2 (x = 1 ; y = 4,5) et YNBH3 (x=0 ; y = 5). Les valeurs d'activités sont en unité de densité de la bande d'acide gras obtenues par l'analyse sur chromatographie sur couche mince (CCM) après 60 min de réaction catalytique à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 µmol d'émulsion PVA de trioléine et de chaque extrait enzymatique correspondant.

3.2 Production et caractérisation de lipases

La production de lipase en fermenteur a été effectuée selon la méthode décrite dans la partie Matériel et Méthodes (§ 6.2.1). Dans ces conditions en fermenteur, où l'aération peut être contrôlée et optimisée, la concentration en source de carbone a été doublée afin de produire 2 fois plus de biomasse.

La Figure 14 montre que la biomasse est en phase exponentielle de croissance entre 9 et 18 h de culture pour la souche S4 et entre 0 et 18 h de culture pour la souche S11cl. L'activité lipase est légèrement découplée de cette croissance (décalage dans le temps et l'optimum). En effet, l'activité continue à croitre même pendant la phase stationnaire. En fin de culture, l'activité pour S4 et S11cl est respectivement de 388 et 427 $U.L^{-1}$ de surnageant enzymatique et la concentration en protéines (éq. de CpLIP2) est de 95 et 134 $mg.L^{-1}$. Par rapport à l'étape d'optimisation où la culture a été faite dans les fioles d'Erlenmeyer, la culture en fermenteur a permis de multiplier l'activité produite par un facteur 4 à 5. L'analyse du contenu protéique des surnageants de culture de S4 et S11cl en fermenteur (Figure 16) montre que ces extraits sont beaucoup plus propres que ceux obtenus lors des premières expériences en fiole (Figure 11) : on n'observe que 2 bandes entre 45 et 66 kDa pour S4 (dont une majoritaire) et 3 bandes pour S11cl. En plus, les conditions de traitement des échantillons pour l'analyse, lors de l'étape de déglycosylation, ont été améliorées en réduisant le temps de traitement à 37 °C de 12 h à 1 h, ce qui a permis de limiter la dégradation des protéines (thermosensibles et/ou hydrolysées par des protéases du milieu).

La latence apparente pour la souche S12 est estimée à 6 h de culture et la phase exponentielle de croissance qui la suit finit tard (30 h de culture) malgré un volume d'ensemencement le plus important (1/10) par rapport aux autres souches. En effet, la biomasse dans la troisième préculture utilisée pour l'ensemencement de cette culture a été initialement faible, ce qui résultait en une biomasse au temps zéro de la fermentation de 0,09 $g.L^{-1}$ contre 0,5 $g.L^{-1}$, 0,25 $g.L^{-1}$ et 0,17 $g.L^{-1}$ respectivement pour les souches S4, S11cl et S6. Par ailleurs, l'activité dans le surnageant est faiblement détectable en présence d'oléate d'éthyle (5 $U.L^{-1}$), ce qui tend à confirmer que ce substrat n'est pas idéal pour suivre l'activité produite par cette souche. L'activité lipasique dans le surnageant est couplée à la production de biomasse et se stabilise parallèlement à la phase stationnaire. L'analyse SDS-PAGE (Figure 16) nous montre que l'extrait de S12 contient de nombreuses protéines dont certaines bandes se trouvent sous forme fuseau, sans qu'une protéine majoritaire ne se distingue.

La souche S6, quant à elle, a une bonne croissance sur le milieu YNBH3 mais son extrait enzymatique ne présente toujours pas d'activité détectable en présence d'oléate d'éthyle. Nous avons remplacé ce dernier par la trioléine afin de vérifier si cette absence en activité vient de la spécificité de substrat. Le résultat d'analyse par CCM de l'acide oléique libéré après réaction enzymatique en présence de l'extrait de S6 (10 mM d'émulsion de trioléine, 30 °C, pH 6,5) nous montre que l'extrait de S6 n'a pas d'activité (Figure 15). En effet, l'intensité de la bande d'acide oléique détecté est très faible et n'a pas augmenté avec la durée de la réaction, contrairement aux résultats obtenus avec les extraits de S4, S11cl et S12. Finalement, la souche S6 ne semble pas sécréter de lipase active dans ce milieu de culture. Cependant, le milieu YNBH3 étant composé exclusivement d'huile comme source de carbone, la souche S6 est capable de le métaboliser puisque que sa courbe de croissance est normale sur ce milieu (Figure 14.c). En fait, comme lors de l'expérience précédente (§ 2.2.2), une activité catalytique vis-à-vis de l'oléate d'éthyle a pu être détectée dans le culot cellulaire en fin de culture sur le milieu YNBH3. Comme les triglycerides ne sont pas considérés comme pouvant pénétrer directement dans les cellules, nous pouvons supposer que la production de lipase active par cette souche est pariétale. Il est ainsi difficile de relier cette activité à la protéine identifiée dans le surnageant de S6, dont le poids moléculaire est proche de celui de CpLIP2 (Figure 16) et qui présente une bonne homologie avec cette dernière (Bande 4, Tableau 7). Une étude plus approfondie du contenu protéique intracellulaire de S6 pourrait apporter des éléments de réponse mais dans notre cas, nous sommes à la recherche de lipases sécrétées afin de faciliter les étapes de récolte.

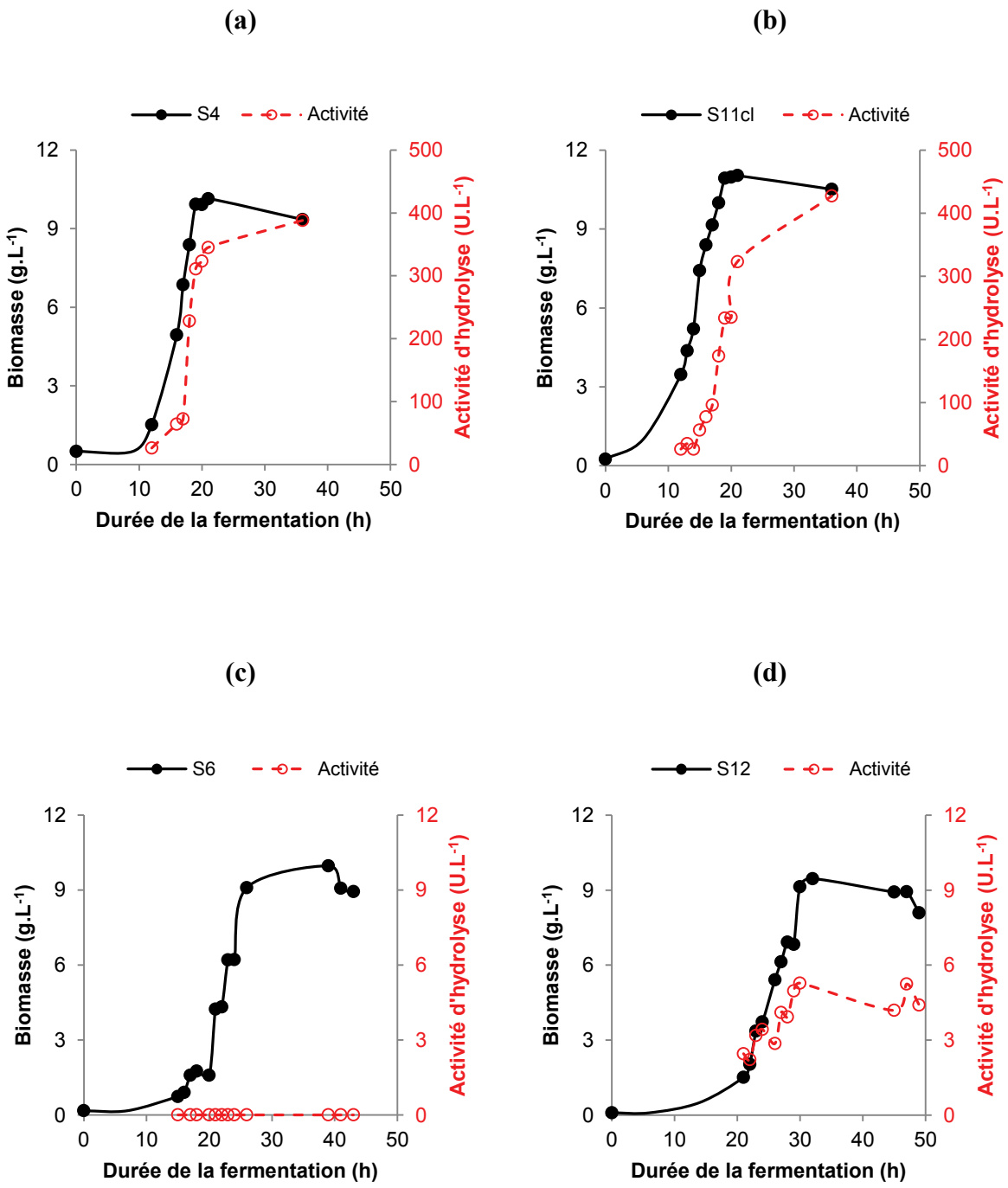


Figure 14 : Variation de la quantité de biomasse (trait continu) et de l'activité d'hydrolyse du surnageant sur l'oléate d'éthyle (trait pointillé) au cours de la culture en fermenteur pour les quatre souches

(a) S4 milieu YNBH2 (2 g.L^{-1} de glucose et 9 g.L^{-1} d'huile de colza), (b) S11cl milieu YNBH1 (18 g.L^{-1} de glucose et 1 g.L^{-1} d'huile de colza), (c) S6 milieu YNBH3 (0 g.L^{-1} de glucose et 10 g.L^{-1} d'huile de colza) et (d) S12 milieu YNBH2 ; Condition d'ensemencement de culture : 1/20 pour S4 et S6, 1/40 pour S11cl et 1/10 pour S12 ; Les résultats sur l'activité exprimés en U.L^{-1} de surnagent enzymatique sont obtenus après 15 min de réaction à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 µmol d'émulsion PVA d'oléate d'éthyle.

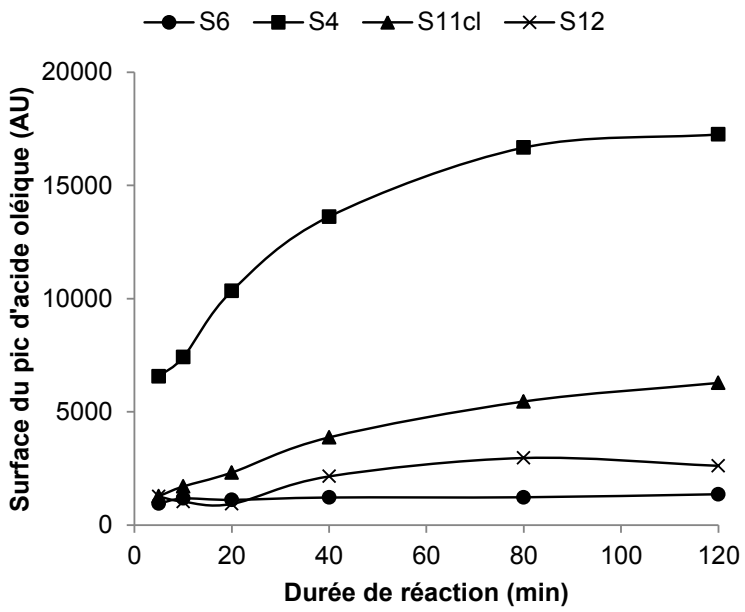


Figure 15 : Cinétique réactionnelle de l'hydrolyse de la trioléine par les extraits enzymatiques de S4, S11cl, S6 et S12

La réaction se fait dans 7 mL de milieu contenant 5,6 mL de tampon de phosphate (50 mM, pH 6,5), 10 mM d'émulsion de trioléine et 700 µL d'extrait enzymatique concentré 5x. Le résultat est exprimé en intensité de la bande d'acide oléique libéré.

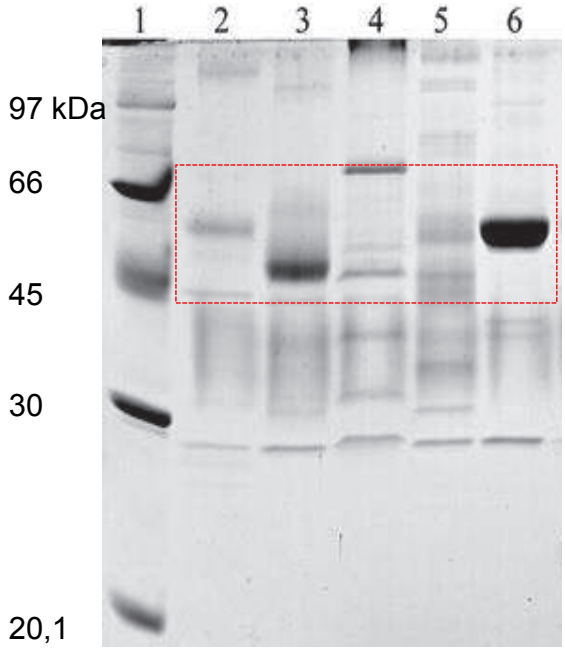


Figure 16 : SDS-PAGE (14 % d'acrylamide) des extraits enzymatiques obtenus après des cultures en fermenteur

Puits 1: marqueur de taille, 2 : S4, 3 : S6, 4 : S11cl, 5 : S12 et 6 : CpLIP2. Les échantillons ont été dénaturés (10 min à 25 °C) par un tampon dénaturant (5 % (p/v) de SDS et 0,4 M de DTT) et déglycosylés (1 h à 37 °C) par l'Endo-H.

Finalement les souches S4 (*C. viswanathii* CBS 4024) et S11cl (*P. antarctica* CBS 516.83) ont été retenues pour la suite de l'étude puisqu'elles produisent des surnageants de culture capables d'hydrolyser l'oléate d'éthyle avec des niveaux d'activité importants (près de 400 $U.L^{-1}$). Les extraits S4 et S11cl ont ainsi fait l'objet d'une caractérisation comparative avec les enzymes recombinantes CpLIP2 et CaLA pour leur capacité à catalyser la réaction de transestérification. Pour cela, des essais de réaction sur l'oléate d'éthyle en présence de concentrations croissantes en méthanol ont été réalisés. La Figure 17 montre qu'en présence de doses croissantes de méthanol, l'extrait de S4 a un comportement catalytique proche de celui de CpLIP2 alors que l'extrait de S11cl est plus proche de celui de CaLA et donc de celui des lipases classiques. En effet, à 1 M de méthanol, CpLIP2 et l'extrait de S4 présentent un ratio de transestérification (RT) respectivement de 91 % et de 66 % alors que le RT des autres préparations enzymatiques est au voisinage de 30 %.

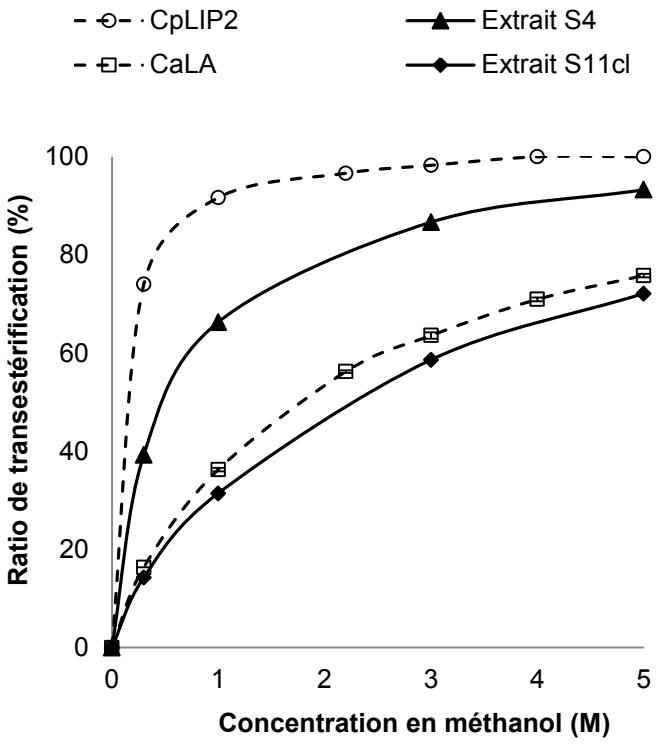


Figure 17 : Ratio de transestérification en fonction de la concentration en méthanol dans le milieu réactionnel contenant différentes préparations enzymatiques (Extrait S4, Extrait S11cl, enzyme CpLIP2, enzyme CaLA)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 µmol d'émulsion PVA d'oléate d'éthyle et des concentrations croissantes de méthanol. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité de transestérification par rapport à l'activité totale (transestérification + hydrolyse compétitive).

Lorsque la concentration en méthanol augmente à 5 M, le RT de l'extrait de S4 augmente à 93 %, ce qui le rapproche de celui de CpLIP2. En plus, nous observons l'effet inhibiteur du méthanol tant sur l'activité totale de l'extrait de S4 que sur celle de CpLIP2 à partir d'une concentration de 3 M (Figure 18). La souche S4 sécrète donc une ou plusieurs lipase/acyltransférase(s) active(s). Dans la mesure où peu de protéines sont retrouvées dans cet extrait (Figure 16), deux bandes de protéines de poids moléculaire estimé à 45 et 58 kDa apparaissent les plus intenses sur gel d'électrophorèse). Le comportement catalytique observé devrait pouvoir être retrouvé avec une de ces protéines purifiées (ou les deux). Ces propriétés lipase/acyltransférase(s) confèrent à la souche S4 un intérêt particulier pour une étude approfondie.

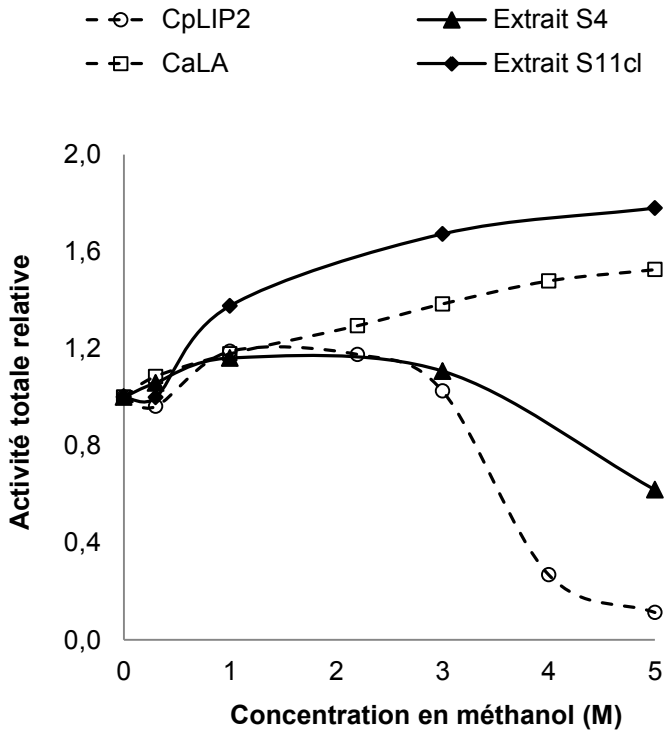


Figure 18 : Activité totale (transestérification + hydrolyse compétitive) en fonction de la concentration en méthanol dans le milieu réactionnel contenant différentes préparations enzymatiques (Extrait S4, Extrait S11cl, enzyme CpLIP2, enzyme CaLA)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 µmol d'émulsion d'oléate d'éthyle et des concentrations croissantes de méthanol (même expérience que dans la Figure 17). Les valeurs sont exprimées relativement à l'activité d'hydrolyse (condition sans méthanol) : 3,9 ; 3,2 ; 63 et 0,69 U.mg^{-1} de protéine (éq. de CpLIP2) respectivement pour l'extrait de S4, de S11cl, l'enzyme CpLIP2 et l'enzyme CaLA.

4 PRODUCTION ET CARACTERISATION DE LA LIPASE/ACYLTRANSFERASE DE *C. VISWANATHII*

4.1 Cinétiques de production en fermenteur

La culture de *C. viswanathii* CBS 4024 (S4) en conditions contrôlées (régulation de pH, température, aération) en fermenteur sur milieu YNBH2 a été répétée afin d'avoir des cinétiques complètes de croissance, de production de protéines et d'activité lipolytique.

Dans ces conditions de culture sur milieu YNBH2 (Figure 19), la phase de latence (0 à 5 h) est suivie de la phase de croissance (avec un taux de croissance maximal μ_{max} de 0,33.h^{-1} et un temps de génération Tg de 2,1 h) et s'ensuit la phase stationnaire finale (>15 h). La relation biomasse/densité optique du milieu de culture a également été établie (Annexe 2).

Nous constatons que les courbes représentant la biomasse, la concentration en protéines totales et l'activité dans le surnagent de culture en fonction du temps ne sont pas couplées aux unes aux autres. Bien que la quantité de protéines contenues dans le surnageant de culture augmente dès le début de la phase de croissance, l'activité lipasique (hydrolyse de l'oléate d'éthyle) n'apparait qu'au milieu de cette phase avec un niveau qui n'est pas corrélé à la concentration en protéines. L'activité lipase continue à augmenter pour atteindre son optimum pendant la phase stationnaire, avant de diminuer. Pendant la phase stationnaire, la concentration en protéines totales est stationnaire. Cette absence de corrélations pourrait être expliquée par le fait que même si la concentration en lipase(s) active(s) dans le milieu de culture augmente, celle d'autres protéines diminue suite à la réduction ou l'arrêt de leur sécrétion et/ou à la dégradation de ces dernières.

Finalement, nous observons que le maximum d'activité lipasique est obtenu à 25 h de culture, soit 10 h après la fin de la phase exponentielle de croissance.

Il est nécessaire de noter que les cellules de la souche S4 ont tendance à flotter en présence d'huile et donc à être projetées vers la surface interne de la paroi du fermenteur. Cela a des conséquences négatives sur la croissance cellulaire globale et la production de lipase.

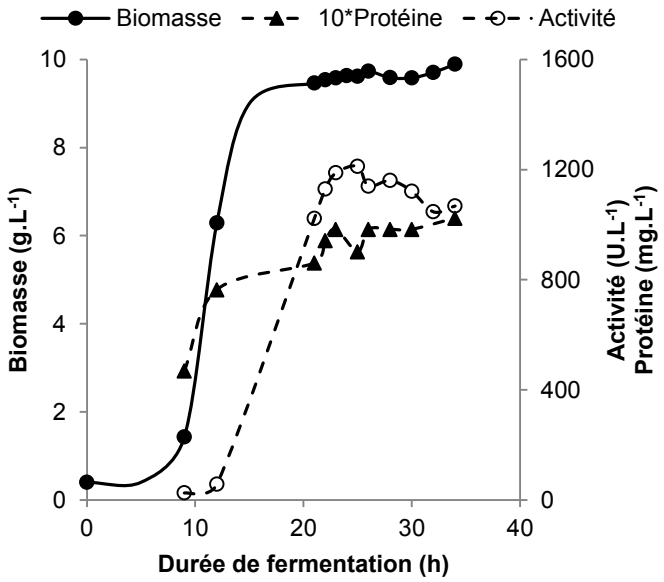


Figure 19 : Evolution de la biomasse, des protéines totales et de l'activité lipasique au cours de la culture en fermenteur de la souche S4 dans le milieu YNBH2

Composition du milieu YNBH2 : 2 g.L^{-1} de glucose et 9 g.L^{-1} d'huile de colza ; Ensemencement : 1/20 ; La concentration en biomasse est exprimée g de matière sèche cellulaire ; Les protéines ont été dosées par méthode de Bradford en utilisant CpLIP2 comme étalon ; L'activité lipasique exprimée en U.L^{-1} de surnageant enzymatique est obtenue par analyse des lipides par CPG après 15 min de réaction à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 µmol d'émulsion PVA d'oléate d'éthyle.

4.2 Caractérisation biochimique des extraits enzymatiques de *C. viswanathii*

4.2.1 Contenu protéique

Nous avons vu précédemment que l'extrait enzymatique issu de la culture en fermenteur de la souche S4 dans le milieu YNBH2 renferme 2 protéines de masse moléculaire de 45 et de 58 kDa (Figure 16). Les deux protéines sont ainsi nommées respectivement CvisL1 et CvisL2.

Nous avons effectué les analyses SDS-PAGE des extraits enzymatiques issus de prélèvements choisis à différents temps au cours des cultures de *C. viswanathii*. Dans un premier temps, la quantité de protéine dans des extraits issus de différents prélèvements a été normalisée avant l'analyse. Après dénaturation et déglycosylation, 10 µg (éq. de CpLIP2) des

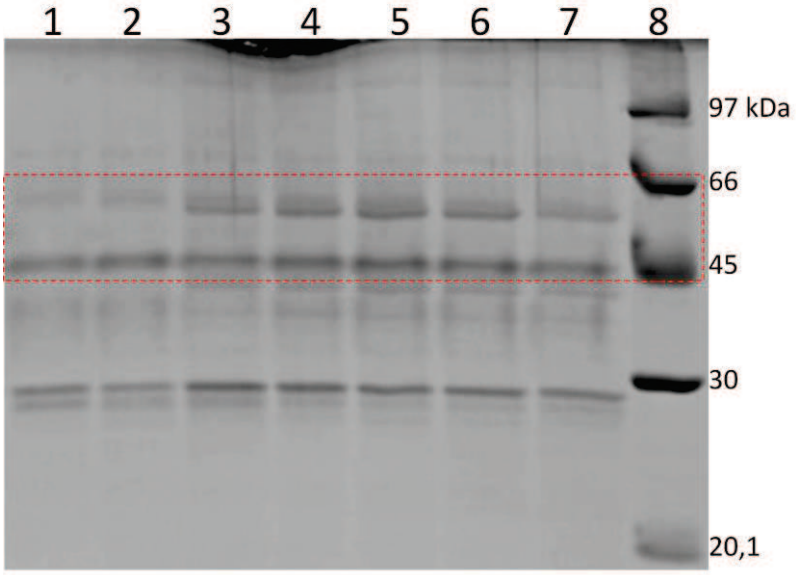


Figure 20 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques prélevés à différents temps au cours de la culture en fermenteur dans le milieu inducteur YNHB2

Puits 1: 9 h, 2 : 12 h, 3 : 21 h, 4 : 23 h, 5 : 25 h, 6 : 28 h, 7 : 34 h et 8 : marqueurs de taille ; Les échantillons ont été dénaturés (10 min à 25 °C) par une solution tampon contenant 5 % (p/v) de SDS et 0,4 M de DTT, et déglycosylés (1 h à 37 °C) par l'Endo-H.

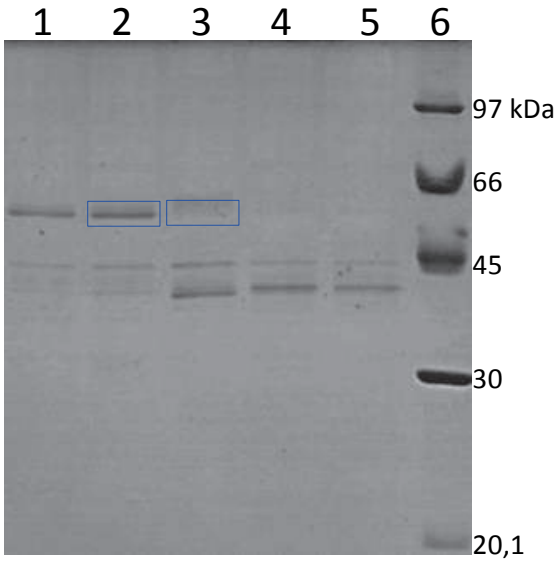


Figure 21 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques prélevés à différents temps au cours de la culture en fermenteur dans le milieu inducteur YNBH2 (1,2) et le milieu répresseur YNBH0 (3-5)

Puits 1 et 2: extrait de 23 h et de 25 h du milieu YNBH2 (contenant 2 g.L^{-1} de glucose et 9 g.L^{-1} d'huile de colza) ; Puits 3, 4 et 5 : extrait de 13 h, de 19 h et de 23 h du milieu YNBH0 (ne contenant que 20 g.L^{-1} de glucose) ; Puits 6 : marqueur de taille. Encadrement : protéine CvisL2 ; Les échantillons ont été dénaturés (10 min à 25 °C) par un tampon dénaturant (5 % (p/v) de SDS et 0,4 M de DTT) et déglycosylés (1 h à 37 °C) par l'Endo-H.

échantillons ont été déposés sur gel d'électrophorèse. La Figure 20 montre que CvisL1 (bande de 45 kDa) est présente dès le début et tout au long de la culture alors que CvisL2 (bande de 58 kDa) apparaît de plus en plus intense de 9 h à 25 h et diminue légèrement en intensité de 28 h à 34 h. CvisL2 pourrait donc être la lipase dont l'activité a été détectée dans les échantillons correspondants (Figure 19).
Pour confirmer cette hypothèse, une seconde analyse a été effectuée en présence d'extraits issus de la culture en fermenteur dans le milieu YNBH0, qui ne contient pas d'huile, mais uniquement du glucose. La Figure 21 montre qu'en absence d'inducteur, la bande CvisL2 (58 kDa) apparaît très faible pour l'extrait de 13 h et disparaît pour les extraits de 19 h et 23 h. Par contre, la bande de CvisL1 (45 kDa) est présente tout au longue de cette culture. Ainsi, la présence d'huile induit la sécrétion de CvisL2, mais ne semble pas influencer la sécrétion de CvisL1.

Finalement, nous pouvons dire que la protéine CvisL2 est très probablement la lipase/acyltransférase recherchée. La bande protéique correspondante a été envoyée au laboratoire « Biopolymères, Biologie structurale » (BIBS) de Nantes pour son séquençage peptidique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats, toujours en attente à l'heure actuelle, seront à comparer avec le premier résultat de séquençage (Tableau 7) et serviront de base pour la recherche du gène codant pour cette enzyme d'intérêt.

4.2.2 Specificité de substrat

Nous avons étudié la spécificité de substrat de l'extrait enzymatique de *C. viswanathii*. Pour cela, des essais réactionnels ont été réalisés en présence du mélange d'esters éthyliques d'acides gras en C8-C18 selon la méthode décrite dans § 8.1. Figure 22 montre que l'extrait de *C. viswanathii* est très spécifique vis-à-vis du C16 (acide palmitique). Dans ces conditions, l'extrait n'a pas d'activité sur les chaines les plus courtes (C8 et C10), ni sur la plus longue (C18). Ce résultat montre que cet extrait enzymatique pourrait être très intéressant pour des applications spécifiques dédiées à la conversion de l'ester en C16 contenu dans un mélange de substrats.

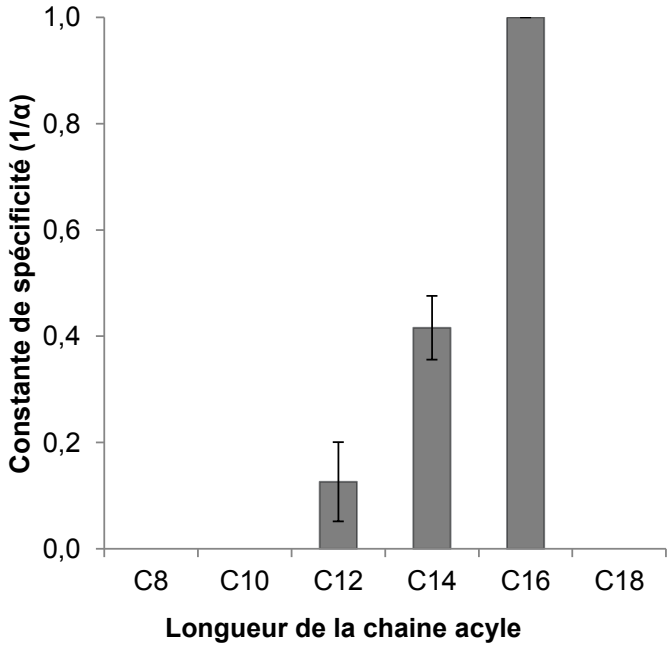


Figure 22 : constante de spécificité (1/α) pour l'hydrolyse d'un mélange d'esters d'acides gras saturés C8-C18 catalysée par l'extrait enzymatique de *C. viswanathii*

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM de mélange d'esters (émulsion PVA). Les résultats sont la moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

4.2.3 Influence du pH sur l'activité catalytique

L'effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité catalytique de l'extrait de *C. viswanathii* a été étudié en condition d'hydrolyse (sans méthanol). Trois tampons différents ont été utilisés pour couvrir une large gamme de pH (de 4 à 9): le tampon citrate (pH entre 4 et 6), le tampon phosphate (pH entre 6 et 8) et le tampon glycine (pH entre 8 et 9).

Le résultat présenté Figure 23 montre qu'un pH optimal se situe autour de 7,5 avec une diminution importante de l'activité au-dessus de pH 8. Par ailleurs, l'effet du tampon sur l'activité catalytique de l'extrait de *C. viswanathii* ne semble pas être marqué dans ces conditions.

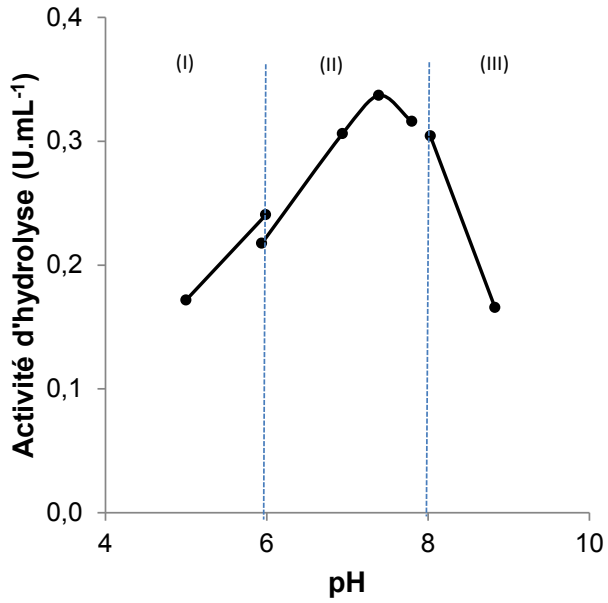


Figure 23 : Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité d'hydrolyse de l'extrait enzymatique de *C. viswanathii*

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, aux différentes conditions de pH (tampon citrate (I) ; tampon phosphate (II) ; tampon glycine (III)) en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion PVA).

5 CONCLUSION

Dans ce premier chapitre, l'objectif de notre étude était l'obtention de nouvelles lipases/acyltransférases produites par des souches microbiennes sauvages.

Parmi 17 souches microbiennes appartenant à 12 espèces faisant objet de cette étude, nous avons tout d'abord présélectionné six souches capables de sécréter une lipase sur milieu solide : *C. parapsilosis CBS 604* (S0) secrétant la lipase/acyltransférase CpLIP2, *C. viswanathii* CBS 4024 (S4), *C. maltosa* CBS 5611 (S6), *Pseudozyma antarctica* CBS 516.83 (S11cl), *Ps. antarctica* CBS 516.83 (S11cnl) et *P. guilliermondii* CBS 2030 (S12). Pour ces souches, des conditions de production de lipases en fioles d'Erlenmeyer ont été mises au point. Le contenu protéique (homologie de certaines protéines avec des lipases connues) et le niveau d'activité de transestérification des extraits alors obtenus ont permis la sélection des souches *C. viswanathii* CBS 4024 (S4), *C. maltosa* CBS 5611 (S6), *Ps. antarctica* CBS 516.83 (S11cl) et *P. guilliermondii* CBS 2030 (S12).

Les conditions de production de lipases pour les quatre souches sélectionnées ont été ensuite améliorées en faisant varier les sources de carbone du milieu de culture (ratio

sucre/huile) puis en passant à la culture en fermenteur. La caractérisation biochimique des extraits enzymatiques a été approfondie par une étude cinétique dans le but de valider et compléter le résultat de l'étude préliminaire. Dans ces conditions, les activités lipasiques les plus élevées ont été obtenues avec les souches *C. viswanathii* CBS 4024 et *P. antarctica* CBS 516.83, au cours de la phase exponentielle de croissance et en début de phase stationnaire. De plus, une activité acyltransférase importante a pu être mise en évidence avec la souche de *C. viswanathii* qui a finalement été retenue pour la suite de l'étude. D'autre part, la caractérisation de la spécificité de substrat (esters d'éthyle saturés de C8 à C18) de nouvel extrait enzymatique a permis de mettre en évidence une préférence pour le C16. Enfin, l'influence du pH, également rapportée dans ce travail, avec un pH optimal autour de 7,5 pour l'activité d'hydrolyse.

Les paramètres cinétiques de culture de cette souche sur le milieu amélioré contenant 2 $g.L^{-1}$ de glucose et 9 $g.L^{-1}$ d'huile de colza ont alors été étudiés plus en détail afin de maîtriser la production de lipase. Nous avons ainsi mis en évidence une protéine CvisL2 de 58 kDa (même ordre de poids moléculaire que CpLIP2), produite, comme l'activité lipase, pendant la phase exponentielle de croissance sur huile et au début de la phase stationnaire. Cette protéine pourrait être la lipase/acyltransférase mise en évidence lors des tests d'actvité de trasestérification. Cela pourrait être confirmé par l'analyse, en cours, de la séquence de cette protéine.

Par ailleurs, la culture de cette souche, même en conditions contrôlées en fermenteur, s'est avérée difficilement reproductible à cause de la présence d'huile dans le milieu (non-homogène). En effet, les cellules semblent s'accumuler dans les projections d'huile en début de culture, et sans intervention manuelle cela a des conséquences négatives sur les cinétiques de croissance et de production de lipase. D'autres modes de culture (fed-batch) devront être envisagés pour pallier à ces difficultés avec la souche sauvage. Un mutant déréprimé et hyperproducteur permettrait également une culture dans de meilleures conditions en évitant l'utilisation d'huile comme substrat.

En perspective, en plus du clonage du gène codant pour CvisL2, la production optimisée par *C. viswanathii* couplée à la purification de l'enzyme permettraient une caractérisation plus détaillée de cette nouvelle lipase/acyltransférase.

Chapitre 2

A la recherche des lipases/acyltransférases dans les bases de données

1 INTRODUCTION

L'objectif du travail dans ce chapitre est de produire des protéines homologues à CpLIP2 en vue de leur caractérisation fonctionnelle. L'étude a commencé par la recherche sur NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information-Basic Local Alignment Search Tool) de séquences protéiques avec la séquence de CpLIP2 comme requête. Les nombreuses séquences obtenues ont ensuite été ordonnées et classées par des constructions d'arbres phylogénétiques. Les arbres issus de cette étude ont permis de sélectionner les séquences de protéines qui semblaient présenter des caractéristiques intéressantes : appartenance à des groupes et sous-groupes, position dans l'arbre par rapport aux autres, intégrité. Les gènes codant pour ces protéines ont été récupérés (ou déduits) pour être synthétisés (synthèse à façon par la société GeneArt) et clonés dans un vecteur d'expression (pPICZα). La souche *P. pastoris* X33 a donc été choisie comme organisme hôte pour la transformation et l'expression hétérologue des protéines en vue de leur caractérisation fonctionnelle.

2 SELECTION DES SEQUENCES

2.1 Interrogation dans la base de données et étude des séquences

La recherche sur BLAST utilisant la séquence de CpLIP2 comme requête a donné, en octobre 2010, 76 séquences de protéines provenant de 26 espèces de microorganismes, notamment *C. albicans* (25 séquences), *C. dubliniensis* (10 séquences), *C. tropicalis* (5 séquences) et *Lodderomyces elongisporus* (4 séquences) (Figure 24). Avec 35 à 62 % d'identité par rapport à CpLIP2, ces séquences sont pour la plupart issues de programmes de séquençage génomique et ne sont que rarement reliées à des caractérisations fonctionnelles. Elles sont ainsi classées en « lipases », « lipases putatives », « précurseurs putatifs de lipases » mais aussi en « protéines hypothétiques ». Compte tenu du nombre de séquences différentes identifiées dans un même organisme, beaucoup pourraient être simplement issues des allèles ou des copies légèrement variables du même gène. Certaines séquences sont différentes alors qu'elles sont référencées comme une même protéine (*C. albicans* lipase 4 par exemple) alors que d'autres sont identiques avec des numéros d'identification différents (les gènes peuvent être différents mais les protéines correspondantes sont identiques). Finalement

après élimination des séquences identiques, nous avons renommé les séquences différentes mais faisant référence à la même protéine en y ajoutant une lettre en minuscule (CalbL4a, CalbL4b, etc…) (Annexe 8), même si ces séquences ne différaient que d'un acide aminé. Ainsi les séquences protéiques sont codées de la façon suivante : la première lettre du genre, les trois premières lettres de l'espèce, puis , selon le nom sous lequel est référencé la séquence, un « L » pour lipase suivi d'un numéro, ou « Hp » pour hypothetical protéine, ou « Pp » pour putative protéine, le tout suivi d'une lettre minuscule pour différencier les séquences jusque-là du même nom. Parmi les 26 espèces, *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* contiennent les séquences de protéine les plus homologues à celle de CpLIP2. En effet, les séquences homologues issues de ces 3 espèces représentent 52 % des séquences totales et ont une identité comprise entre 56 et 61 %, 53 et 60 % et entre 48 et 58 %, respectivement (Figure 24).

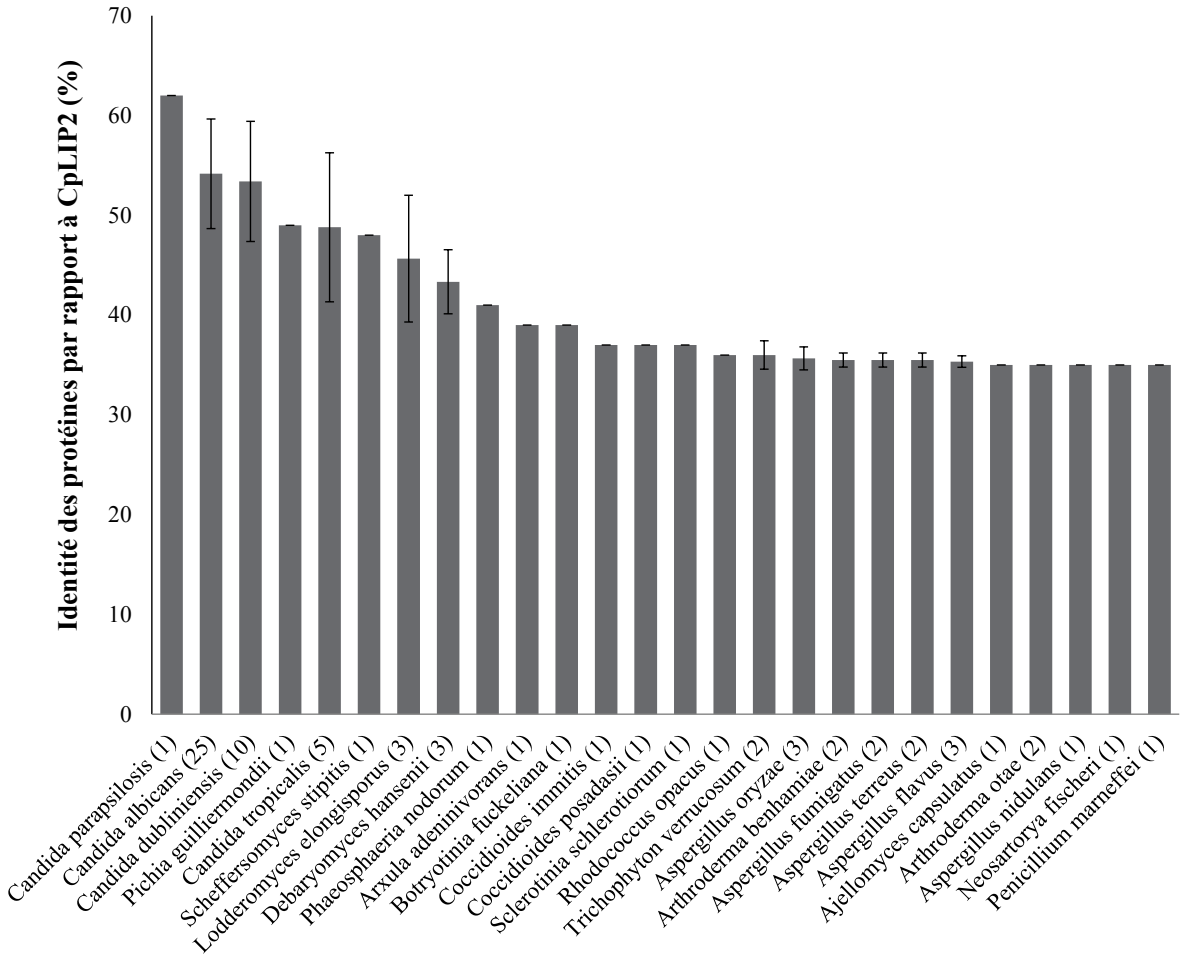


Figure 24 : Identité (%) de séquences protéiques issues de différentes espèces par rapport à CpLIP2

Les valeurs entre parenthèse suivant chaque espèce représentent le nombre de protéines obtenues, pour cette espèce, par la recherche par BLAST dans la base de données NCBI utilisant la séquence de CpLIP2 comme requête

2.2 Etude des séquences protéiques

2.2.1 Alignement

L'alignement multiple des séquences de protéine à l'aide de Clustal 2.1 (Figure 25) nous a permis de voir que le motif commun de lipase GXSXG est conservé pour toutes les séquences, malgré leur hétérogénéité, avec très majoritairement le motif GYSGG, et de façon anecdotique GTSGG, GFSGG, GYSYG et GYSTG (autour de la position 258 de l'alignement). Nous observons que les acides aminés de la triade catalytique sont remarquablement bien conservés et alignés : la serine S du motif GXSXG, l'histidine H (pos. 459 de l'alignement) et l'acide, très majoritairement un aspartique (D, pos. 423 de l'alignement) ou un glutamique (E, pos. 424 de l'alignement) retrouvé dans les séquences comprenant les motifs GYSYG et GYSTG. Notons que, concernant l'acide catalytique, un certain nombre de séquences possèdent à la fois le D et le E, l'un après l'autre (dont CaLA). Par ailleurs, les séquences de CalbHpf et de CalbL3b n'ont pas d'histidine catalytique.

Nous observons également le motif conservé GX_1AX_2GG autour du site 286 pour toutes les séquences, sauf celle de CaLA ayant le motif GASHGG, ainsi que celles de CdubL0e, de CalbHph et de CalbL7a qui ont le motif GAAVGC. Pour la plupart des séquences, X_1 est une alanine (A) ou une valine (V) alors que X_2 une leucine (L) ou une valine.

Le motif CXXSY est aussi conservé autour du site 165 avec majoritairement le motif CA/SPSY. On trouve quelques exceptions sur la séquence de CtroPpa (motif CAPSV), de CpLIP1 (motif FSPSY) et de AoryHpc (motif F/ASPSY). La séquence de CalbL0a, en dépit de son identité forte par rapport à CpLIP2 (56 %), n'a pas ce motif car c'est une séquence très courte.

En plus, les quatre cystéines (C) se conservent bien sur les sites 163, 352, 441 et 497, respectivement. Dans la structure 3D résolue de CaLA (2VEOA et 3GUU) ainsi que dans le modèle 3D de CpLIP2 ces quatre cystéines constituent deux ponts disulfures ayant pour rôle de maintenir la structure d'enzyme. Nous pouvons noter que la séquence de AoryHpc n'a pas de cystéine sur le site 163 (comme celle de CpLIP1), ni sur le site 352.

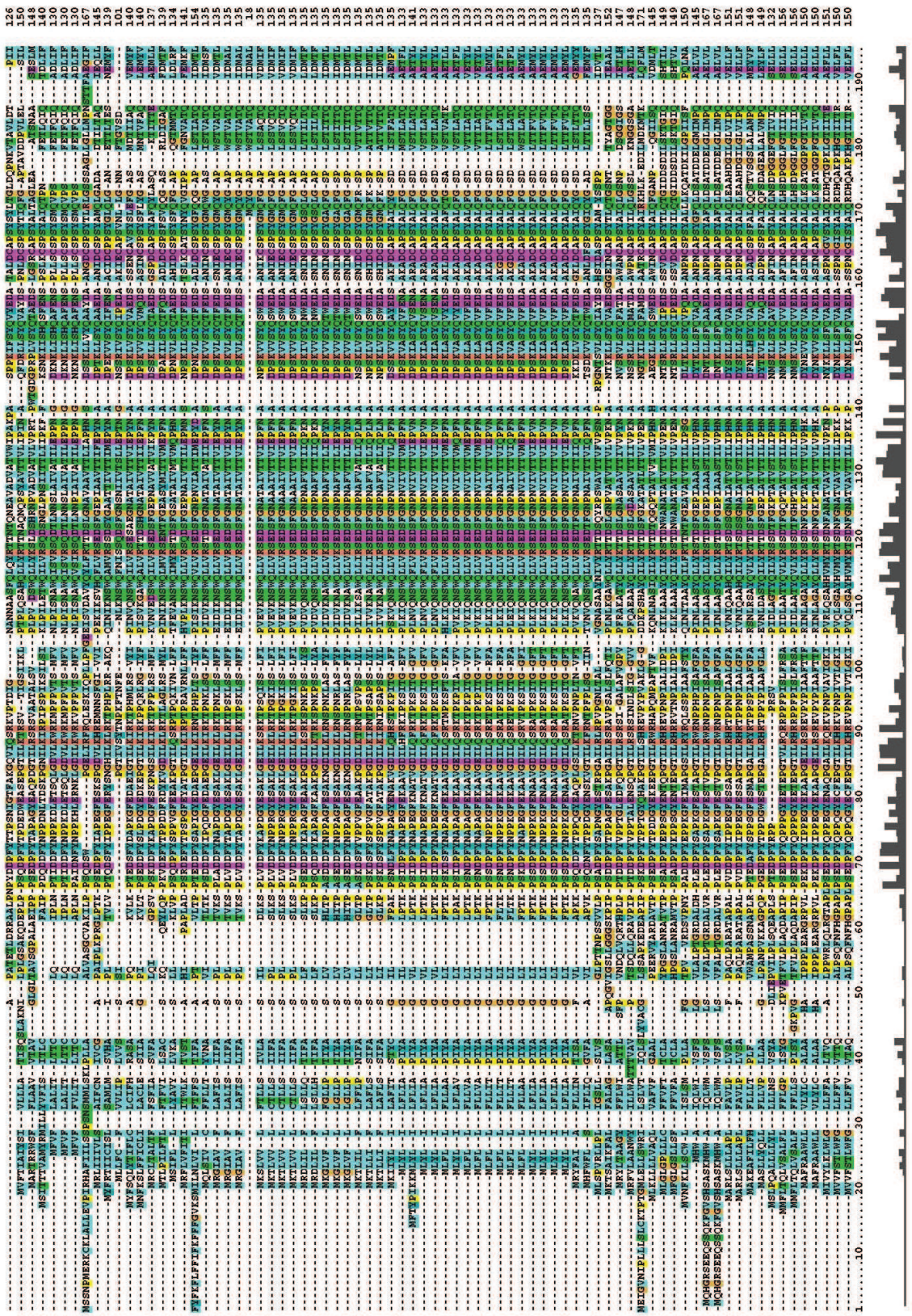


Figure 25 : Alignement multiple des séquences protéiques par Clustal

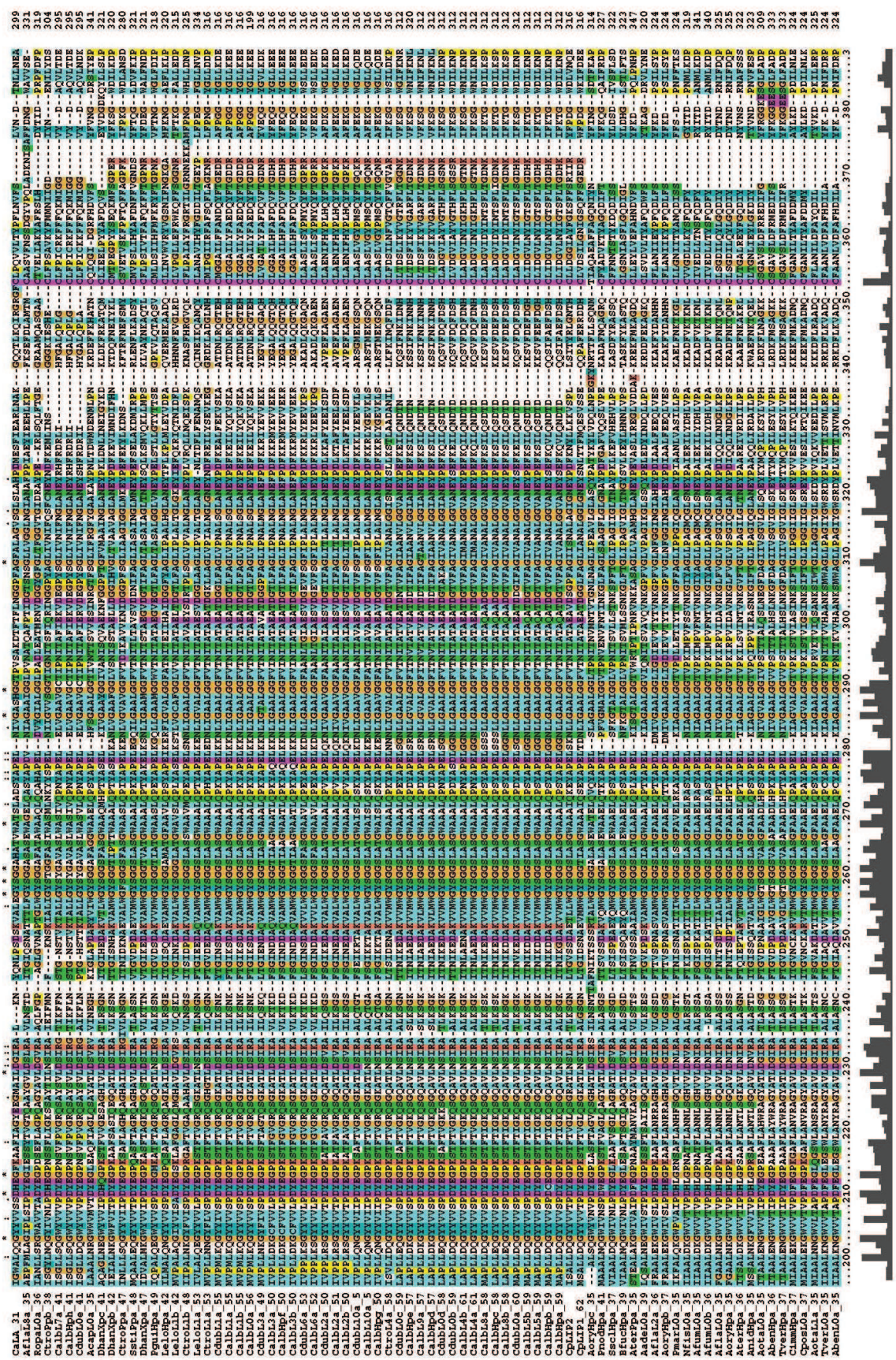


Figure 25 : Alignement multiple des séquences protéiques par Clustal (suite)

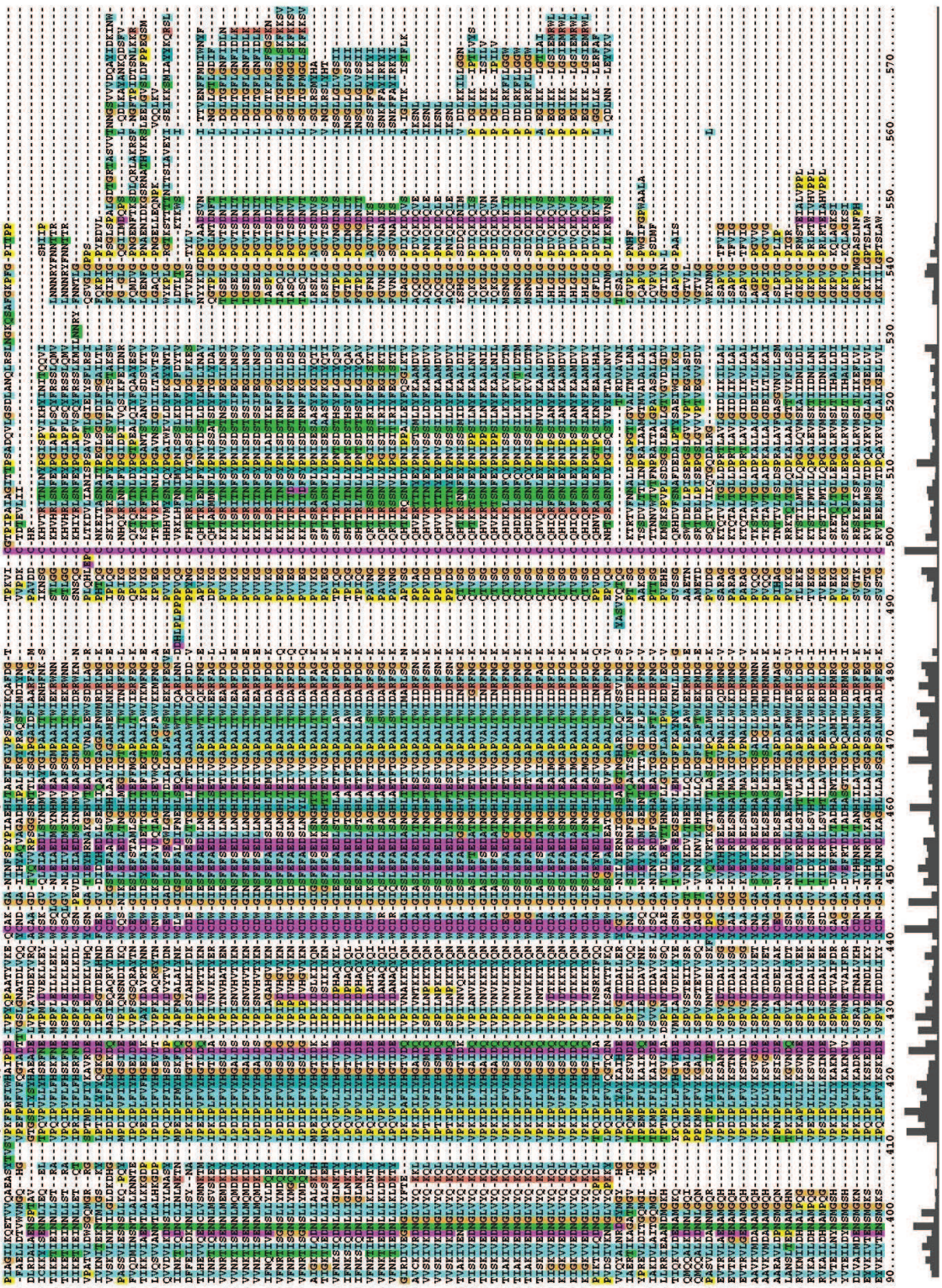


Figure 25 : Alignement multiple des séquences protéiques par Clustal (suite)

2.2.2 Arbre phylogénétique des protéines

Nous avons construit un arbre phylogénétique des 78 séquences, y compris celles de CpLIP2 et de CaLA, par méthode de maximum de vraisemblance utilisant PhyML V3.0.1 à travers l'interface de Seeview [Gouy *et al.*, 2010; Guindon and Gascuel, 2003]. Le résultat montre que ces séquences protéiques s'organisent en cinq groupes phylogéniques (GP) contenant plusieurs sous-groupes (Figure 26 et Figure 27) :

- Le premier groupe (GP-1) contient deux protéines de *C. parapsilosis* (dont la lipase/acyltransférase CpLIP2 et CpLIP1 qui est la protéine la plus proche dans le groupe, mais n'est pas fonctionnelle [Brunel, 2005]), les 17 protéines les plus homologues à CpLIP2 (identité supérieure à 57 %) issues de *C. albicans* (dont la lipase/acyltransférase CaLIP4 notée CalbL4a), de *C. dubliniensis* et de *C. tropicalis* ainsi que 5 autres protéines de ces trois espèces avec un pourcentage d'identité entre 38 % et 47 %. Cinq séquences ont été sélectionnées pour la suite de ce travail : CtroL4a (la deuxième protéine la plus proche de CpLIP2), CdubL0a, CdubL0e, CalbL8b et CalbHpe.
- Le second groupe (GP-2), proche de GP-1, est constitué de séquences avec des identités allant de 42 % à 56 % parmi lesquelles des séquences de *C. albicans*, de *C. dubliniensis*, de *C. tropicalis* et de *L. elongisporus*. Trois séquences protéiques du GP-2 ont été sélectionnées pour la suite de ce travail.
- Seulement 4 séquences constituent le troisième groupe (GP-3) dont deux de *D. hansenii*, une de *P. guilliermondii* et une de *S. stipitis* (sélectionnée pour la suite de ce travail).
- Les deux derniers groupes (GP-4 et GP-5) contiennent les séquences les plus éloignées de CpLIP2 (≤ 41 %) provenant d'espèces et de genres diversifiés (*Coccidioides posadasii, Aspergillus fumigatus, A. terreus, A. oryzae, Arxula adeninivorans, Botryotinia fuckeliana, Rhodococcus opacus*, *C. antarctica*…) dont CposL0a, AflaL0a, BfucHpa et CaLA sélectionnées également pour la suite de ce travail. Nous pouvons observer que CaLA de *C. antarctica* et RopaL0a de *R. opacus* apparaissent les plus éloignées du GP-5.

Nous remarquons que la valeur de Bootstrap pour certaines branches est néanmoins faible (<0,65), ce qui montre que la probabilité d'observer les branches correspondantes est

faible. Par ailleurs, la formation du GP ne semble pas forcément fonction du degré d'identité des séquences. Par exemple, LeloL1b et LeloHpa de *L. elongisporus* avec 42 % d'identité se retrouvent dans le GP-2 alors que DhanXpb (42 %) de *D. hansenii* et CdubL0e (41 %) de *C. dubliniensis* se placent respectivement dans le GP-3 et GP-1.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que parmi les 76 séquences étudiées, 25 avaient été classées dans différentes familles homologues de la superfamille de *C. antarctica* lipase A like (abH38) dans la base de données LED [Fischer and Pleiss, 2003; Widmann *et al.*, 2010]. Les arbres présentés ici (Figure 26 et Figure 27) nous permettent alors de grouper les séquences des groupes GP-1, GP-2 et GP-3 dans la famille homologue de *C. albicans* lipase like (abH38.02) ainsi que les séquences des groupes GP-4 et GP-5 dans la famille homologue de *Aspergillus* lipase like (abH38.03). Par contre, CaLA, référence de la famille homologue de *C. antarctica* lipase A like (abH38.01) semble mal se positionner parmi les séquences du groupe GP-5. Elle est cependant sur une branche particulièrement longue ce qui témoigne de sa divergence par rapport aux séquences étudiées dans ce travail.

Une recherche complémentaire des séquences protéiques dans la base de donnée LED nous a permis d'identifier 11 nouvelles séquences de plus appartenant à la superfamille de *C. antarctica* lipase A like (abH38). Ces séquences de faible homologie avec CpLIP2 (<35 %) ont été intégrées dans notre jeux de données pour une nouvelle construction d'arbres phylogénétiques. Les résultats nous montrent que la topologie globale des nouveaux arbres (Figure 28, Figure 29) n'a pas changé par rapport aux deux premiers (Figure 26 et Figure 27) mais l'insertion des nouvelles séquences dans le groupe existant (GP-3), le déplacement des séquences du groupe GP-5 et l'apparition du sixième groupe (GP-6) ont été observés. L'insertion de DhanHpa et SstiPpb dans le GP-3 est tout à fait logique car les deux protéines appartiennent à la même famille homologue de *C. albicans* lipase like (abH38.02) que les séquences du GP-3. Par ailleurs, le nouveau groupe GP-6 se divise en deux sous-groupes. Le premier contient des séquences de la famille homologue de *Mallassezia* lipase like (abH38.04) et le deuxième des séquences (dont CaLA) de la famille homologue de *C. antarctica* lipase A like (abH38.01). CaLA et RopaL0a ne sont plus dans le groupe GP-5, mais se déplacent dans GP-6. Rappelons que sur les deux premiers arbres (Figure 26 et Figure 27), ces deux séquences apparaissaient les plus éloignées du groupe GP-5, ce qui montrait leur différence considérable par rapport aux autres séquences du groupe. Leur insertion dans le groupe GP-6 ne semble pas alors due au hasard mais bien à leur relations phylogénétiques.

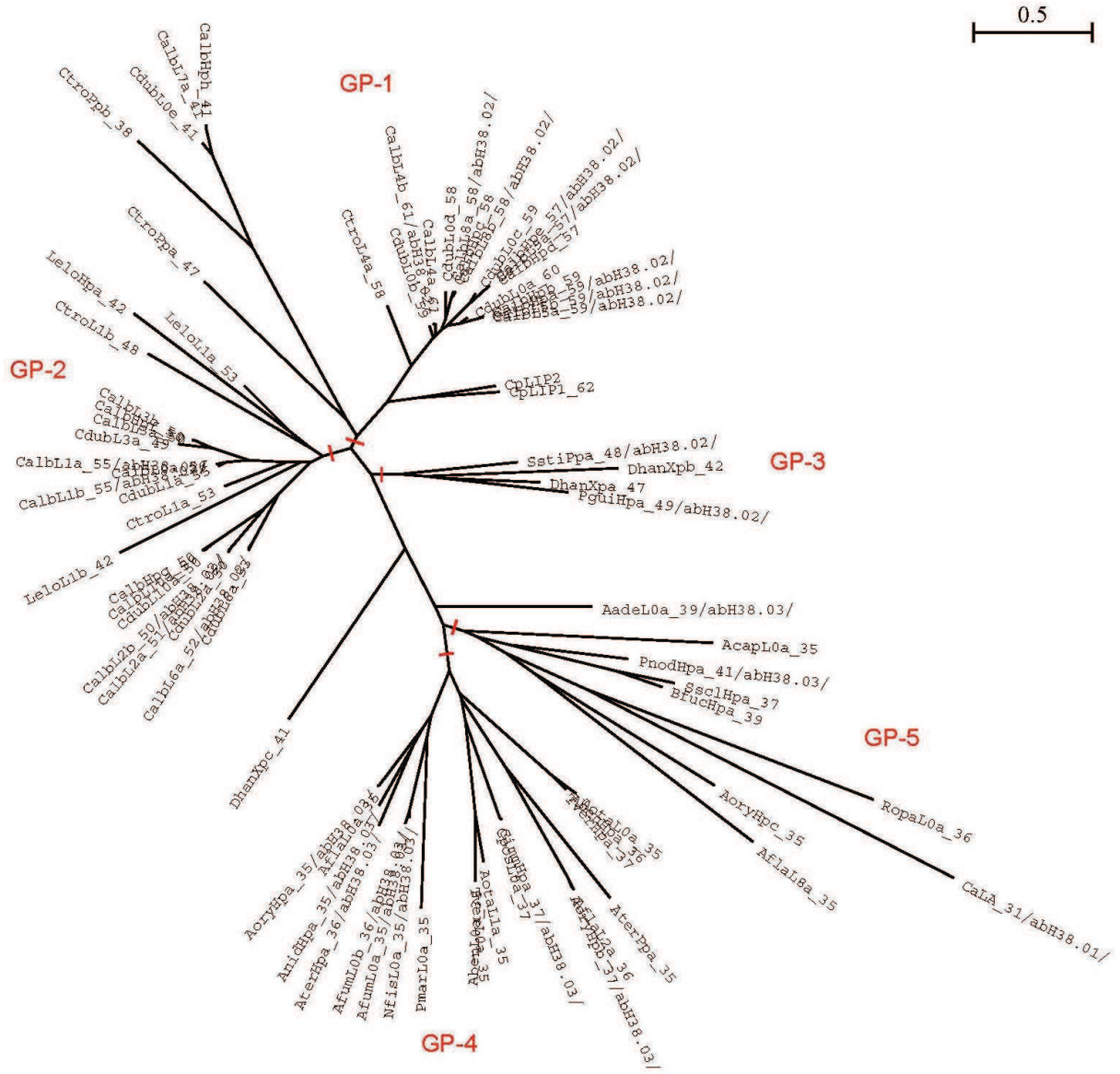


Figure 26 : Arbre phylogénétique non raciné des 76 séquences protéiques homologues à CpLIP2 (> 35 % d'identité), obtenu à l'aide de PhyML version 3.0.1

Vingt-cinq de ces séquences avaient été classées dans la superfamille « C. antarctica lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED. Toutes les séquences sont annotées par leur nom, leur pourcentage d'identité par rapport à CpLIP2 et éventuellement par le numéro de leur famille de classification dans la LED. GP : groupe phylogénétique.

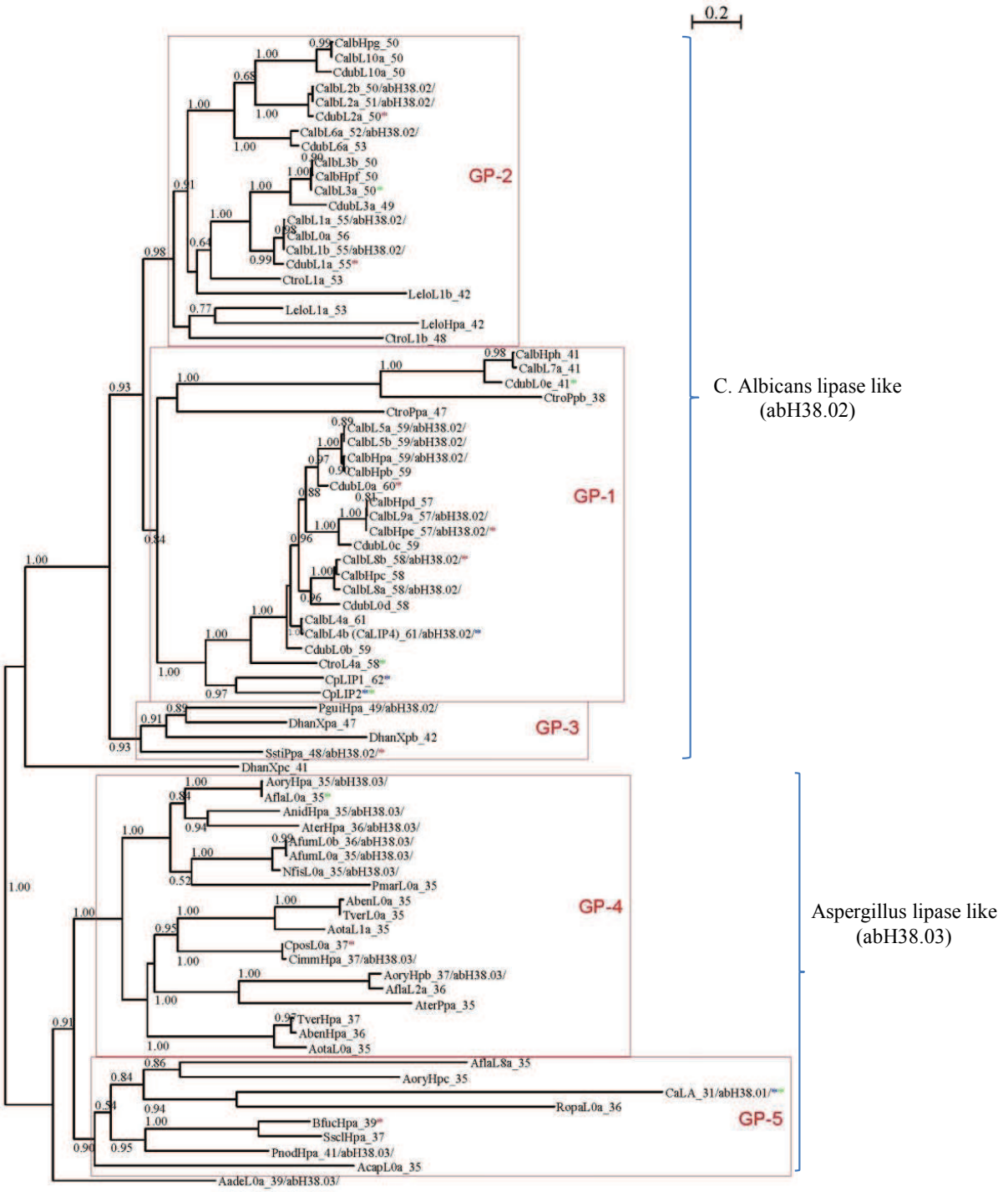


Figure 27 : Arbre phylogénétique des 76 séquences protéiques homologues à CpLIP2 (> 35 % d'identité), obtenu à l'aide de PhyML version 3.0.1

Vingt-cinq de ces séquences avaient été classées dans la superfamille « C. antarctica lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED. Toutes les séquences sont annotées par leur nom, leur identité par rapport à CpLIP2 et éventuellement par leur numéro de classification dans la LED. Les étoiles vertes correspondent aux protéines caractérisées dans cette étude, les rouges à celles sélectionnées dans le cadre de cette étude et les violettes à celle déjà caractérisées par d'autres auteurs. GP : groupe phylogénétique.

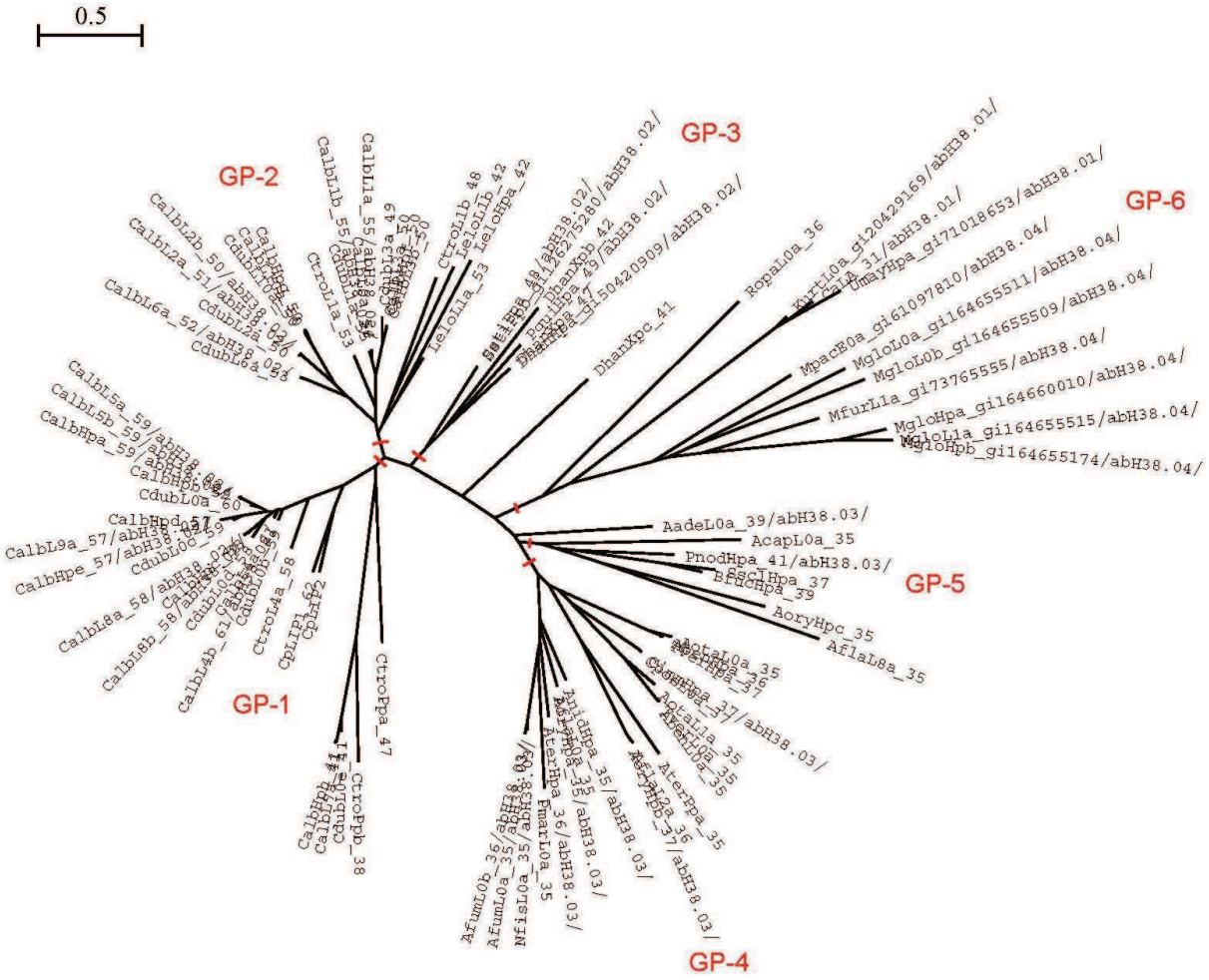


Figure 28 : Arbre phylogénétique non raciné construit à l'aide de PhyML version 3.0.1 avec 76 séquences protéiques (d'identité supérieur à 35 %) et 11 nouvelles séquences (d'identité inférieure à 35 %) de la superfamille « *C. antarctica* lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED

Les séquences sont annotées par leur nom, leur identité par rapport à CpLIP2 et éventuellement par leur numéro de classification dans la LED. Les 11 séquences d'identité inférieure à 35 % sont annotées avec le numéro de gi. GP : groupe phylogénétique.

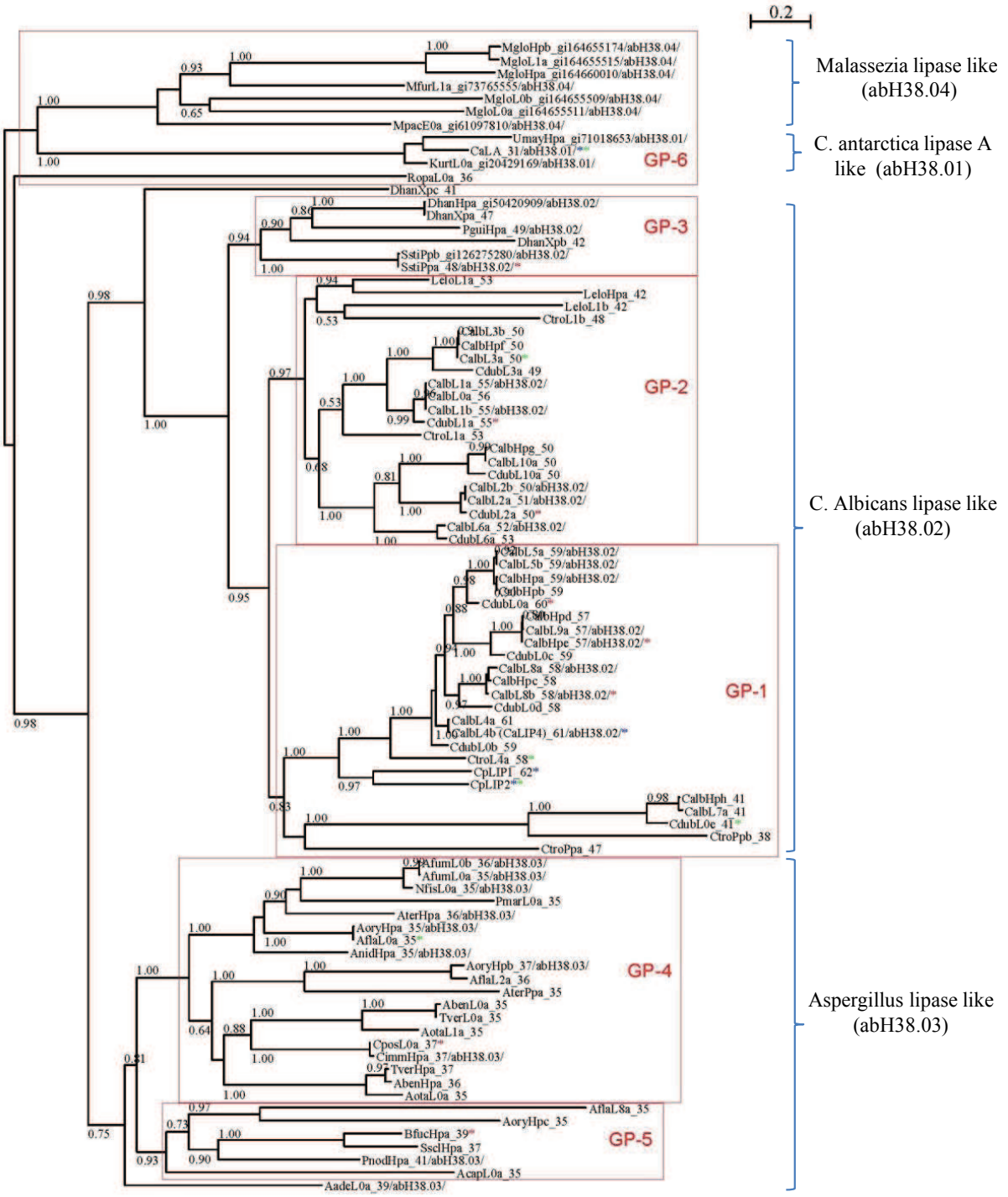


Figure 29 : Arbre phylogénétique construit à l'aide de PhyML version 3.0.1 avec 76 séquences protéiques (d'identité supérieur à 35 %) et 11 nouvelles séquences (d'identité inférieure à 35 %) de la superfamille « *C. antarctica* lipase A (CaLA) like α/β hydrolases (abH38) » de la LED

Les séquences sont annotées par leur nom, leur identité par rapport à CpLIP2 et éventuellement par leur numéro de classification dans la LED. Les séquences d'identité inférieure à 35 % sont également annotées avec le numéro de gi. Les étoiles vertes correspondent aux protéines caractérisées dans cette étude, les rouges à celles sélectionnées dans le cadre de cette étude et les violettes à celle déjà caractérisées par d'autres auteurs. GP : groupe phylogénétique.

2.3 Sélection et préparation des séquences pour la synthèse de gènes

L'objectif de ce travail était de permettre une première caractérisation de cette famille de lipases afin d'établir des relations éventuelles entre les groupes et sous-groupes phylogénétiques et les propriétés catalytiques des enzymes. Pour cela, 13 séquences de protéines ont été sélectionnées (Figure 29, Annexe 9) pour la synthèse des gènes correspondants en vue de leur expression hétérologue et de la caractérisation fonctionnelle des protéines. Le choix de ces séquences repose sur deux critères principaux :

- leur position dans les arbres phylogénétiques (par rapport à CpLIP2) et leur représentativité de la diversité phylogénétique (appartenance à différents groupes et sous-groupes).
- la présence de résidus considérés comme indispensables pour la structure et la fonction de la lipase, en comparaison avec la structure 3D de CaLA et le modèle 3D de CpLIP2 développé par H. Nozach (2008) : la triade catalytique, les motifs conservés G-Y-S-G/Y-G, Y-A-P/Q-E-L et C-A/S-P/V-S-Y, la présence d'au moins quatre cystéines (Figure 30) qui permettent à priori la présence de deux ponts disulfure dans la structure tertiaire. L'hypothèse de la nécessité de ces quatre cystéines a été faite car CpLIP1 n'en possède que trois et n'est pas fonctionnelle [Brunel, 2005].

Pour avoir une diversité importante, les 13 séquences de protéine ont été choisies de telle sorte qu'il y ait une protéine issue de chaque groupe ou sous-groupe (Figure 29). Par rapport à la classification dans la LED, ces 13 séquences (y compris CaLA) représentent les échantillons issus des trois familles homologues de la superfamille de *C. antarctica* lipase A like (abH38) : « *C. antarctica* lipase A like (abH38.01) », « *C. albicans* lipase like (abH38.02) » et « *Aspergillus* lipase like (abH38.03) ». Aucune des séquences sélectionnées n'est classée dans la famille homologue « *Malassezia* lipase like (abH38.04) » car les protéines de celle-ci sont effectivement plus éloignées de la séquence de CpLIP2 (<35 % d'identité). Par ailleurs, les séquences de cette famille se retrouvent sur le même groupe GP-6 que celles de la famille *C. antarctica* lipase A like (abH38.01). Alors, la séquence de CaLA choisie dans le cadre de cette étude pourrait représenter les séquences de la famille homologue « *Malassezia* lipase like (abH38.04).

Tableau 8 : Protéines sélectionnées et leurs originalités des séquences, en vert les protéines caractérisées biochimiquement dans cette étude

**L'acide (E) est présent à la suite du D dans ces séquences. [a]Séquence référencées dans la Lipase Engineering Database.*

Protéine	Nombre de cystéines dans la séquence principale (hors peptide signal)	CXXSY	GXSXG	YAXEL	Acide catalytique
CpLIP2	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D
CaLA	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D(E)*
CdubL0a	4	CSPSY	GYSGG	YAPEL	D
CtroL4a	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D
CalbL8b[a]	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D
CalbHpe[a]	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D
CdubL1a	4	CSPSY	GYSGG	YAPEL	D
CablL3a	5 (+C144)	CSPSY	GYSGG	YAQEL	D
CdubL2a	4	CSPSY	GYSGG	YAPEL	D(E)*
SstiPpa[a]	4	CAVSY	GYSGG	YAPEL	D
CdubL0e	6 (+C219 et C274)	CSPSY	GYSYG	YAPEL	E
CposL0a	5 (+C201)	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D(E)*
AflaL0a	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D(E)*
BfucHpa	4	CAPSY	GYSGG	YAPEL	D(E)*

Tableau 9 : Matrice d'identités entre les 6 séquences sélectionnées pour l'étude, obtenue avec le programme SIM [Huang and Miller, 1991]

La partie inférieure de la matrice (en blanc) contient les pourcentages d'identité globaux entre les séquences et la partie supérieure (grisée) les identités entre les parties N-term (gris clair), les chapeaux putatifs (gris), et les parties C-term (gris foncé). Les limites des chapeaux putatifs de chaque protéine sont données dans la première ligne (gris). Les séquences ayant des longueurs différentes, ces résultats peuvent varier légèrement en fonction de l'alignement.

	CpLIP2	CaLA			CtroL4a			AflaL0a			CalbL3a			CdubL0e		
"Chapeau"	N218-D310	S217-Q307			N215-G308			K225-A313			N215-G308			N208-I288		
CpLIP2	id	37,7%	28,6%	28,6%	69,5%	40,6%	56,2%	45,6%	25,0%	30,4%	57,8%	40,7%	48,1%	50,7%	34,0%	>10%
CaLA	31,3%	id			38,2%	28,1%	31,6%	40,3%	24,3%	26,9%	36,5%	27,0%	27,9%	35,9%	23,5%	22,4%
CtroL4a	58,7%	31,4%			id			46,7%	22,1%	26,5%	62,6%	38,3%	50,8%	48,5%	43,3%	24,8%
AflaL0a	34,6%	31,5%			34,7%			id			46,9%	29,1%	28,7%	39,7%	28,7%	27,3%
CalbL3a	50,3%	30,2%			53,1%			35,4%			id			46,6%	35,9%	33,0%
CdubL0e	41,0%	33,8%			40,0%			31,5%			39,5%			id		

Parmi les protéines sélectionnées, certaines présentes des « originalités » que nous avons considérées comme potentiellement intéressantes pour l'étude de la diversité (Tableau 8). La plupart des séquences sélectionnées comprennent un peptide signal natif en N-term que nous avons décidé d'éliminer pour l'expression hétérologue (la séquence de l'α-facteur de *S. cerevisiae* en amont du gène dans le vecteur garantit l'excrétion de la protéine). Les séquences de peptides signaux ont été déterminées grâce aux logiciels WoLF PSORT [Horton *et al.*, 2007] et PrediSi [Hiller *et al.*, 2004], pour ensuite être éliminées. La traduction de ces séquences protéiques en séquences nucléotides a été alors réalisée avec BioEdit. De ce fait, le problème lié au code génétique non standard a été évité. En effet, le codon CUG qui code généralement pour la leucine est traduit en sérine chez beaucoup d'espèces du genre de *Candida* [Sugita and Nakase, 1999], ce qui demanderait une précaution particulière si le gène destiné à la transformation du *P. pastoris* était synthétisé à partir de séquence nucléotides initiale.

Finalement, nous avons choisi pour une première étape d'étude de la diversité de cette famille de protéines, cinq séquences appartenant à des espèces et des groupes phylogénétiques différents et particulièrement originales (Tableau 8), ces originalités étant retrouvées dans les séquences du même sous-groupe. Ainsi :

- CtroL4a est la plus proche de CpLIP2, à la fois en termes d'identité (58,7 %) et vis-à-vis de sa position sur l'arbre (GP-1),

- CdubL0e appartient également à GP-1 mais est moins proche de CpLIP2 que CtroL4a en termes d'identité (41 %) et vis-à-vis de sa position sur l'arbre. CdubL0e possède un motif GYSYG original et deux cystéines additionnelles (originalités retrouvés dans CalbL7a et CalbHph),
- CalbL3a appartient à l'autre groupe proche (GP-2) avec 42-50 % d'identité avec CpLIP2, et présente un motif YAQEL original ainsi qu'une cystéine additionnelle (originalités retrouvés dans CalbL3b et CalbHpf)
- AflaL0a appartient au groupe GP-4 constitué de séquences ayant 35-37 % d'identité avec CpLIP2 et provenant de nombreuses espèces différentes,
- CaLA appartient au groupe GP-6 constitué de séquences ayant moins de 35 % d'identité

Ces cinq séquences ont entre elles des pourcentages d'identité variables, de 30 à 59 %, qui sont donnés dans le Tableau 9. Les pourcentages d'identités de différents segments de la structure primaire des protéines sont également détaillés. En effet, si l'on se réfère à la structure 3D de CaLA et au modèle 3D de CpLIP2, trois segments peuvent être distingués :

- la partie N-terminale, jusqu'au chapeau putatif, qui contient le motif GXSXG et qui est la partie la plus conservée (de 36 à 70 % d'identité),
- le chapeau putatif qui, dans les structures 3D, couvre le site actif, et qui est la partie la plus variable entre les différentes protéines (21 à 38 % d'identité), sauf pour CdubL0e
- la partie C-terminale, après le chapeau putatif, dont le pourcentage d'identité est similaire au pourcentage d'identité global des séquences entre elles (sauf pour CdubL0e pour laquelle cette partie est la plus variable). Notons cependant que, sur les alignements (Figure 30), cette partie est celle qui contient le plus de « gaps ». En effet, les longueurs totales des six séquences varient de 411 à 455 acides aminés et cette différence est retrouvée majoritairement dans l'extrémité de la partie C-term, assez variable entre les séquences.

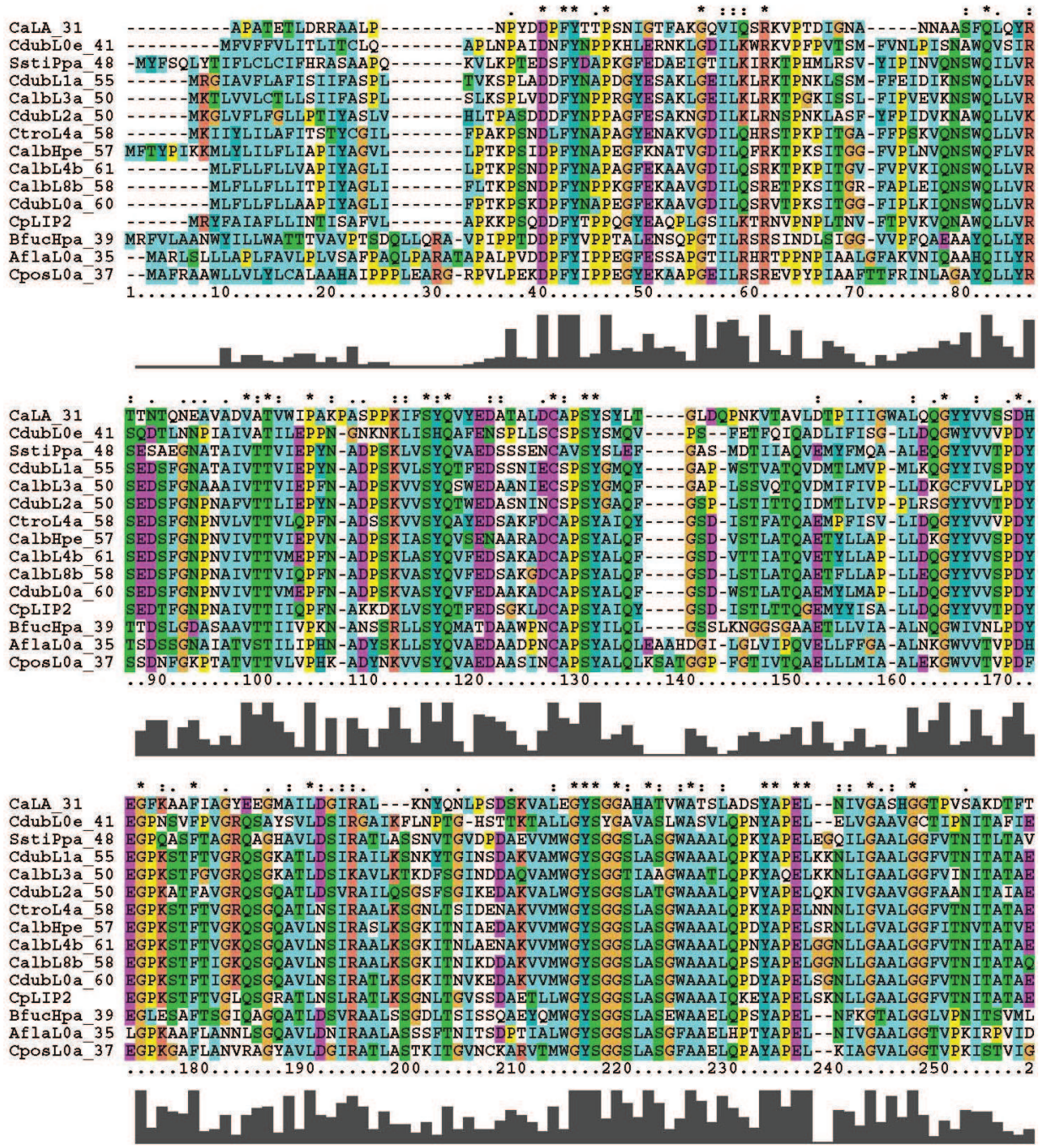


Figure 30 : Alignement multiple par Clustal des séquences de protéines sélectionnées pour la synthèse des gènes correspondants

Les séquences sont alignées avec leur peptide de sécrétion natif

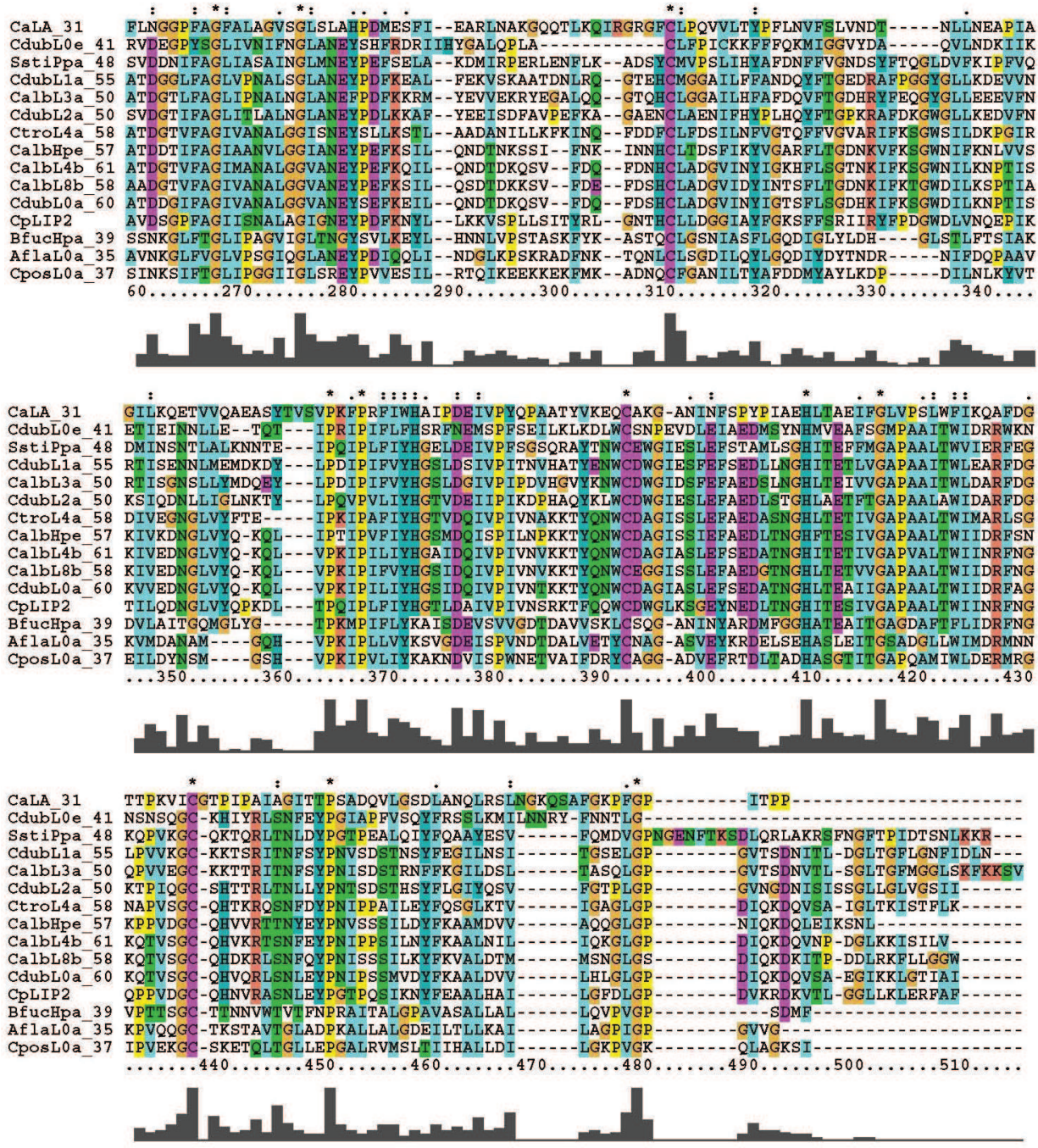


Figure 30 : Alignement multiple par Clustal des séquences de protéines sélectionnées pour la synthèse des gènes correspondants (suite)

Les séquences sont alignées avec leur peptide de sécrétion natif

3 SYNTHESE ET SOUS-CLONAGE DES GENES

Les 5 séquences nucléotides de Ctrol4a, CalbL3a, CdubL0e, AflaL0a et CaLA ont été synthétisés et sous-clonées dans le vecteur pPICZαB (Figure 31) par la société Geneart comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes (§ 7.1). Les séquences ont été optimisées pour l'utilisation des codons par *P. pastoris* avant d'être synthétisées (Figure 32). Les gènes ont ensuite été insérés dans le vecteur pPICZαB via les sites de restriction PstI/NotI, dans le cadre de lecture du peptide signal du facteur α de *S. cerevisiae*, et avec le codon stop positionné juste avant le site de restriction de NotI (pas de His-tag). Une addition de quelques bases (correspondant à l'insertion d'une ou de deux alanines en C-term) a permis le bon positionnement de la séquence dans ce cadre de lecture.

Le vecteur pPICZαB, comme ses deux homologues (pPICZαA et pPICZαC) (Figure 31), permet le clonage et la surexpression de protéines recombinantes avec des souches de *P. pastoris* (X-33 dans notre cas). Ce vecteur contient un gène de résistance à la zéocine permettant la sélection des clones ayant intégré le plasmide recombinant lors de la transformation. De plus, les clones ayant intégré plusieurs copies du vecteur (« multi-copies ») peuvent être sélectionnés par un criblage sur milieu sélectif contenant des doses croissantes de zéocine (le nombre de copies du vecteur est généralement corrélé positivement à la quantité de protéine hétérologue produite). Sous le contrôle du promoteur fort *AOX1* contenu dans la région 5' AOX1, l'expression du gène est induite par la présence de méthanol dans le milieu de culture.

Les plasmides ainsi obtenus, nommés pPICZαBCtroL4a, pPICZαBCalbL3a, pPICZαBCdubL0e, pPICZαBAflaL0a et pPICZαBCaLA ont été utilisé pour la transformation de *P. pastoris* X33 par électroporation.

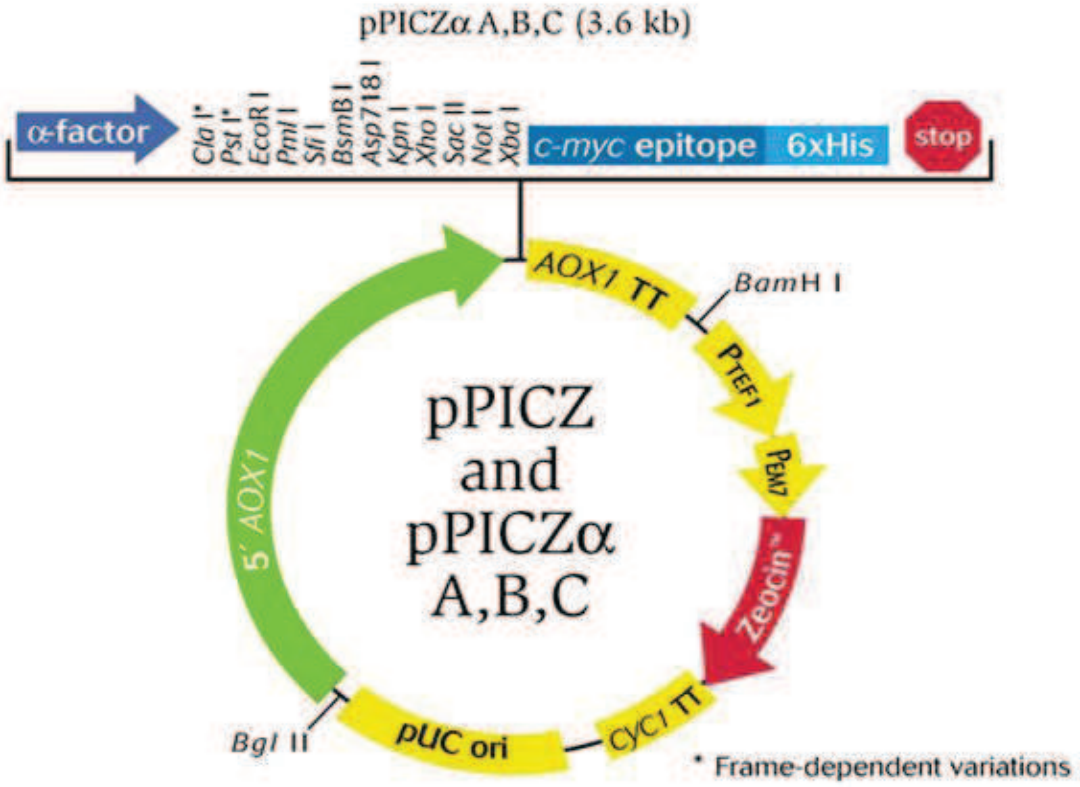


Figure 31 : Configuration des vecteurs pPICZαA, B, C (Invitrogen)

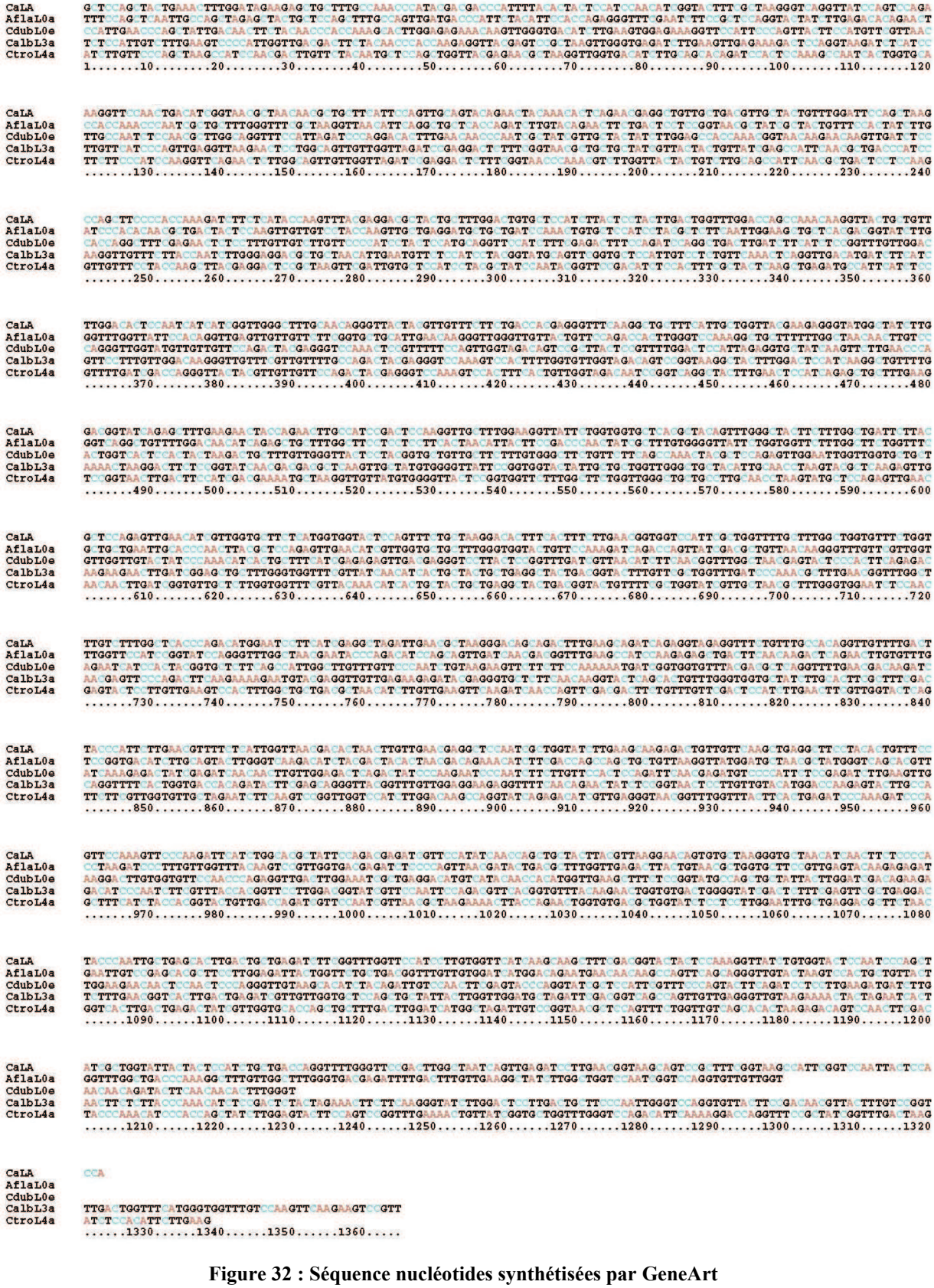


Figure 32 : Séquence nucléotides synthétisées par GeneArt

4 TRANSFORMATION DE *P. PASTORIS* X33

Dès réception, les vecteurs plasmidiques ont été resuspendus dans 50 µL d'eau ultrapure stérile avant d'être conservés à -20 °C. La propagation de ces plasmides a été effectuée chez *E. coli* XL1-Blue MRF' comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 7.2). Une quantité de vecteur recombinant suffisante (5 à 10 µg) a ensuite été obtenue par extraction sélective d'ADN plasmidique (« miniprep ») avant d'être linéarisée par Sac I (§ 7.3) qui coupe le site 5´-GAGCT↓C-3´ de la région 5' AOX1 (position 209). Pour vérifier si la digestion est complète, une analyse sur gel d'agarose (0,8 %, p/v) a été effectuée. La Figure 33 montre qu'après la digestion par Sac I, tous les plasmides sont linéaires (une seule bande d'ADN, contrairement à l'échantillon non-digéré).

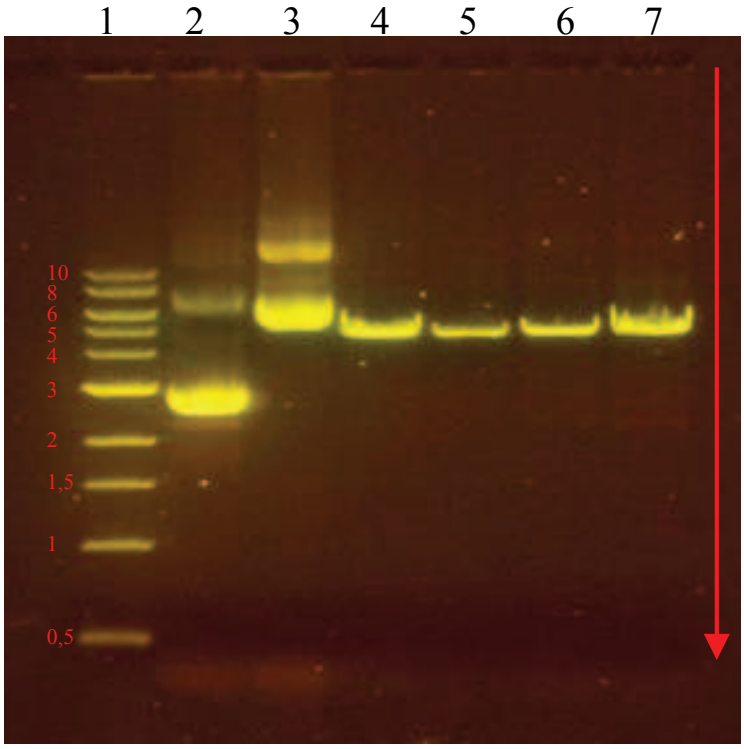


Figure 33 : Analyse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose 0,8 % (p/v)

Puits 1 : marqueurs de taille d'ADN (en kb) ; puits 2 et 3 : plasmides non linéarisés pPICZαBCtroL4a et pPICZαBAflaL0a ; puits 4, 5, 6 et 7 : plasmides linéarisés avec SacI pPICZαBAflaL0a, pPICZαBCdubL0e, pPICZαBCalbL3a et pPICZαBCtroL4a

La linéarisation par SacI permet, au moment de la transformation, l'intégration par recombinaison homologue du vecteur au niveau du locus 5' AOX1 des cellules hôtes. Ainsi, les transformants de *P. pastoris* X33 obtenus sont tous Mut+ (croissance rapide sur méthanol grâce au promoteur fort *AOX1*).

La compétence des cellules hôtes influence l'efficacité de la transformation. Pour une transformation de *P. pastoris* par électroporation, les cellules doivent être préparées juste avant la transformation, contrairement aux cellules d'*E.coli* que l'on peut conserver compétentes à -80 °C et décongeler juste avant l'utilisation. Pour une efficacité maximale, les cellules doivent être en tout début de phase exponentielle de croissance. La caractérisation de la croissance de *P. pastoris* a donc été primordiale pour la préparation des cellules compétentes.

4.1 Caractérisation de la croissance de *P. pastoris* X33

Les cellules *P. pastoris* X33 font tout d'abord l'objet de trois précultures successives dans le milieu YPD pendant 3×24 h à 28 °C sous agitation. L'ensemencement de 500 mL de milieu YPD se fait à partir de la troisième préculture de façon à ce que la valeur de $DO_{600\ nm}$ au moment de l'inoculation soit égale à 0,002. La culture se fait dans les conditions identiques aux précultures avec un suivi de la croissance cellulaire toutes les heures. Le spectrophotomètre utilisé est de type ULTROSPEC 2100 pro (GE Healthcare). La relation entre la valeur de DO et la durée de culture (t) correspond à une courbe exponentielle : $DO = 0{,}002.e^{0{,}3112t}$. Nous obtenons donc sur YPD à 28 °C un taux de croissance pour *P. pastoris* X33 de 0,31 h^{-1} et un temps de génération de 2,2 h (Figure 34). Ainsi, dans ces conditions, l'optimum de DO pour la transformation par électroporation est égal à 2.

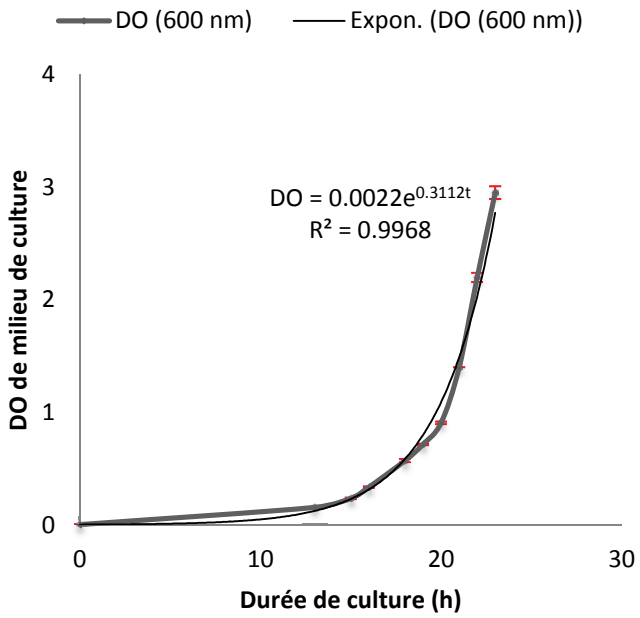


Figure 34 : Caractérisation de *P. pastoris* X33

Tableau 10 : Nombre de clones sélectionnés sur le milieu YPDS additionné de 0,2 mg.mL^{-1} de zéocine

Clones	Vecteurs	Nombre de clones obtenus
P. pastoris-CTROL4A	pPICZαBCtroL4a	Plus de 96
P. pastoris-CALBL3A	pPICZαBCalbL3a	40
P. pastoris-CDUBL0E	pPICZαBCdubL0e	13
P. pastoris-AFLAL0A	pPICZαBAflaL0a	Plus de 96
P. pastoris-CALA	pPICZαBCaLA	20

4.2 Transformation de *P. pastoris* par électroporation

Après préparation des cellules compétentes de *P. pastoris* X33, la transformation par électroporation a été réalisée en présence des plasmides pPICZαBCtroL4a, pPICZαBCalbL3a, pPICZαBCdubL0e, pPICZαBAflaL0a et pPICZαBCaLA digérés et purifiés (cf. Matériel et Méthodes § 7.4). Les clones transformés de *P. pastoris* X33, nommés respectivement *P. pastoris-CTROL4A, P. pastoris-CALBL3A, P. pastoris-CDUBL0E, P. pastoris-AFLAL0A et P. pastoris-CALA,* sont sélectionnées sur milieu YPDS additionné de 0,2 $mg.mL^{-1}$ de zéocine (Matériel et Méthodes § 7.7). Le Tableau 10 nous montre que le nombre des clones obtenus varie en fonction des plasmides intégrant différents gènes (CtroL4A, CalbL3a, CdubL0e AflaL0a et CaLA). Ces clones positifs sont ensuite criblés sur milieu solide permettant de détecter l'activité lypolitique et éventuellement pour leur résistance à des doses croissantes de zéocine.

4.3 Sélection des transformants

Nous avons utilisé des milieux sélectifs contenant un substrat lipidique pour mettre en évidence l'activité lipolytique des transformants obtenus pour chaque gène.

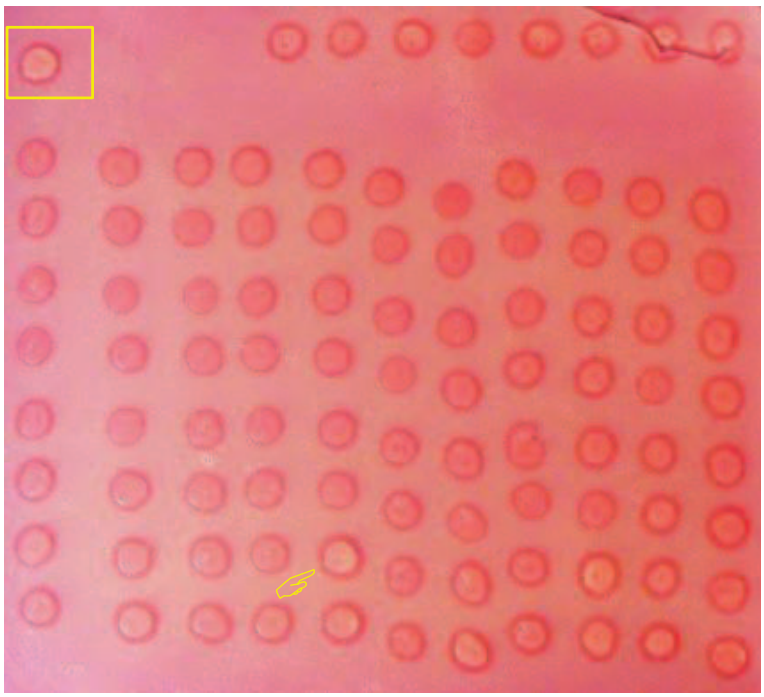
Des milieux « YNB + méthanol + Rhodamine B » sont additionnés d'huile de colza ou de l'oléate d'éthyle comme substrat lipidique (cf. Matériel et Méthodes § 3.11). Ainsi, si une lipase active est sécrétée par le clone, les acides gras libérés par hydrolyse de l'huile de colza (ou de l'oléate d'éthyle) se complexent avec la Rhodamine B pour former un halo rose fluorescent autour de la colonie. De plus, pour une même enzyme, plus le halo est important plus la lipase est produite en grande quantité, ce qui permet de contribuer à la sélection des meilleurs clones.

Comme nous pouvons l'observer Figure 35 et Figure 36, les clones de *P. pastoris X33* transformés avec le vecteur pPICZαBCtroL4a (*P. pastoris-CTROL4A*) ou pPICZαBAflaL0a (*P. pastoris-AFLAL0A*) produisent effectivement un halo autour de leurs colonies. Ces résultats montrent que les deux gènes *CTROL4A* et *AFLAL0A* codent pour des lipases actives (hydrolyse d'huile de colza) et que ces dernières peuvent également hydrolyser l'oléate d'éthyle. Des résultats similaires ont été obtenus avec CaLA, ce qui valide notre construction

puisqu'il a déjà été prouvé que CaLA était une lipase active. Pour les clones *P. pastoris-CTROL4A* et *P. pastoris-AFLAL0A,* nous observons de plus sur la Figure 36 que la taille du halo pour chaque colonie est pratiquement identique, ce qui rend la sélection d'un clone plutôt qu'un autre pour la production en fermenteur difficile. Le criblage sur le milieu YPD contenant des doses croissantes de zéocine (0,2 – 0,5 – 1 $mg.mL^{-1}$) apparaît alors utile. En effet, la Figure 38 montre qu'en présence de 1 $mg.mL^{-1}$ de zéocine, la croissance de certains clones a été affectée (taille ou aspect de la colonie). Les colonies qui se développement normalement (aspect de colonie brillant) sont sélectionnées pour la production d'enzyme en fermenteur.

Des clones de *P. pastoris* transformés avec le vecteur pPICZαBCalbL3a (*P. pastoris-CALBL3A*) ou pPICZαBCdubL0e (*P. pastoris-CDUBL0E*) ont été sélectionnés sur YPDS additionné de 0,2 $mg.mL^{-1}$ de zéocine. Aucun de ces clones n'a cependant produit de halo sur milieu « YNB + méthanol + Rhodamine B » complémenté avec de l'huile de colza ou de l'oléate d'éthyle, et ce malgré de trois essais de transformation. Nous avons alors testé les clones *P. pastoris-CALBL3A* et *P. pastoris-CDUBL0E* obtenus sur un autre milieu : YNB + méthanol + tributyrine, la tributyrine pouvant être à la fois hydrolysée par les estérases et les lipases. Sur ce milieu, l'apparition d'un halo translucide autour des colonies est due directement à l'hydrolyse de la tributyrine par l'enzyme sécrétée (lipase ou estérase) par les transformants et l'addition de Rhodamine B n'est pas nécessaire. Après trois jours de culture, un halo de très petite taille par rapport à celle de la colonie a pu être observé pour certains clones *P. pastoris-CALBL3A* et *P. pastoris-CDUBL0E* (Figure 37). Ils ont été retenus pour les productions en fermenteur.

(a)



(b)

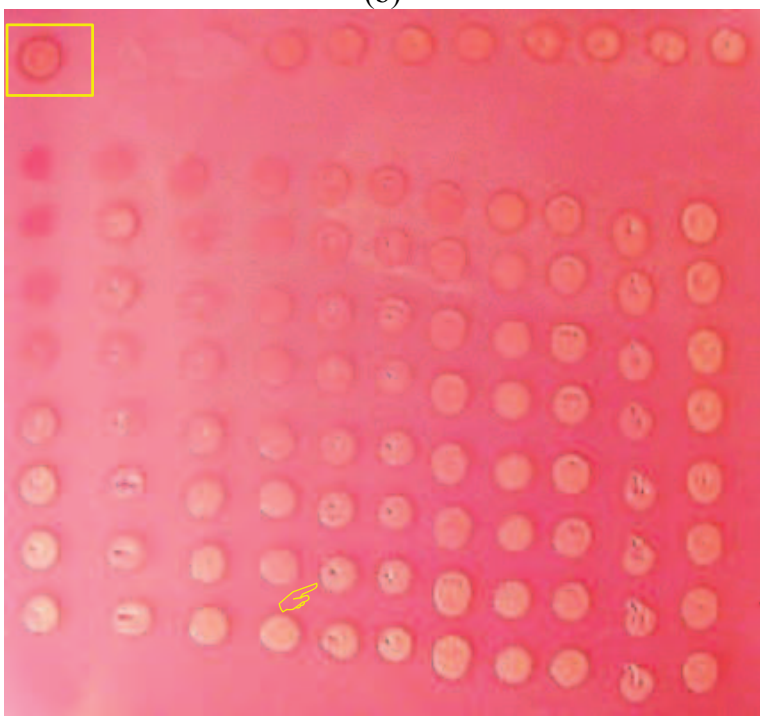
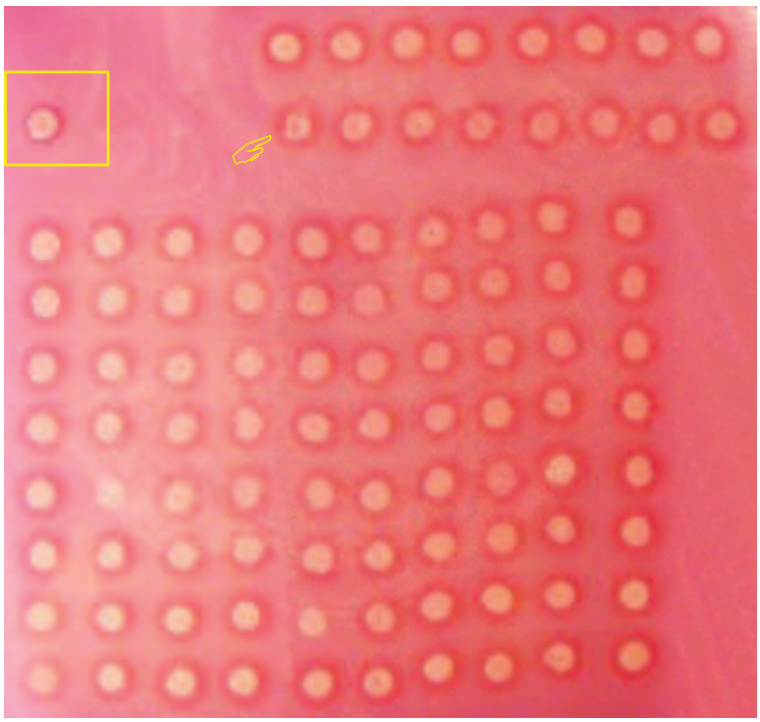


Figure 35 : Croissance des 96 clones *P. pastoris-CTROL4A* sur les milieux sélectifs (YNB + méthanol + Rhodamine B) additionnés de l'huile (a) ou de l'oléate d'éthyle (b) après 48-72 h de culture à 28 °C

Encadrement : témoin positif P. pastoris-CPLIP2. Pointage : clone sélectionné.

(a)



(b)

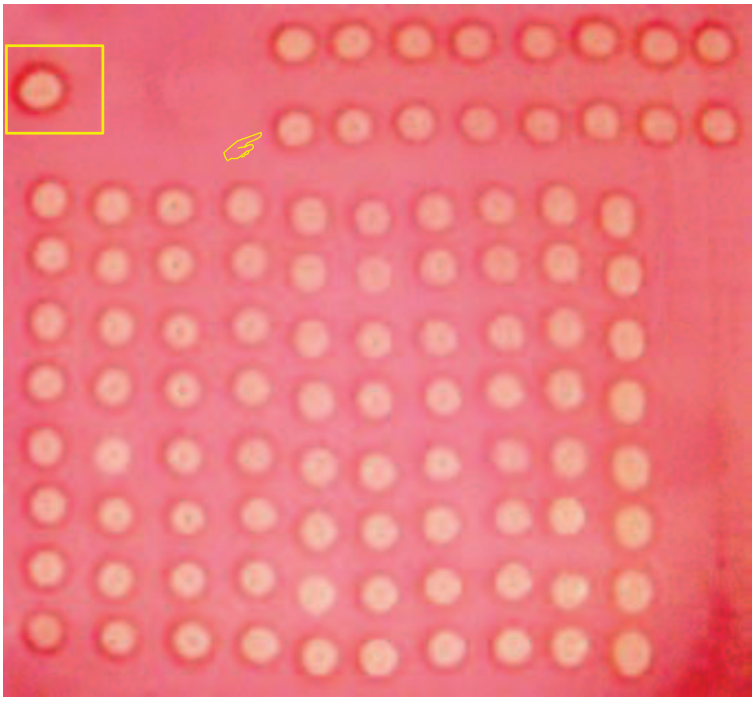
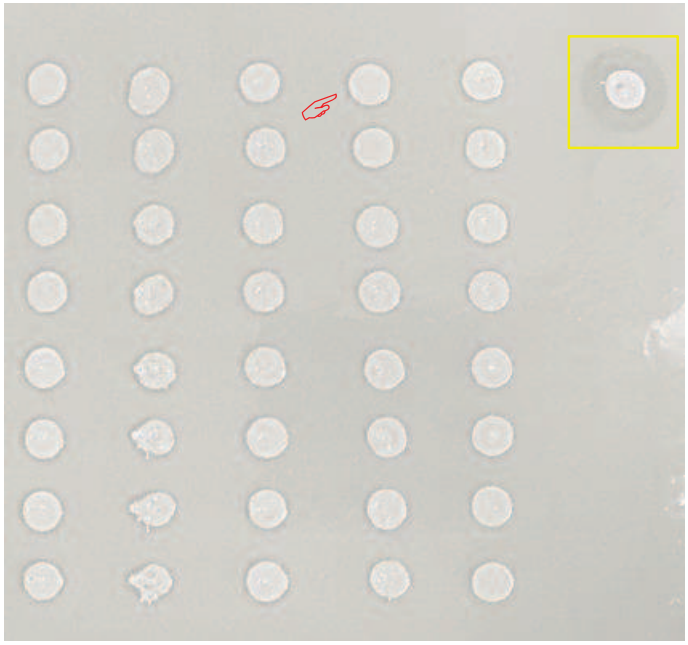


Figure 36 : Croissance des 96 clones *P. pastoris-AFLAL0A* sur les milieux sélectifs (YNB + méthanol + Rhodamine B) additionnés de l'huile (a) ou de l'oléate d'éthyle (b) après 48-72 h de culture à 28 °C

Encadrement : témoin positif P. pastoris-CPLIP2. Pointage : clone sélectionné.

(a)



(b)

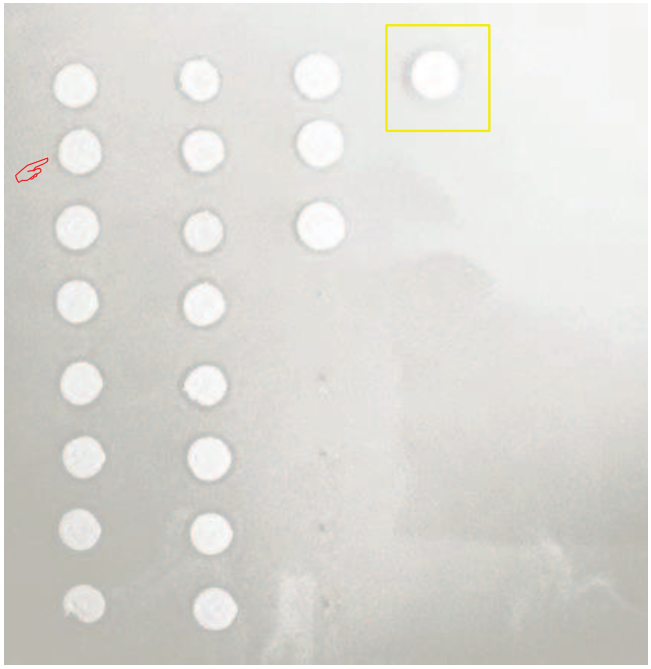


Figure 37 : Croissance (48-72 h, 28 °C) des 40 clones *P. pastoris-CALBL3A* (a) et 19 clones *P. pastoris-CDUBL0E* (b) sur le milieu sélectif (YNB + méthanol) additionné de la tributyrine

Encadrement : témoins positif P.pastoris-CPLIP2. Pointage : clone sélectionné.

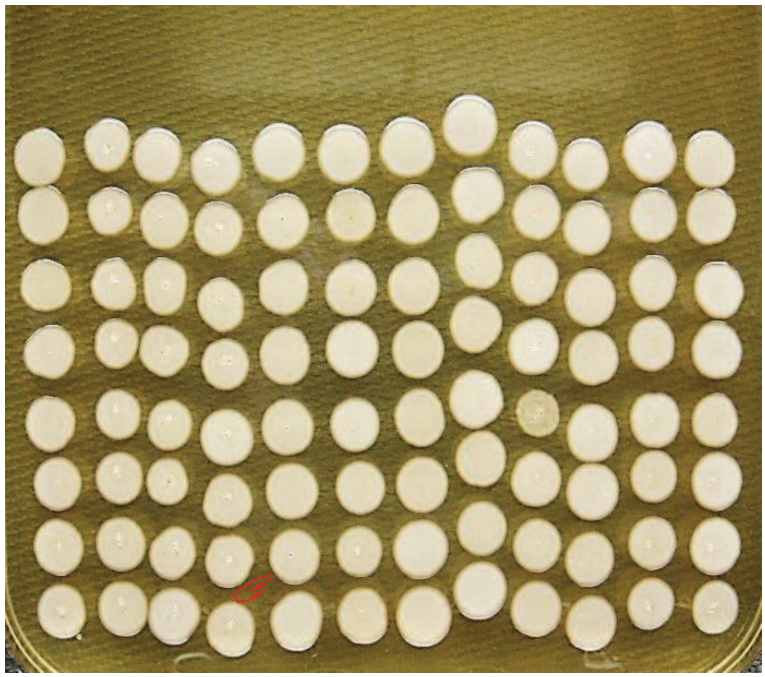


Figure 38 : Croissance (72 h, 28 °C) des 96 clones de *P. pastoris-CTROL4A* sur le milieu YPD additionné de 1 mg.mL^{-1} de zéocine (*Pointage : clone sélectionné*)

5 SUREXPRESSION HETEROLOGUE DES PROTEINES

A partir des clones sélectionnés dans l'étape précédente, les enzymes recombinantes ont été produites par culture en fermenteur comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 1.3.9 et §1.5.2). Comme nous pouvons le constater sur la Figure 39, cette culture se divise en deux grandes phases. La première, qui dure 30 h, est la phase de croissance sur glycérol (batch). Elle est suivie par une phase d'induction et de croissance sur méthanol durant 96 h (fed-batch). La croissance de tous les clones est la même pour les premières heures mais des différences peuvent être observées au cours des 50 dernières heures de culture. La biomasse en fin de culture varie de 72 $g.L^{-1}$ pour AflaL0a à 92,5 $g.L^{-1}$ pour CdubL0e. Cette différence de biomasse n'est pas corrélée à la quantité de protéine produite. En effet, la teneur en protéines dans le milieu en fin de culture varie énormément d'un clone à l'autre (jusqu'à un facteur 7). Ainsi les clones CdubL0e, CalbL3a, CtroL4a, AflaL0a et CaLA produisent respectivement 1,2, 0,7, 1,7, 4,9 et 5,2 $mg.mL^{-1}$ de protéine (éq. de CpLIP2).

Les analyses SDS-PAGE (Figure 40) montrent une bonne pureté des extraits enzymatiques obtenus à partir des surnageants de culture de *P.pastoris-CPLIP2*, *P.pastoris-CALA, P.pastoris-CTROL4A et P.pastoris-AFLAL0A,* après concentration et diafiltration par ultrafiltration tangentielle (seuil de coupure de 30 kDa). De plus, on peut voir sur la cette figure que CpLIP2, CaLA, CtroL4a et AflaL0a sont toutes des glycoprotéines qui, après déglycosylation avec l'endoglycosydase H, se résolvent en bandes uniques de masse moléculaire estimée à 54,5, 47, 52,8 et 51,5 kDa, respectivement. Ces productions hétérologues semblent donc avoir bien fonctionné.

Les extraits enzymatiques obtenus à partir des surnageants de culture de *P.pastoris-CALBL3A et P.pastoris-CDUBL0E* donnent des bandes à 60 et 63 kDa (Figure 41) peu intenses et moins pures que les précédentes. Le poids moléculaire apparent des deux protéines ne semble pas corrélé aux acides aminés qui les constituent (CdubL0e est plus la plus courte parmi les protéines étudiées). De plus, ces deux protéines semblent se dégrader après déglycolysation enzymatique avec l'Endo-H du fait que deux autres bandes de protéines apparaissent pour les échantillons déglycosylés (Figure 41). CalbL3a et CdubL0e semblent peu ou pas exprimées et plus instables que CtroL4a, AflaL0a et CaLA. Contrairement aux autres, ces deux extraits ne présentent pas d'activité catalytique vis-à-vis de l'oléate d'éthyle (Tableau 11).

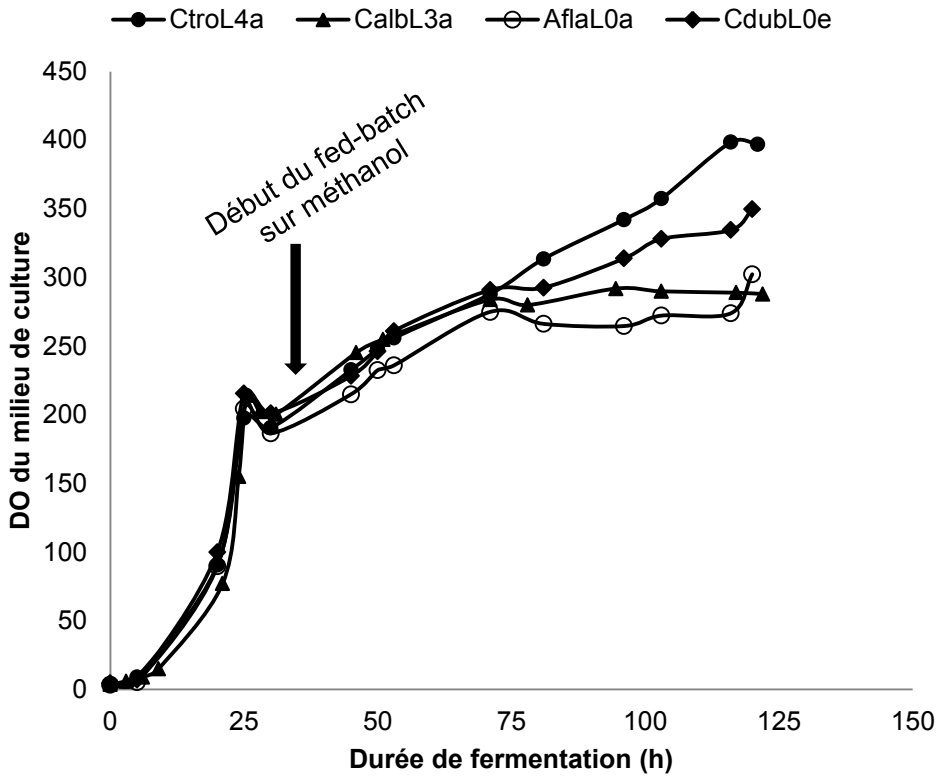


Figure 39 : Production des protéines en fermenteur par les clones de CtroL4a, CalbL3a, CdubL0e et AflaL0e

Tableau 11 : Quantité de protéine et activité lipolytique sur l'oléate d'éthyle des cinq extraits enzymatiques

L'activité a été dosée par CPG après une réaction enzymatique pendant 15 min à 30 °C pH 6,5 en présence de 10 mM d'émulsion PVA d'oléate d'éthyle. Le dosage de protéine s'est effectué par méthode de Bradford utilisant la protéine CpLIP2 comme standard d'étalon.

Extrait enzymatique	**Quantité de protéine dans le surnagent (mg.mL^{-1})**	**Activité sur l'oléate d'éthyle (U. mL^{-1} de surnagent)**	**Activité sur l'oléate d'éthyle (U. mg^{-1} de protéine)**
CtroL4a	1,7	140	79,2
AflaL0a	4,9	3,2	0,6
CaLA	5,2	2,4	0,4
CalbL3a	0,7	nd	nd
CdubL0e	1,2	nd	nd

nd : non détecté

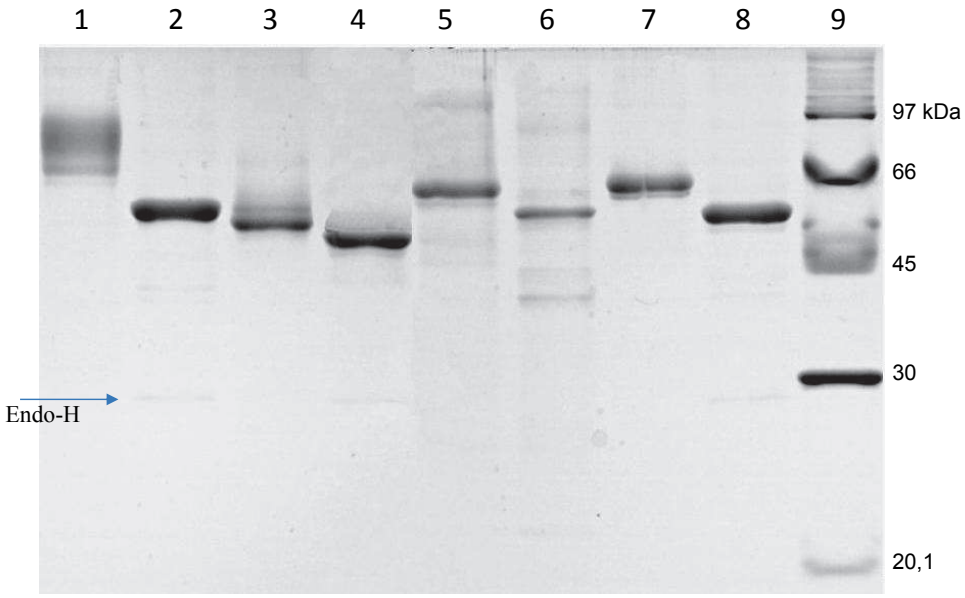


Figure 40 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques de CpLIP2, CaLA, CtroL4a et AflaL0a

Puits 1/2, 3/4, 5/6 and 7/8: échantillons non déglycosylés / déglycosylés de CpLIP2, CaLA, CtroL4a et AflaL0a, respectivement ; Puits 9: marqueurs moléculaires

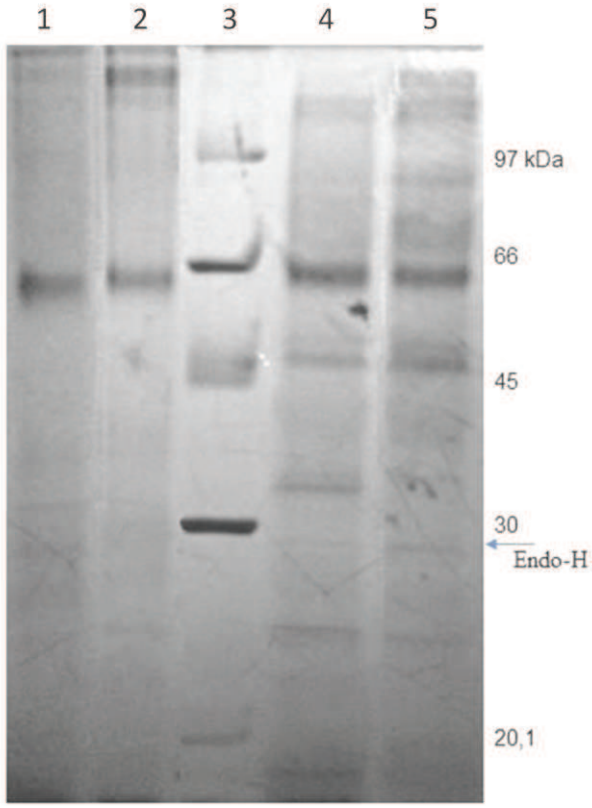


Figure 41 : SDS-PAGE des extraits enzymatiques de CdubL0e et CalbL3a

Puits 1 et 2 : CdubL0e et CalbL3a non déglycosylées ; puits 3 : marqueurs moléculaires ; puits 4 et 5 : CdubL0e et CalbL3a déglycosylées

Des essais avec d'autres substrats (mélange d'esters éthyliques d'acide gras saturé (C8-C18)) ont été effectués avec les surnageants de culture des clones de *P.pastoris-CALBL3A et P.pastoris-CDUBL0E*, mais aucune activité enzymatique n'a pu être détectée. Les protéines CalbL3a et CdubL0e semblent donc ne pas être fonctionnelles.

6 CONCLUSION

L'objectif du travail dans ce chapitre était de produire des protéines homologues à CpLIP2 en vue de leur caractérisation fonctionnelle. Après une recherche par l'algorithme BLAST dans la base de données NCBI, nous avons retenu 77 séquences de protéines dont l'identité avec CpLIP2 varie de 31 à 61 %. Parmi ces séquences, 26 étaient classées dans différentes familles homologues de la superfamille « *C. antarctica* lipase A like (abH38) », notamment dans les familles homologues de *C. antarctica* lipase A like (abH38.01), *C. albicans* lipase like (abH38.02) et *Aspergillus* lipase like (abH38.03). Des arbres phylogénétiques de ces séquences ont été ensuite construits, ce qui a permis de classer les nouvelles séquences étudiées. En plus, ces relations phylogénétiques ainsi que des critères additionnels ont servi à sélectionner 13 séquences pour la synthèse des gènes correspondants. Finalement, cette étude s'est concentrée sur cinq séquences avec des identités assez diversifiée (31-59 %) par rapport à CpLIP2 : CtroL4a, CalbL3a, CdubL0e, AflaL0a et CaLA. Les séquences nucléotidiques correspondantes ont été synthétisées et sous-clonées dans le vecteur pPICZαB pour ensuite réaliser la transformation de *P. pastoris* X33 et la surexpression hétérologue des protéines.

Nous avons vu que les différents clones de *P. pastoris* X33 transformés avec différents gènes ont quasiment la même croissance sur le même milieu synthétique alors que la production de protéine recombinante est considérablement différente d'un transformant à un autre.

Nous avons montré que CalbL3a (50 % d'identité avec CpLIP2) et CdubL0e (41 % d'identité avec CpLIP2) ne sont pas bien produites et n'ont pas d'activité lipolytique détectable dans nos conditions (sauf peut-être une légère activité estérase sur tributyrine). Cette absence d'activité pourrait être corrélée au fait que ces deux protéines sont assez divergentes par rapport aux motifs conservés dans les séquences de référence (CpLIP2 et CaLA) :

- CalL3a possède les motifs CSPSY et YAQEL au lieu des CAPSY et YAPEL, et a 5 cystéines au lieu de 4 ;
- CdubL0e possède le motif GYSYG au lieu de GYSGG, un acide glutamique E au lieu d'un aspartique D dans sa triade catalytique, et 6 cystéines. C'est de plus la séquence la plus courte de la sélection (411 acides aminés).

On constate donc que les originalités de séquences, même si elles sont retrouvées dans un même sous-groupe phylogénétique, sont à l'origine de protéines non-fonctionnelles. Il serait donc peut être plus prudent de sélectionner des protéines dont les motifs caractéristiques sont parfaitement conservés.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que les deux protéines AflaL0a (35 % d'identité avec CpLIP2 ; 4 cystéines, motifs GYSGG, YAPEL et CAPSY) et CtroL4a (59 % d'identité avec CpLIP2 ; 4 cystéines, motifs GYSGG, YAPEL et CAPSY) qui étaient respectivement classifiées comme la lipase hypothétique de *A. flavus* et le précurseur de lipase de *C. tropicalis* sont des lipases fonctionnelles, comme CaLA de *C. antarctica*. Notre système d'expression avec le vecteur pPICZαB dans *P. pastoris* nous a permis d'obtenir une production suffisamment importante de ces protéines recombinantes pour poursuivre ce travail par leur caractérisation fonctionnelle. En effet nous avons pu déjà observer que leurs activités catalytiques sont différentes. La caractérisation complète est détaillée dans le chapitre suivant, notamment par rapport à leur aptitude à catalyser les réactions de transfert d'acyles en milieux aqueux.

Chapitre 3
Caractérisation fonctionnelle des nouvelles lipases

1 INTRODUCTION

Nous avons vu dans le chapitre 2 la production de lipases à partir des clones *P. pastoris* obtenus par une approche d'ingénierie génétique à travers l'exploitation bioinformatique des séquences protéiques de la base de données NCBI. En effet, nous avons sélectionné 5 séquences de protéines (CtroL4a, CalbL3a, CdubL0e, AflaL0a et CaLA) pour la synthèse d'ADN, la transformation de *P. pastoris* et la surexpression hétérologue. Finalement, nous avons pu montrer que parmi les cinq protéines obtenues, les protéines CtroL4a, AflaL0a et CaLA sont fonctionnelles. Ces trois enzymes ont une homologie assez diversifiée (59, 35 et 31 % d'identité, respectivement) par rapport à la lipase/acyltransférase CpLIP2. Néanmoins, elles partagent certains motifs sur leur séquence, notamment GYSGG, CAPSY et YAPEL.

Le présent chapitre se consacre à la caractérisation de ces quatre enzymes, notamment considérant leur aptitude à catalyser la réaction d'alcoolyse en milieu aqueux dans différentes conditions expérimentales (nature des substrats lipidiques et alcooliques, pH et température).

2 ACTIVITE DE TRANSESTERIFICATION EN MILIEU AQUEUX

Nous avons comparé les quatre enzymes en conditions standards pour évaluer leur activité de transfert d'acyle lors de la méthanolyse de l'oléate d'éthyle (C18 :1 EE) en émulsion aqueuse comme précédemment décrit [Brunel *et al.*, 2004]. Dans ces conditions, si l'enzyme caractérisée est une lipase/acyltransférase, l'activité de transfert est prédominante devant l'hydrolyse, et ce avec une a_w très élevée et une faible concentration de l'accepteur nucléophile (ici le méthanol). Le ratio de transesterification (RT) est déterminé par le rapport entre la vitesse initiale de formation d'ester et la vitesse totale de la réaction (formation de l'ester + l'acide gras). D'un point de vue thermodynamique, quand la teneur en méthanol augmente, la transestérification est favorisée par le déplacement de l'équilibre réactionnel dû à la réduction de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) et à l'augmentation de celle du méthanol. Dans des conditions testées (0 à 5 M de méthanol), l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) du milieu réactionnel est toujours supérieure à 0,9 (a_w de 0,91 en présence de 5 M de méthanol à 30 °C selon le modèle UNIFAC).

Comme présenté dans la Figure 42, deux comportements ont été observés pour les quatre enzymes étudiées. En présence de CpLIP2 et CtroL4a, le RT augmente rapidement avec la concentration de méthanol et atteint 50 % en présence de 0,06 et 0,3 M de méthanol, respectivement. La transestérification représente 97 % de l'activité totale de CpLIP2 en présence de 2,2 M méthanol et l'hydrolyse n'est plus détectable pour les concentrations supérieures à 4 M. En présence de CtroL4a, le RT est également supérieur à 90 % pour des concentrations supérieures à 4 M de méthanol, avec une vitesse d'hydrolyse représentant encore environ 7 % du total pour 5 M de méthanol. Inversement, le comportement de CaLA et AflaL0a les rapproche des lipases classiques [Lecointe *et al.*, 1996], avec seulement 50 % de RT en présence d'environ 2 M méthanol et 75 % de RT pour la concentration en méthanol la plus élevée testée (5 M). La réaction d'hydrolyse compétitive (résiduelle) est donc non négligeable en présence de CaLA et AflaL0a.

L'activité totale (somme des réactions de transestérification et d'hydrolyse) augmente avec la concentration en méthanol jusqu'à un optimum en présence de 2-3 M de méthanol pour CpLIP2 et CtroL4a, alors qu'elle continue à augmenter jusqu'à 5 M de méthanol en présence des deux lipases CaLA et AflaL0a (Figure 43). De plus, une différence entre CpLIP2 et CtroL4a est observée : CtroL4a reste entièrement active en présence de 5 M de méthanol (activité totale similaire à celle mesurée en absence de méthanol) alors que CpLIP2 est très inhibée (85 % de perte d'activité) à ce niveau de concentration, comme décrit auparavant [Briand *et al.*, 1995b]. Le comportement de CtroL4a est ainsi similaire à celui de CaLIP4 [Roustan *et al.*, 2005].

Les deux groupes d'enzymes se distinguent également par leur activité spécifique d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle, qui est de 91 à 282 fois plus importante pour CpLIP2 et CtroL4a que pour CaLA et AflaL0a (respectivement, 63 ± 2, 79 ± 1, 0,28 ± 0,01 et 0,69 ± 0,01 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ protéine).

En résumé, parmi les quatre enzymes testées, CpLIP2 et CtroL4a présentent la plus forte aptitude à catalyser la réaction d'alcoolyse (transfert d'acyle) en présence de faibles concentrations en méthanol. Cette propriété est donc conservée uniquement avec la lipase la plus homologue à CpLIP2 (59 % d'identité). Ces deux enzymes sont effectivement très proches notamment sur un large segment autour du motif GYSGG. Les similitudes de séquences et de structures entre les enzymes sont discutées en conclusion (Chapitre 3, § 7).

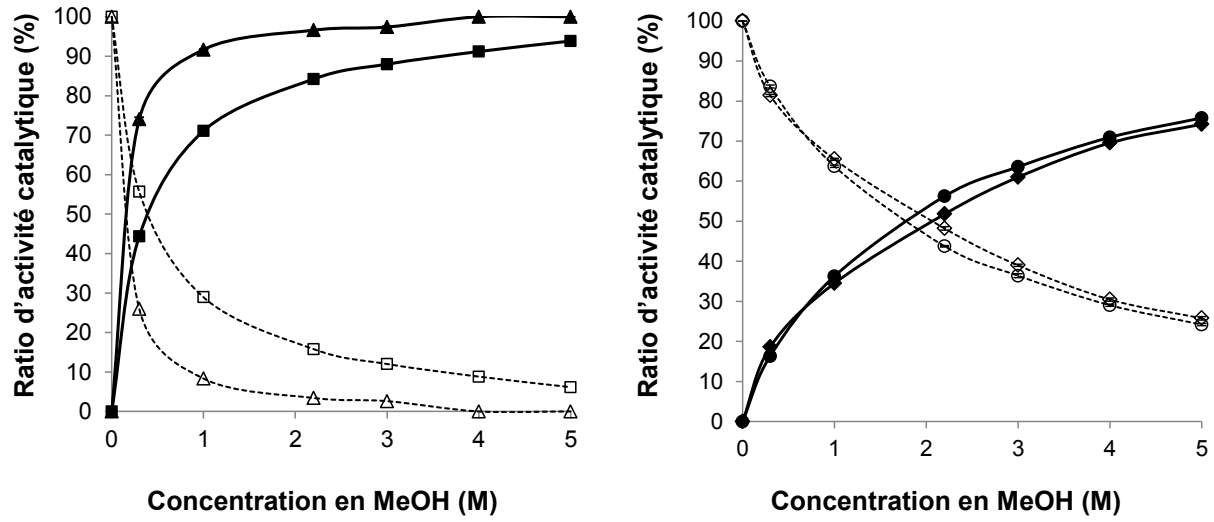


Figure 42 : Comportement catalytique des enzymes en présence de différentes concentrations en méthanol dans le milieu réactionnel

(▲transestérification pour CpLIP2; △ hydrolyse compétitive pour CpLIP2; ■ transestérification pour CtroL4a; □ hydrolyse compétitive pour CtroL4a; ● transestérification pour CaLA; ○ hydrolyse compétitive pour CaLA; ◆ transestérification pour AflaL0a; ◇ hydrolyse compétitive pour AflaL0a). Les réactions ont été effectuées sur 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion PVA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité totale.

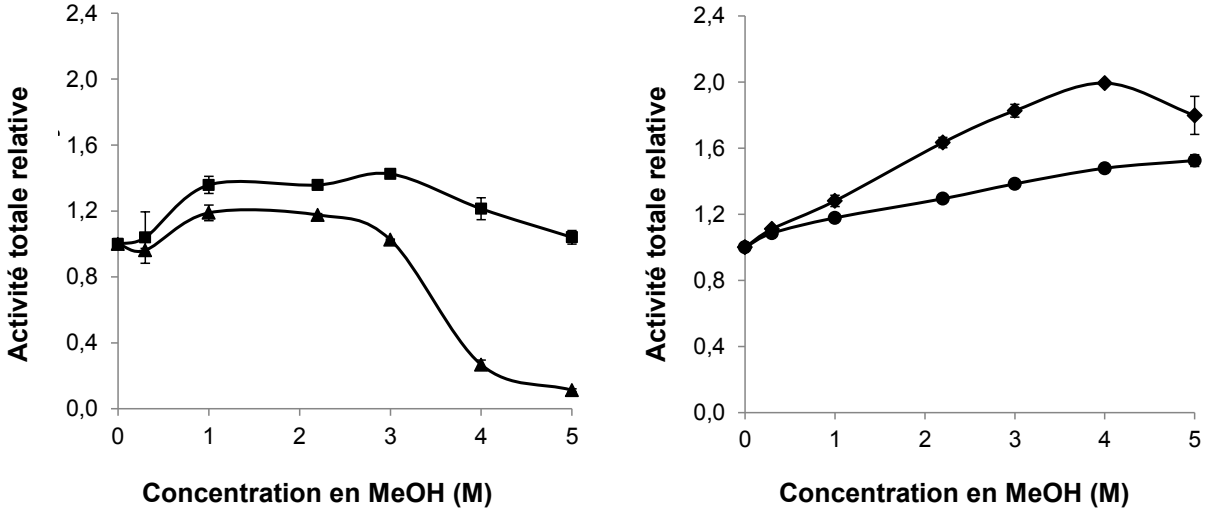


Figure 43 : Effet du méthanol sur l'activité catalytique totale (transestérification + hydrolyse compétitive) des enzymes (▲ CpLIP2; ■ CtroL4a; ● CaLA; ◆ AflaL0a).

Les résultats sont issus des mêmes expériences que pour la Figure 42 : réactions effectuées durant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion PVA). Les résultats pour chaque enzyme sont exprimés relativement à l'activité catalytique spécifique en condition sans méthanol : 63 ± 2, 79 ± 1, 0,28 ± 0,01 et 0,69 ± 0,01 µmol.min^{-1}.mg^{-1} de protéine (éq. CpLIP2) pour CpLIP2, CtroL4a, CaLA et AflaL0a, respectivement.

3 EFFET DE LA NATURE DE L'ALCOOL SUR LA TRANSESTERIFICATION

Par ailleurs, les applications des acyltransférases englobent la production de divers produits de transacylation, parmi lesquels on retrouve différents alkyl esters. Afin de comparer la sélectivité de substrat des quatre enzymes, l'effet de la nature des accepteurs d'acyle et du substrat lipidique a donc été étudié.

La transestérification de l'oléate de méthyle (C18:1 ME) en émulsion a été effectuée en milieu aqueux (a_w > 0,99) en présence d'un de ces alcools : primaires (éthanol, 1-propanol, 2-méthyl-1-propanol ou 1-butanol), secondaires (2-propanol, 2-butanol, ou 3-pentanol) ou tertiaire (2-méthyl-2-propanol). Divers paramètres tels que la classe, la longueur de chaine ainsi que la concentration des alcools ont ainsi été étudiés.

Tout d'abord, notons que l'activité spécifique totale des lipases/acyltransférases (CpLIP2 et CtroL4a) est considérablement supérieure (71 à 300 fois) à celle de AflaL0a et CaLA (Figure 44). En effet, en condition sans alcool, l'activité spécifique est de 74 ± 3, 71 ± 3, 0,25 ± 0,01 et 0,99 ± 0,01 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ (éq. de protéine CpLIP2) pour CpLIP2, CtroL4a, CaLA et AflaL0a, respectivement.

De plus, la Figure 44 montre que toutes les enzymes catalysent la synthèse d'esters avec tous les alcools primaires et secondaires testés, mais pas avec le tert-butanol. En présence de ce dernier, non seulement l'activité de transestérification n'est pas détectable, mais l'hydrolyse est aussi inhibée, en particulier pour CpLIP2 et CtroL4a (respectivement 8,5 et 19 % de l'activité spécifique d'hydrolyse sans alcool dans le milieu).

Remarquons que dans les conditions testées, CaLA ne catalyse pas de synthèse d'ester de tert-butanol (2-méthyl-2-propanol), alors que cette enzyme est connue pour son activité vis-à-vis de tert-alcools [Bosley *et al.*, 1997; Krishna *et al.*, 2002]. Cette activité avait cependant été mise en évidence en milieu contenant une moindre quantité d'eau pour une réaction de transestérification en milieu organique (a_w optimum à 0,11) en présence de l'acétate de vinyle et de 2-phénylbut-3-yn-2-ol comme substrats [Krishna *et al.*, 2002] ou pour une réaction d'estérification d'acides gras avec tert-alcools (<5 % d'eau) [Bosley *et al.*, 1997]. En plus, ces réactions ont été effectuées pendant une durée supérieure à 20 h.

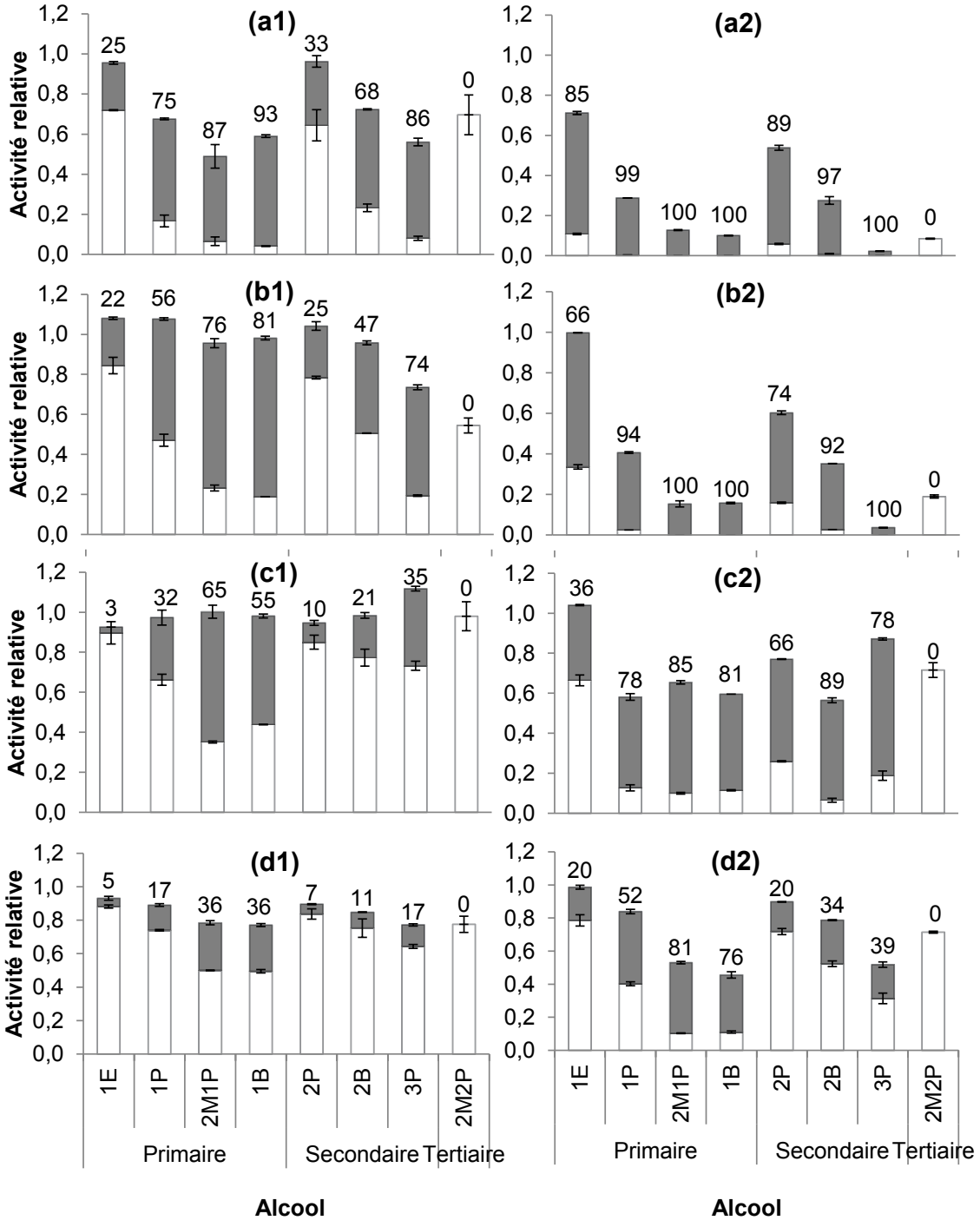


Figure 44 : Réactions de transestérification (■) et d'hydrolyse compétitive (□) catalysées par CpLIP2 (a1, a2), CtroL4a (b1, b2), CaLA (c1, c2) et AflaL0a (d1, d2)

Les réactions ont été réalisées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM de C18: 1 ME (émulsion PVA) et 0,03M (a1, b1, c1, d1) ou 0,3 M (a2, b2, c2, d2) d'alcool (1E : éthanol, 1P :1-propanol, 2M1P : 2-méthyle-1-propanol, 1B :1-butanol, 2P :2-propanol, 2B :2-butanol, 3P :3-pentanol ou 2M2P :2-méthyle-2-propanol ou tert-butanol). Les résultats pour chaque enzyme (moyenne ± écart-type) sont exprimés relativement à leur activité spécifique en condition sans alcool : 74 ± 3, 71 ± 3, 0,25 ± 0,01 et 0,99 ± 0,05 µmol.min^{-1}.mg^{-1} de protéine (éq. de CpLIP2) pour CpLIP2, CtroL4a, CaLA et AflaL0a, respectivement.Les valeurs au-dessus de chaque bart représente le ratio de transestérification (%)

Le ratio de transestérification le plus important est toujours obtenu avec CpLIP2, suivie par CtroL4a, CaLA et AflaL0a (Figure 44). Pour les quatre enzymes, le RT augmente avec la concentration en alcool tandis que l'activité totale est inhibée, en particulier pour CpLIP2 et CtroL4a.

Pour une même concentration en alcool, le ratio de transestérification augmente avec la longueur de la chaine alkyle ($RT_{Ethanol} < RT_{1\text{-propanol}} < RT_{1\text{-butanol}}$ et $RT_{2\text{-propanol}} < RT_{2\text{-butanol}} < RT_{3\text{-pentanol}}$). Nous observons une diminution parallèle de l'activité totale due à la réduction importante de l'activité d'hydrolyse alors que l'activité de transestérification généralement augmente ou demeure constante. Dans ces conditions, la diminution de la vitesse d'hydrolyse ne peut être expliquée par la déshydratation de l'enzyme car l'a_w est toujours supérieure à 0,9.

Le ratio de transestérification dépend également des isomères structuraux des alcools testés (classe d'alcool). Pour toutes les enzymes, nous observons que le RT décroit pour une même concentration en alcool avec la classe de celui-ci ($RT_{1\text{-butanol}} > RT_{2\text{-butanol}} > RT_{2\text{-methyl-2-propanol}}$). Cette décroissance s'accompagne d'une augmentation de l'activité d'hydrolyse qui représente la totalité de l'activité catalytique avec le tert-butanol.

Les variations de RT et d'activité totale illustrent les différents mécanismes impliqués dans les spécificités de substrat et de réaction des enzymes étudiées, mettant en rapport d'une part les interactions enzyme-substrat et les profils catalytiques, et d'autre part, les propriétés thermodynamiques de l'alcool accepteur. En effet, l'hydrophobicité des alcools augmente avec la longueur de la chaine carbonée [Paterson *et al.*, 1972], mais varie selon les isomères structuraux (primaire à chaine primaire alignée > primaire à chaine ramifiée > secondaire > tertiaire) [Lyon *et al.*, 1981]. Dans un système aqueux comme celui mis en œuvre dans notre étude, une hydrophobicité élevée engendre, à une concentration donnée en alcool, à la fois des activités thermodynamiques élevées de l'alcool et de l'eau et une activité thermodynamique faible de l'ester, qui influencent l'orientation de la réaction en terme de vitesse et d'équilibre. La compétition entre l'eau et l'alcool comme groupe accepteur d'acyle est modulée à la fois par l'activité thermodynamique des réactifs compétitifs et par les propriétés intrinsèques des biocatalyseurs qui catalyseront préférentiellement soit la réaction d'hydrolyse soit la réaction d'alcoolyse dans l'étape de déacylation du mécanisme catalytique.

Afin de mettre en évidence des corrélations entre les données, nous avons estimé les activités thermodynamiques de l'eau, des alcools et de l'ester dans nos conditions réactionnelles par la méthode UNIFAC (UNIFAC group contribution method) [Fredenslund

et al., 1975] en utilisant les paramètres d'équilibre liquide-liquide [Magnussen *et al.*, 1981]. Le résultat nous montre une faible variation de a_w (>0,99), tandis que les activités thermodynamiques des alcools et des esters varient respectivement entre 0,005 et 0,6 et entre 0,633 et 0,953 (Annexe 10).

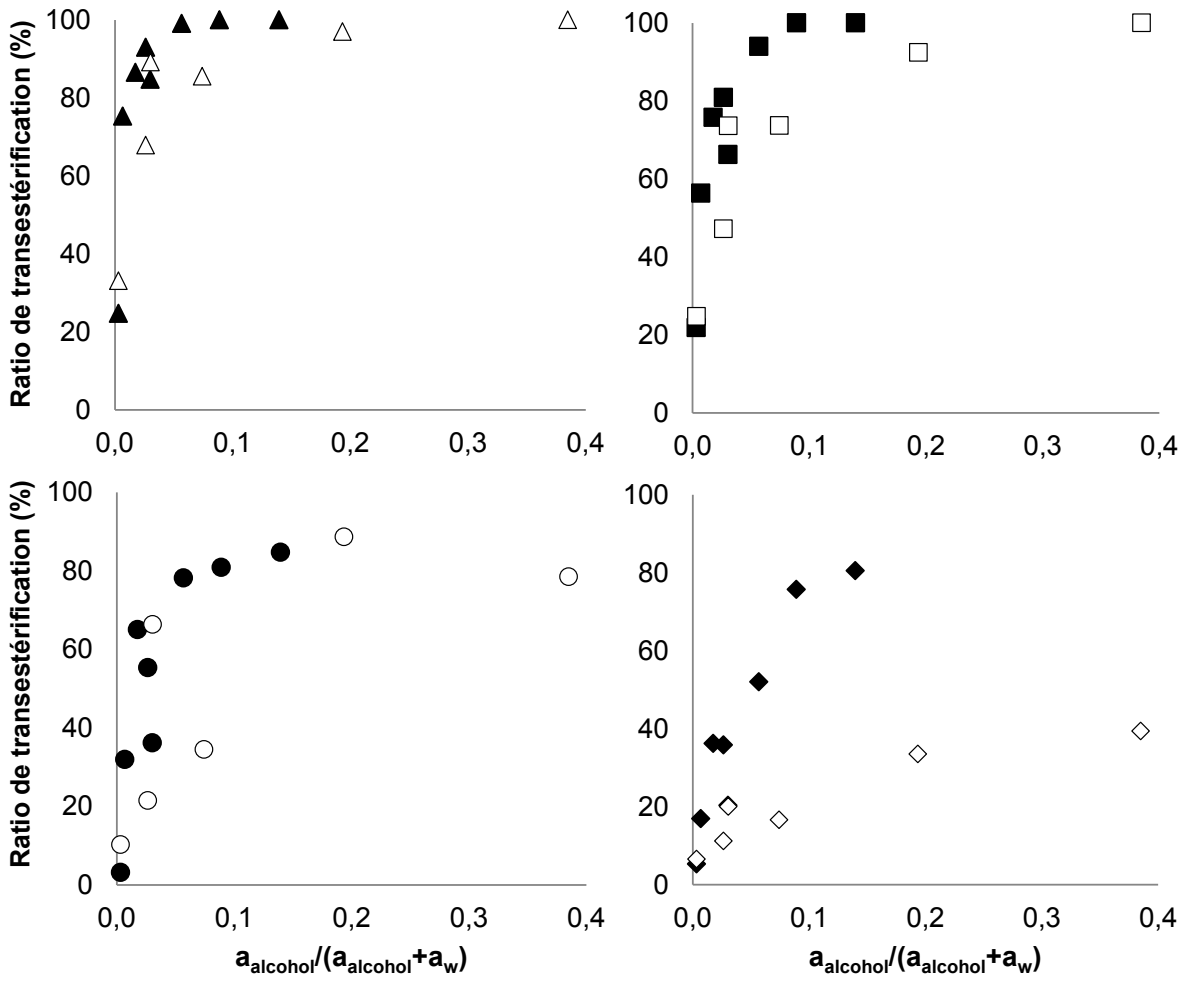


Figure 45 : Relation entre l'activité thermodynamique relative des alcools et de l'eau ($a_{alcool}/(a_{alcool}+a_w)$) et le ratio de transestérification pour les quatre enzymes ((▲△) CpLIP2 ; (■□) CtroL4a ; (●○) CaLA ; (◆◇) AflaL0a)

Les marqueurs pleins correspondent aux alcools primaires et les vides aux alcools secondaires. L'expérience est la même que dans la Figure 44 (concentrations en alcool : 0,03 M et 0,3 M). Les activités thermodynamiques sont estimées à l'aide du modèle UNIFAC-LLE, en tenant compte de la présence de l'alcool, de l'eau et de l'ester dans le système biphasique à 30 °C.

La Figure 45 illustre l'effet de l'activité thermodynamique des différents alcools (à 0,03 et 0,3 M) sur le ratio de transestérification, pour chaque enzyme. On peut voir que, d'une manière générale, le RT augmente (jusqu'à une valeur maximale spécifique de chaque enzyme) avec l'augmentation de l'activité thermodynamique relative des alcools ($a_{alcool}/(a_{alcool}+a_w)$), et ce presque indépendamment de la longueur de chaine ou de la classe de l'alcool considéré. Ce graphique montre bien le rôle prépondérant de l'activité thermodynamique des réactifs dans le comportement des quatre enzymes. Cependant, la Figure 45 illustre l'affinité particulière de CpLIP2 et de CtroL4a pour les alcools comme nucléophiles accepteurs d'acyles par rapport à l'eau (RT max supérieur à 90 %). Ces lipases/acyltransférases catalysent de façon plus importante l'alcoolyse et ce même avec les activités thermodynamiques (relatives) des alcools les plus basses et une a_w très élevée. Notons cependant que les enzymes testées ne montrent pas d'activité de transestérification vis-à-vis du tert-butanol en dépit d'une activité thermodynamique équivalente à celle du 2-butanol ($a_{tert\text{-}butanol}$ 0,03 et 0,2 à 0,03 et 0,3 M, respectivement).

De plus, tandis que CpLIP2, CtroL4a et CaLA montrent une discrimination limitée entre les alcools primaires et secondaires, l'activité de transestérification avec AflaL0a est beaucoup plus importante avec les alcools primaires qu'avec les secondaires (Figure 45), démontrant une sélectivité particulière de cette dernière vis-à-vis des alcools. Cette sélectivité la rend probablement régiosélective vis-à-vis des esters du glycérol qui comportent deux alcools primaires et un alcool secondaire.

L'ensemble de ces résultats montre que l'activité thermodynamique (relative) de l'alcool joue un rôle primordial dans le ratio de transestérification, en accord avec le mécanisme de compétition entre l'eau et l'alcool comme accepteur du groupement acyle précédemment proposée pour CpLIP2 [Briand *et al.*, 1995a; Briand *et al.*, 1995b; Briand *et al.*, 1995c]. De plus, l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre des nucléophiles comme accepteur d'acyle dépend non seulement des activités thermodynamiques de chacun, mais aussi des propriétés intrinsèques de la lipase, i.e. de ses spécificités de réaction et de substrat. Ainsi, avec les lipases/acyltransférases CpLIP2 et CtroL4a, l'activité de transfert atteint un niveau et une proportion élevés pour une très faible activité thermodynamique de l'alcool. A l'opposé, CaLA et AflaL0a nécessitent une valeur plus élevée d'activité thermodynamique de l'alcool pour obtenir un ratio de transestérification comparable.

Finalement, nous avons montré que la synthèse d'esters en milieu aqueux pouvait être catalysée par toutes les lipases testées. Cependant, le ratio de transestérification obtenu

dépend de l'activité thermodynamique de l'alcool dans le milieu réactionnel (donc de la nature de l'alcool et de sa concentration) mais aussi des spécificités de substrat et de réaction de l'enzyme. Les alcools à courte chaine tels que le méthanol et l'éthanol ne sont pas de bons accepteurs de groupement d'acyle du fait de leur similarité avec l'eau (donc de leur faible activité thermodynamique dans l'eau), ce qui les rend moins compétitifs. Dans ce cas, les lipases/acyltransférases, pour lesquelles les alcools sont des nucléophiles préférentiels, sont plus efficaces que les lipases conventionnelles.

4 INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ESTER SUR LA TRANSESTERIFICATION

Nous avons ensuite étudié l'influence de la nature des esters (en tant que donneurs de groupement acyle) sur le ratio de transestérification et l'activité totale. Pour cela, la transestérification de nombreux esters (saturés, insaturé, avec différents groupements alkyles), avec éventuellement le méthanol comme accepteur de groupement acyle, a été étudiée en conditions aqueuses en présence des quatre enzymes.

4.1 Saturation, insaturations et groupements alkyles

Les résultats montrent que les activités d'hydrolyse sur l'ester saturé laurate d'éthyle (C12:0 EE) en absence de méthanol sont relativement proches pour les quatre enzymes (0,25 à 5 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines). Au contraire, les spécificités d'activités sur les substrats lipidiques insaturés sont très différentes (Figure 46 et Figure 47). CpLIP2 et CtroL4a sont très actives vis-à-vis des esters insaturés à longue chaine avec des niveaux d'activité de l'ordre de 97 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines, ce qui représente jusqu'à 300 fois plus d'activité que sur le C12:0 EE pour CtroL4a. Ce facteur augmente jusqu'à 600 fois en condition d'alcoolyse (en présence de 2,2 M de méthanol). CaLA et AflaL0a présentent des activités nettement inférieures (de 0,1 à 5 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines) et CaLA est la seule pour laquelle l'activité est plus élevée sur l'ester saturé (transformation du C12:0 EE 8 à 30 fois plus rapide que celle des esters insaturés testés). La préférence de CaLA vis à vis des substrats saturés avait déjà été mise en évidence dans d'autres études [Kirk and Christensen, 2002].

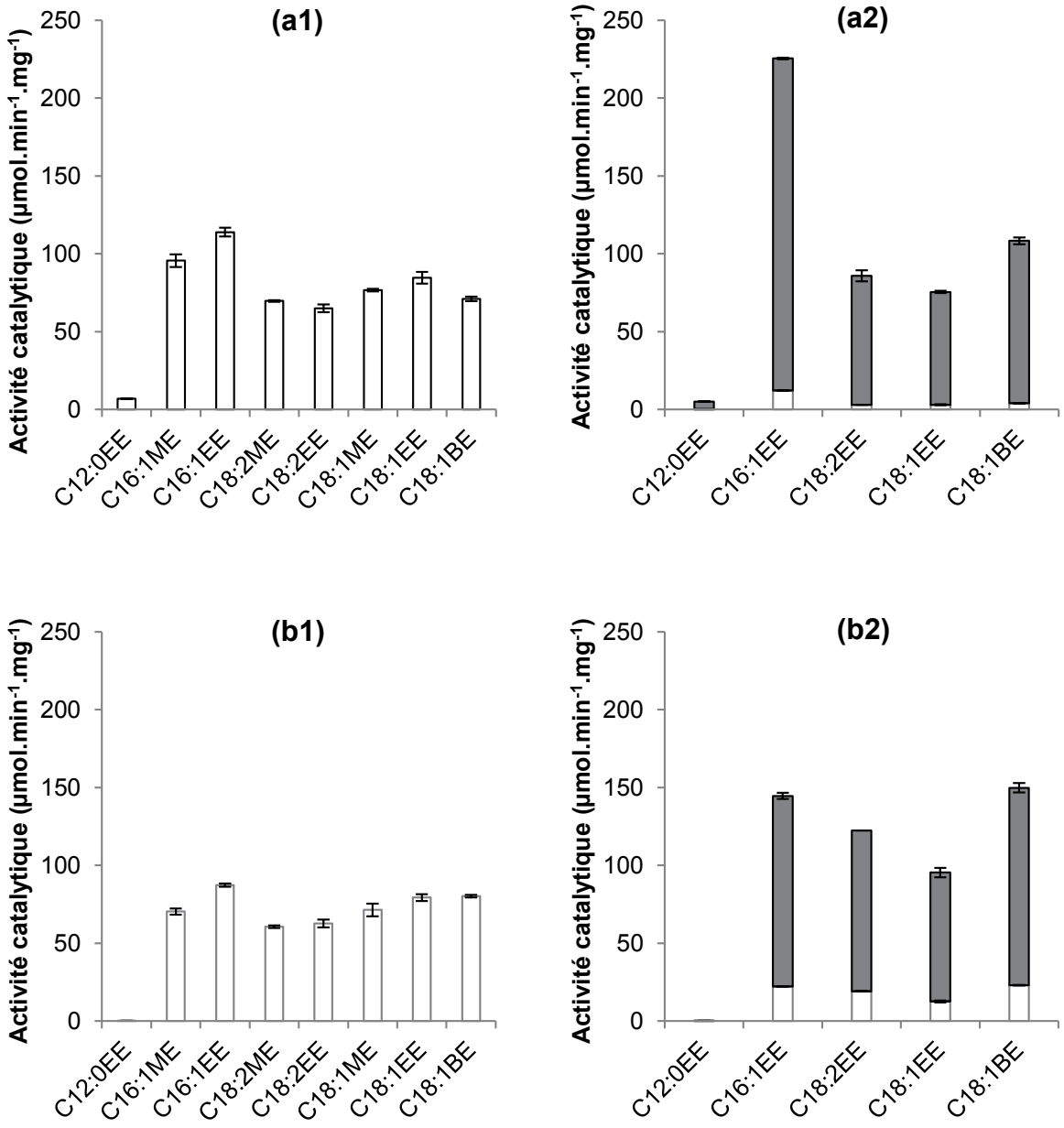


Figure 46 : Activité catalytique totale des enzymes CpLIP2 (a) et CtroL4a (b) vis-à-vis de divers substrats

Les histogrammes blancs (a1 et b1) représentent l'activité en absence de méthanol (hydrolyse seule) et les histogrammes blancs et gris (a2 et b2) la somme des activités d'hydrolyse compétitive et de transestérification avec 2,2 M de méthanol dans le milieu réactionnel (uniquement pour les esters éthyliques, EE et butyliques, BE). Les réactions ont été effectuées 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM d'ester (en émulsion de PVA). Les résultats (µmol.min^{-1}.mg^{-1} éq. de protéine CpLIP2) sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

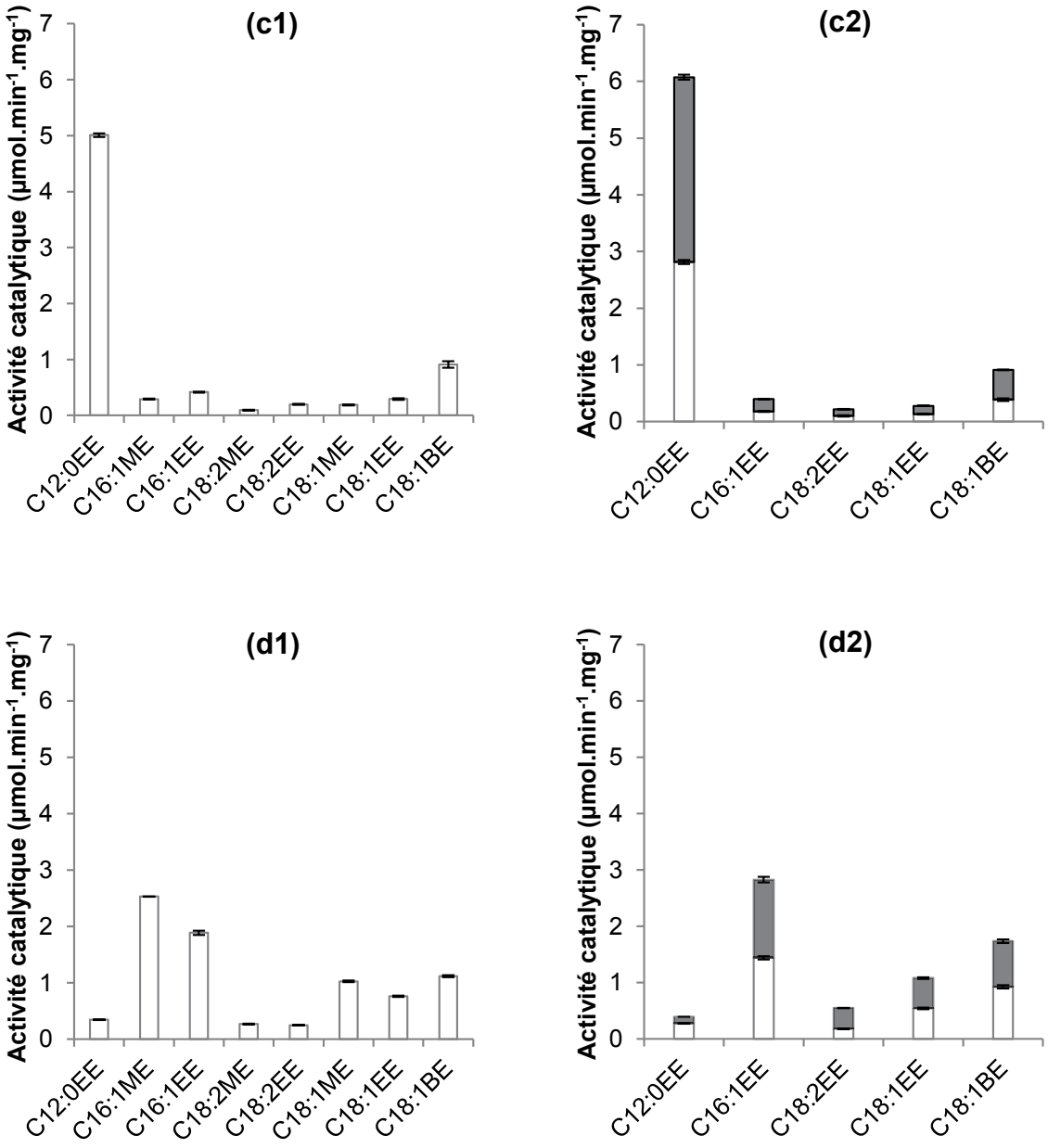


Figure 47 : Activité catalytique totale des enzymes CaLA (c) et AflaL0a (d) vis-à-vis de divers substrats

Les histogrammes blancs (c1 et d1) représentent l'activité en absence de méthanol (hydrolyse seule) et les histogrammes blancs et gris (c2 et d2) la somme des activités d'hydrolyse compétitive et de transestérification avec 2,2 M de méthanol dans le milieu réactionnel (uniquement pour les esters éthyliques, EE et butyliques, BE). Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM d'ester (émulsion PVA). Les résultats (µmol.min^{-1}.mg^{-1} éq. de protéine CpLIP2) sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

La nature de la chaine alkyle de l'ester insaturé (méthyle, éthyle ou butyle) a peu d'influence sur l'activité d'hydrolyse seule de CpLIP2 et CtroL4a, mais des différences peuvent être observées avec CaLA pour le C18 :1 et AflaL0a pour le C16 :1 (notamment AflaL0a est la seule enzyme pour laquelle l'activité d'hydrolyse est plus élevée sur les esters méthyliques que sur les esters éthyliques). Les écarts deviennent plus significatifs pour toutes les enzymes en présence de méthanol, l'activité totale sur C18 :1EE est alors toujours inférieure à celle sur C18 :1BE. Ces différences sont difficiles à interpréter mais nous pouvons néanmoins noter que l'effet de l'alcool donneur est différent de celui de l'alcool-accepteur d'acyle puisque, en tant qu'accepteur d'acyle, le butanol avait un effet inhibiteur sur l'activité totale plus important que l'éthanol (chapitre 3, § 3).

D'une façon générale, l'activité sur les esters insaturés est maximale avec l'ester le plus court testé (C16:1 avec CpLIP2, AflaL0 et CtroL4), et/ou le plus long (C18 :1 BE avec CaLA et CtroL4). Cette préférence est exacerbée lorsque l'activité totale augmente (hydrolyse et transfert sur le C16:1EE en présence de 2,2 M de méthanol). En condition d'hydrolyse seule, l'effet significatif d'une double insaturation de l'ester (comparaison entre C18:1EE et C18:2EE) ne semble pas observé, sauf pour AflaL0a qui présente une activité nettement plus élevée avec le mono-insaturé. En présence de méthanol, l'effet de cette double insaturation tend cependant à augmenter l'activité catalytique pour CpLIP2 et CtroL4 (moins d'activité totale avec le mono-insaturé).

Considérant l'activité de transestérification et d'hydrolyse compétitive en présence de 2,2 M de méthanol, les RT sont stables pour CpLIP2, CtroL4a et CaLA (Figure 48), mais varient plus significativement pour la lipase AflaL0a (96 ± 2; 84 ± 2; 54 ± 2 et 48 ± 13 %, respectivement). Cela suggère que, contrairement à son effet sur l'activité totale, la nature du donneur d'acyle n'a généralement pas d'influence sur le RT. Ainsi, d'un ester à l'autre, l'activité de transestérification et l'activité d'hydrolyse compétitive varient dans les mêmes proportions avec CpLIP2, CtroL4a et CaLA, ce qui indique que la différence de sélectivité de réaction ne dépend que de l'affinité relative de ces enzymes pour l'eau et l'alcool accepteur. Pour AflaL0a, les phénomènes de sélectivités mis en jeu semblent plus complexes. En effet le RT est maximum avec l'ester di-insaturé et minimum avec le saturé tandis que l'activité est similaire avec les esters mono-insaturés. Ce RT n'est par contre apparemment pas influencé par la longueur du groupement alkyle (pas de différence entre C18 :1EE et C18 :1BE).

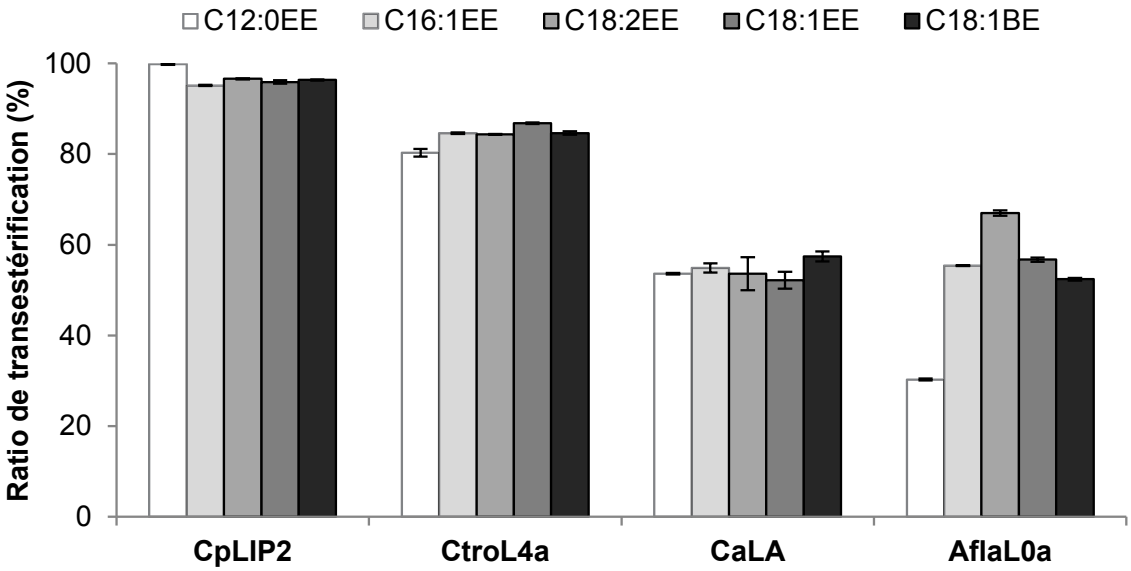


Figure 48 : Ratios de transestérification pour chaque enzyme, obtenus après la transestérification de divers esters saturés et insaturés

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 2,2 M de méthanol et de 10 mM de chaque ester (même série d'expérience qu'en Figure 46 et Figure 47)

On constate finalement que la nature de l'ester donneur d'acyle a un effet très significatif sur l'activité spécifique totale, particulièrement en fonction de la longueur de chaine et du degré d'insaturation de la chaine acyle mais aussi, dans une moindre mesure, en fonction de la nature du groupement alkyle. Les quatre lipases présentent trois profils différents : CpLIP2 et CtroL4a apparaissent sélectives pour les esters insaturés en général, tandis que AflaL0a privilégie les esters mono-insaturés et CaLA les chaînes saturées. Pour CaLA cela va bien dans le sens d'une préférence pour les substrats encombrants et plutôt rectilignes [Kirk and Christensen, 2002]. Le ratio de transestérification est par contre, pour une enzyme donnée, globalement indépendante de la nature de l'ester bien qu'une discrimination en fonction du degré d'insaturation ait été observée pour AflaL0a. Cette dernière semble être la plus sensible à la structure du donneur d'acyle parmi les quatre lipases testées. CpLIP2 et CtroL4a sont toujours caractérisées par leur fort niveau d'activité acyltransférase.

4.2 Spécificité vis-à-vis de la longueur de la chaine acyle du substrat

Toujours pour l'étude de la spécificité de substrat donneur d'acyle de nos lipases, après avoir étudié les effets du degré d'insaturation de l'acyle et de la longueur de la chaine alkyle du substrat, nous avons étudié la spécificité des quatre enzymes vis-à-vis de la longueur de la chaine carbonée du groupement acyle. Pour cela nous avons effectué des expériences avec des substrats en mélange, afin de déterminer les constantes de spécificité 1/α de chaque enzyme [Vaysse *et al.*, 2002]. Les préparations contenaient des esters éthyliques ou méthyliques d'acides gras saturés (C8, C10, C12, C14, C16 et C18) en mélange équimolaire (10 µmol.mL^{-1} d'esters au total, soit 1,66 µmol.mL^{-1} de chaque). Les spécificités de substrat ont été mesurées dans deux conditions différentes : 1) hydrolyse seule des mélanges d'esters méthyliques ou éthyliques et 2) transestérification du mélange d'esters éthyliques en présence de 2,2 M de méthanol.

4.2.1 Hydrolyse du mélange d'esters éthyliques ou méthyliques

Dans un premier temps, notons que les activités spécifiques mesurées dans ces expériences sont inférieures à celles obtenues précédemment car, à l'exception de CaLA, les enzymes testées sont plus actives sur les substrats insaturés, particulièrement CpLIP2 et CtroL4a (dont les activités spécifiques sur les esters saturés sont cependant comparables voire supérieures à celles de CaLA et AflaL0a). Les activités sur les esters en C12 saturés, présents dans les expériences du paragraphe 4.1 peuvent servir de références. Les concentrations en enzyme ont été ajustées en conséquence, de façon à obtenir des activités équivalentes pour l'hydrolyse de laurate d'éthyle (C12 :0EE). Un tableau récapitulatif est présenté en conclusion de cette partie (Tableau 12, § 4.3).

La Figure 49 montre les constantes de spécificité de substrat [Vaysse *et al.*, 2002] pour la réaction d'hydrolyse d'un mélange d'esters éthyliques (C8-C18) et d'un mélange d'esters méthyliques (C8-C18) d'acides gras saturés. Deux profils de spécificités sont observés : une distribution monomodale pour CpLIP2 et CaLA, et une distribution bimodale pour les deux autres enzymes.

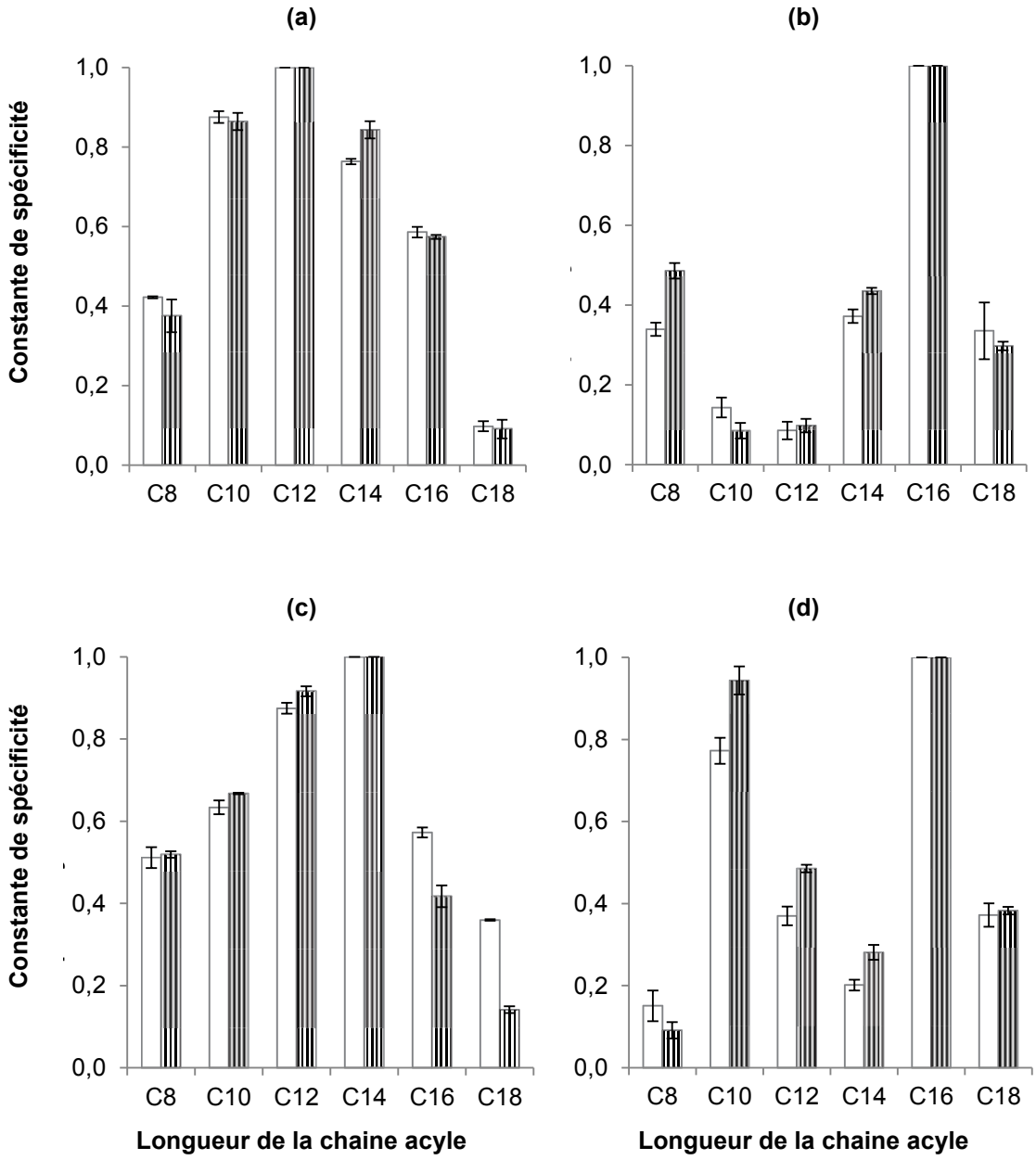


Figure 49 : Constante de spécificité (1/α) pour l'hydrolyse d'un mélange d'esters éthyliques (□) ou méthyliques (■) d'acides gras saturés C8-C18 catalysée par CpLIP2 (a), CtroL4a (b), CaLA (c) et AflaL0a (d)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 10 mM de mélange d'esters (émulsion PVA). Les résultats sont la moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

Dans le profil monomodal de CpLIP2 et CaLA, les esters en C12 et C14 apparaissent comme substrats préférentiels, l'activité relative diminuant avec la longueur de chaine entre C8 et C12, et avec l'allongement de cette chaine au-delà de C14. CtroL4a et AflaL0a présentent des spécificités plus marquées, avec le C16 comme substrat préférentiel. AflaL0a affiche également une spécificité élevée pour les C10 ($1/\alpha \geq 0,8$) tandis que CtroL0a pourrait avoir un second optimum pour des longueurs de chaines inférieures à celles testées, dénotant un comportement d'estérase. De plus, ces résultats indiquent que la spécificité de chaque enzyme vis-à-vis de différentes chaines acyles des esters éthyliques est généralement similaire à celle des esters méthyliques, bien que quelques différences significatives entre les esters éthyliques et les esters méthyliques soient observées. Ces différences de spécificité vis-à-vis de la chaine alkyle peuvent être corrélés à celles obtenus avec les esters insaturés au paragraphe 4.1: affinités plus élevées de CaLA pour les esters éthyliques (C16 et C18) et de AflaL0a pour les esters méthyliques (C10, C12 et C14), cette dernière apparaissant là encore comme l'enzyme la plus « sensible » à la nature de ses substrats. L'affinité légèrement supérieure de CtroL4a pour l'ester méthylique en C8 fait figure d'exception.

4.2.2 Transestérification du mélange d'esters éthyliques avec du méthanol

La Figure 50 montre les constantes de spécificité pour les réactions de transestérification et d'hydrolyse compétitive lors de la réaction du mélange d'esters éthyliques d'acides gras saturés C8-C18 avec 2,2 M de méthanol en présence des quatre enzymes.

Tout d'abord nous constatons que les profils de spécificité obtenus en présence de méthanol (somme des activités d'hydrolyse et de transestérification) ne sont pas significativement différents de ceux obtenus en condition d'hydrolyse seule (Figure 49). Ainsi, la présence de méthanol (2,2 M) dans le milieu réactionnel n'a pas d'influence significative sur la spécificité de substrat (donneur d'acyle). Cela avait déjà été observé pour CpLIP2 dans des travaux précédents [Brunel *et al.*, 2004; Neugnot *et al.*, 2002; Vaysse *et al.*, 2002].

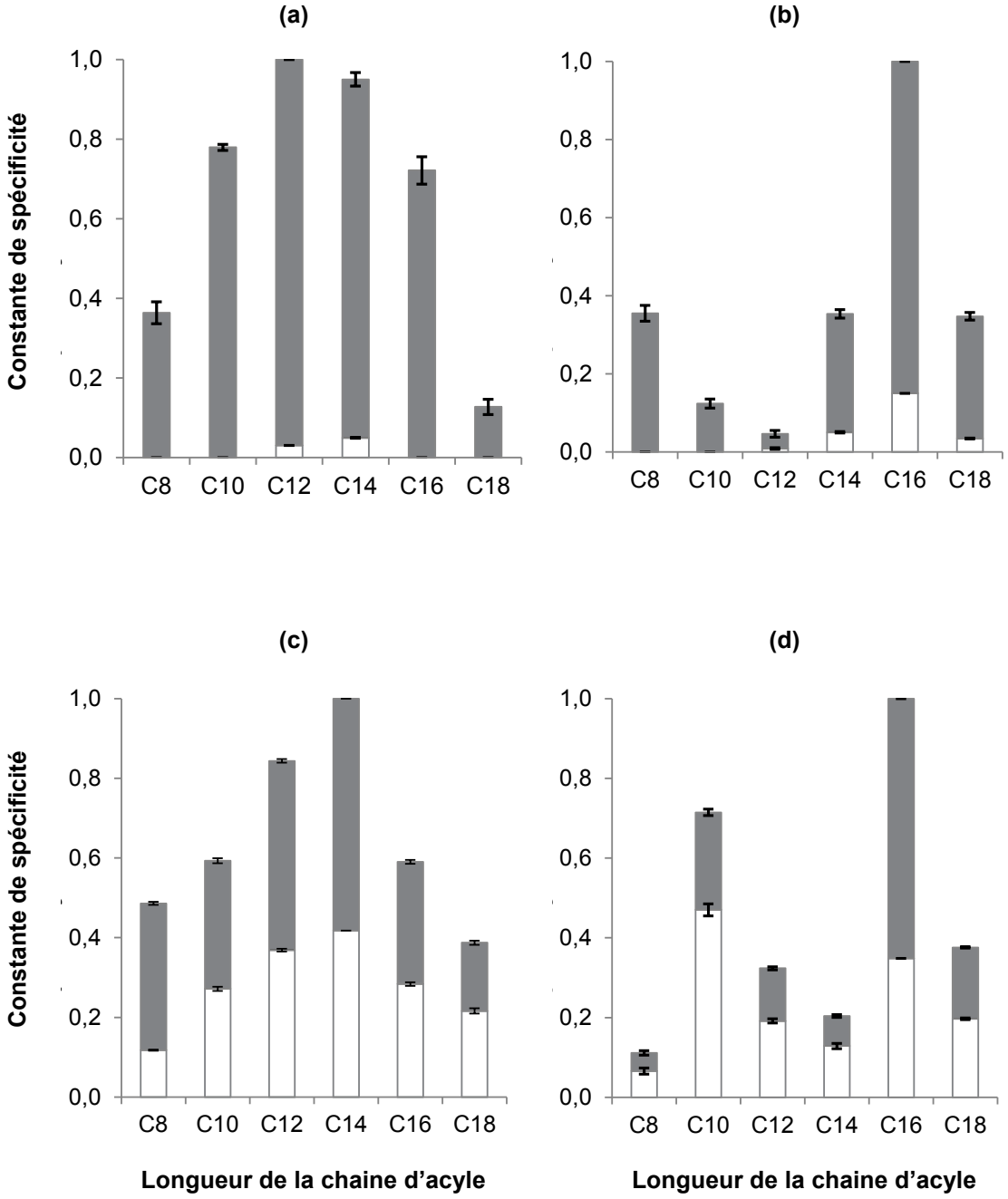


Figure 50 : constante de spécificité (1/α) pour la transestérification (■) et l'hydrolyse compétitive (□) catalysées par diverses lipases (CpLIP2 (a); CtroL4a (b); CaLA (c); AflaL0a (d)) lors de la transestérification du mélange d'esters éthyliques d'acides gras saturés C8-C18

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 2,2 M de méthanol et de 10 mM de mélange d'esters éthyliques. Les résultats sont la moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

Considérant les réactions de transestérification et d'hydrolyse compétitive, les ratios moyens de transestérification obtenus avec les esters saturés (98 ± 2, 90,4 ± 7, 57 ± 9 et 44 ± 10 % pour CpLIP2, CtroL4a, CaLA et AflaL0a, respectivement, Figure 51) sont comparables à ceux obtenus avec les esters insaturés (Figure 48), et ce bien que les niveaux d'activité soient très différents. Pour toutes les enzymes, les RT varient peu avec la longueur de la chaine acyle, malgré quelques exceptions observées avec CaLA (sur C8) et AflaL0a (sur C16). Ces résultats confirment que la nature du substrat lipidique comme donneur d'acyle n'a globalement pas d'influence sur le RT, comme montré en § 4.1 de ce chapitre.

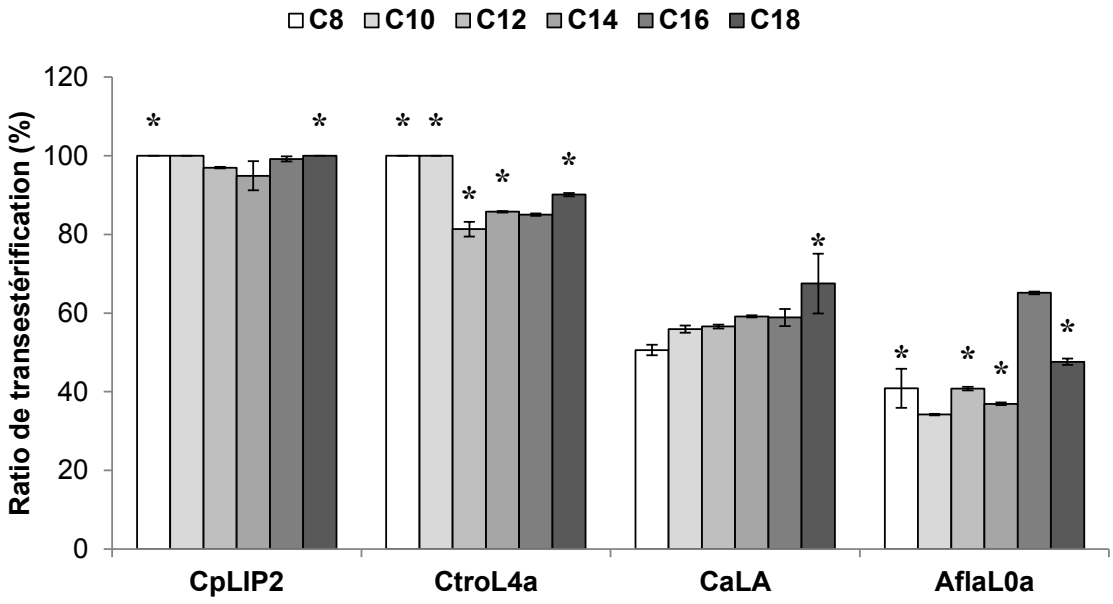


Figure 51 : Ratios de transestérification pour chaque enzyme, obtenus après la transestérification du mélange d'esters saturés

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, pH 6,5 en présence de 2,2 M de méthanol et de 10 mM de mélange d'esters éthyliques d'acides gras saturés C8-C18. Pour chaque enzyme, les substrats pour lesquels la constante de spécificité 1/α est inférieure à 0,4 (niveau d'activité très faible) sont notés avec un astérisque.

Finalement, pour chacune des quatre enzymes testées, les constantes de spécificité pour des esters saturés de longueur de chaine acyle de C8 à C18 sont du même ordre de grandeur avec les esters méthyliques ou éthyliques, et la présence d'un nucléophile accepteur d'acyle autre que l'eau (méthanol) ne modifie pas non plus ces constantes. CpLIP2 et CaLA ont des profils de spécificité monomodaux centrés sur les C12 et C14 et sont assez peu

discriminantes, tandis que AflaL0a et CtroL4a discriminent fortement les C16 des C14/C18. La faible activité relative de CtroL4a vis-à-vis les esters en C12 comparée aux chaines plus longues ou plus courtes en compétition pourrait être particulièrement utile pour des extractions ou transformations sélectives, d'autant plus qu'elle est également caractérisée par une forte activité acyltransférase.

4.3 Conclusion

En conclusion, les quatre enzymes testées présentent des sélectivités différentes vis-à-vis de l'ester donneur d'acyle. Il est difficile de relier ces sélectivités de substrats aux homologies de séquences. C'est particulièrement le cas pour CpLIP2 et CtroL4a qui, malgré 59 % d'homologies, ont des spécificités variables, particulièrement vis-à-vis de la longueur de chaine (respectivement profil monomodal et bimodal des constantes d'affinités pour les C8 à C18 saturés).

Considérant les particularités de chaque lipase (Tableau 12), CpLIP2, plus active sur les esters d'acides gras insaturés, est toujours celle pour laquelle l'activité spécifique est la plus élevée, avec un ratio de transestérification largement majoritaire (proche de 100 %) en présence de 2,2 M de méthanol. CtroL4a a des caractéristiques similaires à CpLIP2, bien qu'avec un RT plus faible, mais présente en plus une sélectivité très marquée pour l'ester en C16 saturé. CaLA est la seule enzyme avec laquelle les activités spécifiques sont plus élevées sur les esters saturés que sur les insaturés (particulièrement sur le C14:0). AflaL0a présente une affinité particulière pour les esters en C16 (saturés mais aussi insaturés) et est celle en présence de laquelle les activités et les ratios de transestérification sont globalement les plus faibles.

Il est d'autre part remarquable qu'avec 2,2 M de méthanol dans le milieu réactionnel, le ratio de transestérification pour chaque enzyme est globalement indépendant de l'ester donneur d'acyle (saturé, insaturé, longueur de chaine carbonée).

Tableau 12 : Récapitulatif des activités spécifiques totales maximales (substrat préférentiel) et minimales pour chaque enzyme, en condition d'hydrolyse seule et avec 2,2 M de méthanol dans le milieu réactionnel

L'activité totale correspond alors à la somme des activités de transfert et d'hydrolyse, notée « transfert + hydrolyse ». Les activités notées en italique sont des estimations déduites des résultats obtenus lors des expériences en mélange (C8 à C18, paragraphe 4.2).

Activités ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)	Ester	CpLIP2		CtroL4a		CaLA		AflaL0a	
Max. hydrolyse	Insaturé	C16:1EE	113,8	C16:1EE	87,3	C18:1BE	0,9	C16:1ME	2,5
Max. transfert + hydrolyse	Insaturé	**C16:1EE**	**225,5**	**C16:1EE/ C18:1BE**	**147,2**	C18:1BE	0,9	**C16:1EE**	**2,8**
Min. hydrolyse	Insaturé	C18:2EE	65,0	C18:2ME	60,6	C18:2ME	0,1	C18:2EE	0,2
Min. transfert + hydrolyse	Insaturé	C18:1EE	75,4	C18:1EE	95,4	C18:2EE	0,9	C18:2EE	0,5
Max. hydrolyse	Saturé	C12ME	9,4	C16EE	*1,0*	C14EE	*5,8*	C16EE	*0,7*
Max. transfert + hydrolyse	Saturé	C12EE	5,2	C16EE	*4,9*	**C14EE**	***7,1***	C16EE	*1,2*
Min. hydrolyse	Saturé	C18ME/ C18EE	*0,8*	C12ME	0,2	C18ME	*1,9*	C8ME	*0,1*
Min. transfert + hydrolyse	Saturé	C18EE	*0,8*	C12EE	0,2	C18EE	*2,8*	C8EE	*0,2*
Ratio de transestérification (%)		**98 ± 2**		90,4 ± 7		57 ± 9		44 ± 10	

Tableau 13 : composition des tampons utilisés pour l'étude de l'effet de pH sur l'activité catalytique d'enzymes

Tampon	Compositions
Citrate pH 4	50 mM de Na_2HPO_4 + 33 mM d'acide citrique
Citrate pH 5	50 mM de Na_2HPO_4 + 24 mM d'acide citrique
Citrate pH 6	50 mM de Na_2HPO_4 + 14,2 mM d'acide citrique
Phosphate pH 6	6 mM de Na_2HPO_4 + 44 mM de NaH_2PO_4
Phosphate pH 7	30,4 mM de Na_2HPO_4 + 19,6 mM de NaH_2PO_4
Phosphate pH 8	47,4 mM de Na_2HPO_4 + 2,6 mM de NaH_2PO_4
Glycine pH 8	50 mM de glycine + 2 mM de NaOH
Glycine pH 9	50 mM de glycine + 8,8 mM de NaOH

5 INFLUENCE DU PH SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE

Nous avons étudié l'effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité catalytique des quatre enzymes en condition d'hydrolyse (sans méthanol) et de transestérification (avec 2,2 M de méthanol). Afin de couvrir une large gamme de pH (de 4 à 9) trois tampons différents ont été utilisés : le tampon citrate (pH entre 4 et 6), le tampon phosphate (pH entre 6 et 8) et le tampon glycine (pH entre 8 et 9) (Tableau 13). Les effets de ces tampons ont été également étudiés en comparant les activités à un pH donné dans deux tampons différents : tampon citrate et tampon phosphate à pH 6, tampon phosphate et tampon glycine à pH 8.

Les résultats sont présentés Figure 52. Les profils obtenus pour les lipases/ acyltransférases CpLIP2 et Ctrol4a sont relativement similaires avec un pH optimal entre 6 et 7 et une diminution importante de l'activité au-dessus de pH 7, surtout avec CpLIP2. CtroL4a est également moins sensible à l'acidité que CpLIP2 avec respectivement une baisse d'activité de 10 % et de 35-50 % entre pH 6 et pH 5. La perte d'activité de transestérification (en présence de 2,2 M de méthanol) semble plus marquée que celle de l'activité d'hydrolyse sans méthanol à pH élevé, notamment en présence de tampon phosphate. On remarque que pour la réaction de transestérification l'optimum est légèrement inférieur à celui pour la réaction d'hydrolyse (6,3 *vs* 6,7 pour CpLIP2 ; 6,4 *vs* 6,7 pour CtroL4a). Ces différences ne semblent pas dues à l'effet du pH, mais plutôt à celui du méthanol dans le milieu réactionnel. En effet, si nous comparons l'activité de transestérification et l'hydrolyse compétitive (en présence de méthanol), nous observons qu'elles évoluent toutes deux dans les mêmes proportions, ce qui confirme que le ratio de transestérification reste stable sur la plage de pH allant de 5 et 8 (Figure 53).

Pour les lipases CaLA et AflaL0a, le pH optimal est nettement plus bas, aux environs de 5, sans différence nette entre la réaction de transestérification et celle d'hydrolyse. L'activité avec CaLA ne varie pas de façon très importante sur la gamme de pH testée. CaLA semble donc particulièrement résistante aux variations de pH. AflaL0a est également active à pH acide mais son activité diminue très fortement au-delà de pH 7.

Pour ce qui est de l'effet de la composition du tampon, à pH 8, nous observons des différences entre les activités catalytiques dans le tampon phosphate et dans le tampon glycine. Ces effets sont variables d'une enzyme à l'autre mais aussi en fonction de la réaction considérée : (1) diminution importante de l'activité dans le tampon glycine pour l'activité

d'hydrolyse avec CpLIP2 et CtroL4a, (2) diminution faible de l'activité de transfert avec CtroL4a, et de toutes les activités avec AflaL0a, (3) augmentation de l'activité de transfert avec CpLIP2 et de toutes les activités avec CaLA.

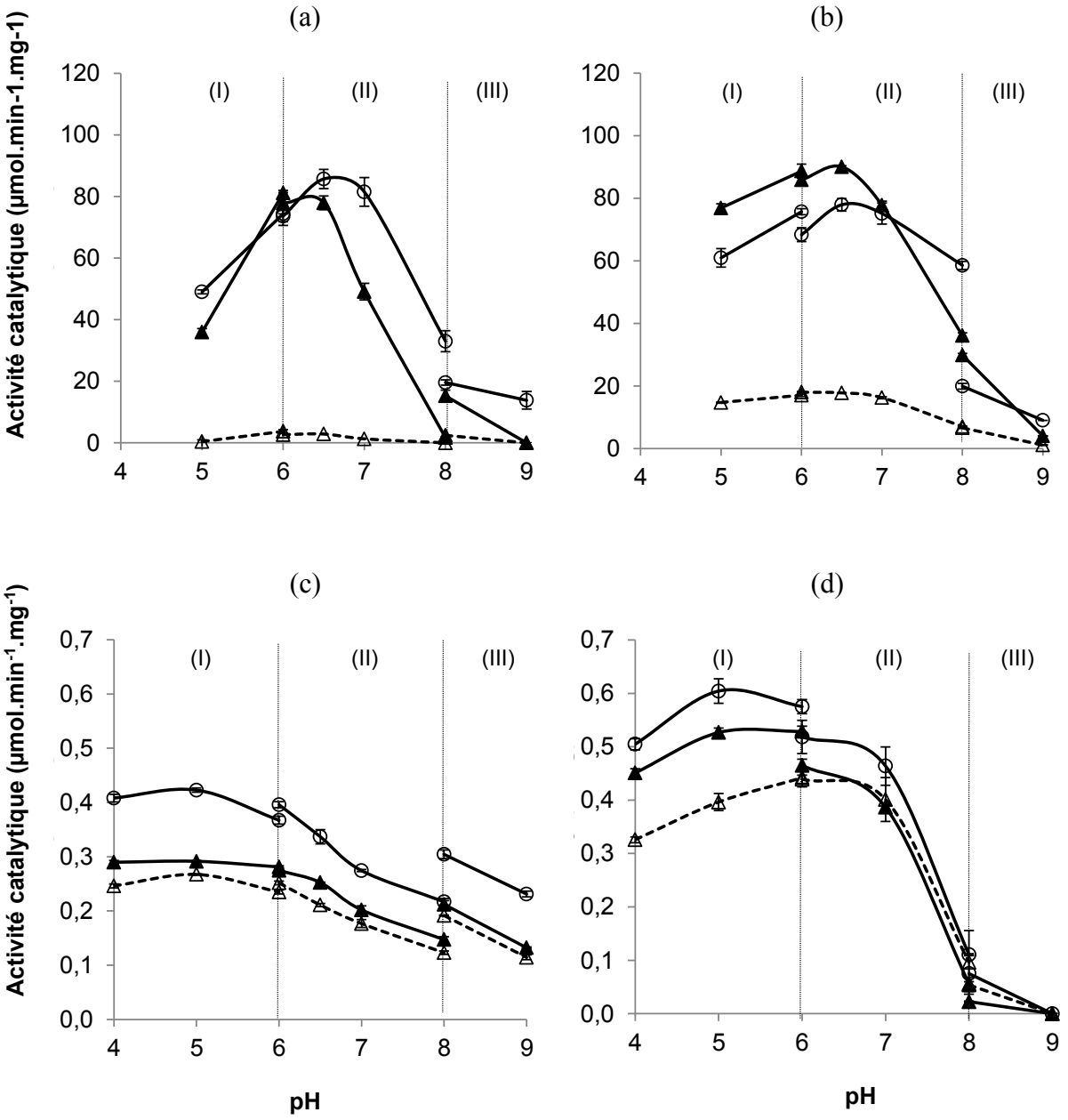


Figure 52 : Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité catalytique des enzymes (CpLIP2 (a); CtroL4a (b); CaLA (c); AflaL0a (d)) en condition sans alcool (○ hydrolyse) et en condition de transestérification avec MeOH (▲ transestérification; △ hydrolyse compétitive)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, aux différentes conditions de pH (tampon citrate (I) ; tampon phosphate (II) ; tampon glycine (III)) en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle (émulsion PVA) et éventuellement de 2,2 M de MeOH. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

Les différences observées à pH 6 entre le tampon citrate et le tampon phosphate sont moins significatives, avec d'une façon générale un effet plutôt positif du tampon citrate, particulièrement avec AflaL0a. La nature du tampon a donc un effet non négligeable (et probablement complexe) sur la vitesse de réaction.

Sur une gamme de pH allant de 4 à 8 (tampon citrate et phosphate), le ratio de transestérification reste stable pour toutes les enzymes (97,5 ± 1,7, 83,4 ± 0,5, 53,6 ± 1 et 50,5 ± 2,5 % respectivement pour CpLIP2, CtroL4a, CaLA et AflaL0a) (Figure 53). Il n'y a donc pas d'effet du pH sur le RT. Cependant, une brusque diminution de RT a pu être observée surtout pour CpLIP2 et AflaL0a en présence de tampon glycine (pH 8 et 9). Cela ne semble pas dû à l'effet du pH, mais à celui de la nature du tampon. En effet, pour le même pH 8 le RT pour CpLIP2 et AflaL0a en présence de tampon phosphate vaut respectivement 99 et 51 % contre 86 et 30 % en présence du tampon glycine.

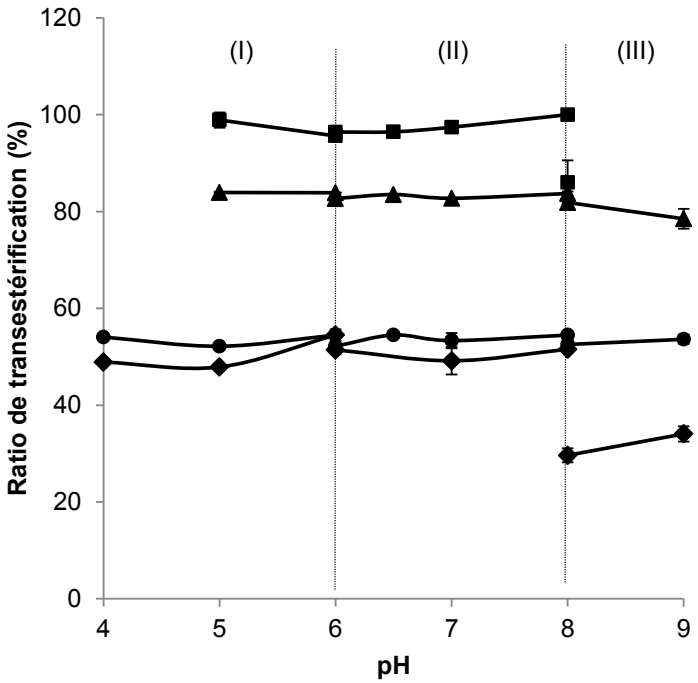


Figure 53 : Influence du pH du milieu réactionnel sur le ratio de transestérification (■ CpLIP2 ; ▲ CtroL4a ; ● CaLA; ◆AflaL0a)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min à 30 °C, aux différentes conditions de pH (tampon citrate (I) ; tampon phosphate (II) ; tampon glycine (III)) en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle et de 2,2 M de MeOH. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

6 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE

L'effet de la température sur l'activité catalytique des enzymes a été évalué pour les réactions d'hydrolyse et de transestérification (deux conditions expérimentales : avec et sans méthanol) en travaillant sur une plage de température allant de 5 à 80 °C.

La Figure 54 montre que les températures optimales apparentes dans les conditions testées sont comprises entre 25 et 50 °C, sauf pour CaLA pour laquelle l'activité augmente de façon continue avec la température sur la gamme testée (maximum 80 °C). Il a en effet déjà été montré que CaLA est particulièrement thermorésistante [Bosley *et al.*, 1997]. Pour AflaL0a, ses activités d'hydrolyse et de transestérification à 60 °C représentent respectivement 42 et 24 % par rapport aux maxima obtenus à 40-50 °C. Cette enzyme est plus résistante aux hautes températures que CpLIP2 et CtroL4a, qui sont presque totalement inactivées (98 % de perte en activité) à la même température (60 °C).

Par ailleurs, contrairement aux résultats obtenus avec AflaL0a, les activités de CpLIP2 et CtroL4a ne diminuent que modérément avec la diminution de la température. Ainsi, à 5 °C CpLIP2 et CtroL4a préservent respectivement 68 et 57 % de leur activité de transestérification optimale (78 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ à 25 °C pour CpLIP2 et 87 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ à 35 °C pour CtroL4a) ainsi que 45 et 36 % de leur activité d'hydrolyse optimale (88 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ à 38 °C pour CpLIP2 et 86 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ à 38 °C pour CtroL4a). Ce résultat montre qu'avec des profils d'activité en fonction de la température similaires, les deux lipases/acyltransférases sont des enzymes actives à froid, propriété intéressante pour des applications industrielles (moindre consommation d'énergie pour le chauffage du milieu réactionnel, moins de réactions parasites, meilleure stabilité des enzymes, substrats et produits).

La Figure 54 montre également que la température de réaction optimale en présence de méthanol (alcoolyse + hydrolyse compétitive) est généralement inférieure à celle de l'hydrolyse seule (moins 5 °C pour CpLIP2 et pour CtroL4a, moins 10 °C pour AflaL0a). L'ensemble des profils d'activités en présence de méthanol sont décalés de -5 °C à -10 °C par rapport à ceux d'activité d'hydrolyse seule (évolutions parallèles). La présence de méthanol dans le milieu a donc une influence sur la thermostabilité des enzymes : à basse température le méthanol permet de garder un niveau d'activité totale plus élevée mais à haute température

son effet apparaît déstabilisant et favorable à une dénaturation de l'enzyme. Ainsi, pour CpLIP2 et CtroL4a, à une température inférieure à leur optimum pour la transestérification (environ 30 °C), nous observons que l'activité de transestérification est supérieure à l'activité d'hydrolyse seule. Au-delà de ces valeurs de température, c'est l'activité d'hydrolyse seule qui est supérieure à celle de transestérification. Par conséquent, une température élevée apparaît plus défavorable aux applications de l'enzyme en transestérification qu'en hydrolyse.

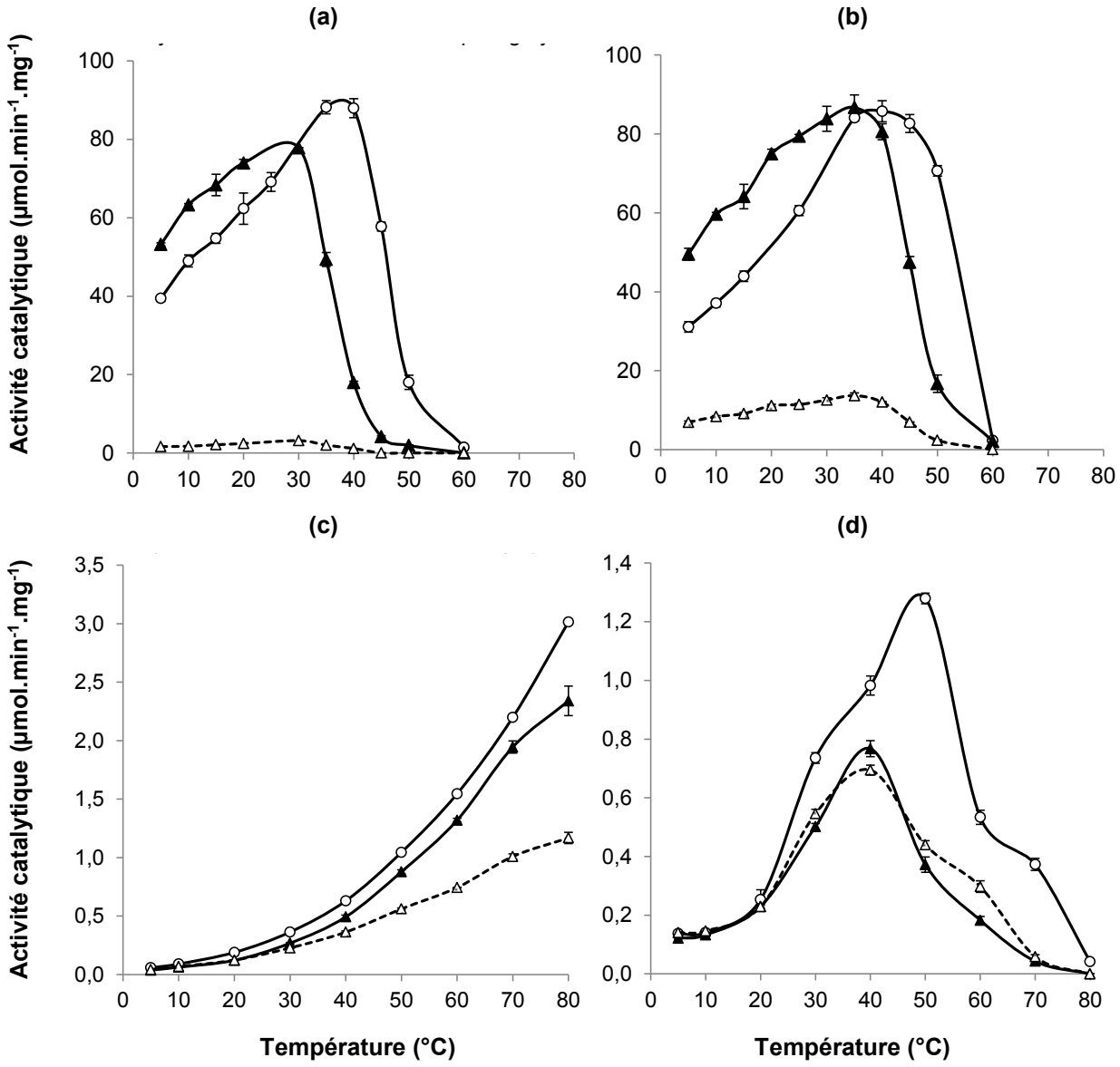


Figure 54 : Influence de la température sur l'activité catalytique des enzymes (CpLIP2 (a); CtroL4a (b); CaLA (c); AflaL0a (d)) en condition sans alcool (○ hydrolyse) et en condition de transestérification avec MeOH (▲ transestérification; △ hydrolyse compétitive)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min aux différentes températures, à pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle et éventuellement de 2,2 M de MeOH. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

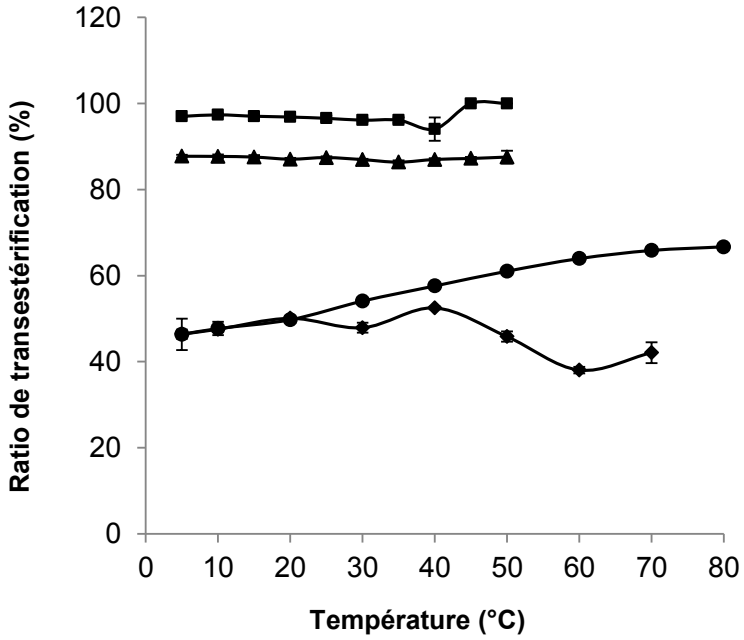


Figure 55 : Influence de la température sur le ratio de transestérification (■ CpLIP2 ; ▲ CtroL4a ; ● CaLA; ◆AflaL0a)

Les réactions ont été effectuées pendant 15 min aux différentes températures, pH 6,5 en présence de 10 mM d'oléate d'éthyle et de 2,2 M de MeOH. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 répétitions ± écart-type.

Tableau 14 : Energie d'activation (Ea) pour les quatre enzymes

Les résultats sont obtenus à partir des courbes : Activité = $A.e^{-Ea/RT}$, (avec A constant, Ea l'énergie d'activation (en $J.mol^{-1}$), R la constante des gaz parfaits qui vaut 8,3144621 $J.mol^{-1}.K^{-1}$ et T la température de la réaction (en K)), construites à partir des données identiques à la Figure 54.

Enzyme	Energie d'activation Ea ($kJ.mol^{-1}$)			
	Hydrolyse	Alcoolyse	Hydrolyse compétitive	Moyenne pour les trois réactions
CpLIP2	17,5	14,5	18,1	16,7 ± 1,8
CtroL4a	22,6	14,7	16,6	18,0 ± 1,6
AflaL0a	50,9	44,6	40,9	45,5 ± 2,4
CaLA	43,0	47,1	40,2	43,5 ± 3,5

La Figure 55 montre que la température n'influence pas significativement le ratio de transestérification pour les lipases/acyltransférases CpLIP2 et CtroL4a, et ce bien que les activités totales varient fortement (respectivement de 2 à 86 et de 2 à 100 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$). D'autre part, avec l'augmentation de la température, une légère augmentation de RT est observée pour CaLA (de 46 à 66 %) alors qu'ils tendent à baisser pour AflaL0a. Ces variations se sont pas dues à l'effet de la température sur l'activité thermodynamique du méthanol puisque celle-ci augmente continument et dans de faibles proportions avec la température dans tous les cas (de 0,083 à 20 °C et 0,085 à 60 °C selon le modèle UNIFAC original).

Au résumé, parmi les quatre enzymes testées :

- AflaL0a a un comportement relativement classique avec un optimum de température entre 40 et 50 °C
- CaLA est remarquablement thermostable et les hautes températures favorisent légèrement la réaction de transestérification
- CpLIP2 et CtroL4a sont encore très actives à basses températures, particulièrement en présence de méthanol (activité à 5 °C représentant 57-68 % de celle à l'optimum apparent de 25-35 °C). Cette caractéristique unique de ces deux biocatalyseurs extrêmement efficaces rend possible leur utilisation pour des réactions de transestérification à froid. En effet, comme montré dans le Tableau 14, la faible énergie d'activation (Ea de 17-18 $kJ.mol^{-1}$) en présence de ces deux lipases/acyltransférases corrobore leur forte activité à basse température alors que l'Ea pour les lipases conventionnelles se situe généralement entre 25 et 65 $kJ.mol^{-1}$.

7 CONCLUSION

Dans l'optique de poursuivre l'étude des propriétés et de la diversité des lipases/acyltransférases, nous avons caractérisé quatre enzymes de la même famille : deux nouvelles lipases CtroL4a et AflaL0a qui partagent respectivement 59 et 31 % d'identité avec la lipase/acyltransferase CpLIP2, et CpLIP2 et CaLA, qui partagent 31 % d'identité et ont été étudiées en tant que références.

Tout d'abord pour l'ensemble des conditions réactionnelles testées, les activités spécifiques (µmol de produit formé par min et par mg de protéines) de CpLIP2 et CtroL4a sont nettement supérieure à celle de CaLA et AflaL0a sur les substrats insaturés (71 à 300 fois plus). Sur les substrats saturés, les activités spécifiques sont du même ordre de grandeur, sauf pour AflaL0a qui reste la moins efficace. CaLA est la seule enzyme testée dont l'activité est plus grande avec les esters saturés qu'avec les insaturés.

Les spécificités de substrat vis-à-vis des esters d'acides gras saturés C8 à C18 sont apparues indépendantes des homologies de séquences. CtroL4a et AflaL0a ont un profil bimodal avec une spécificité marquée pour le C16 (particulièrement CtroL4a) alors que CpLIP2 et CaLA ont un profil monomodal centré sur les C12-C14. .

Concernant la spécificité de réaction, nous avons montré que les quatre enzymes peuvent catalyser la production d'esters en milieu aqueux avec une a_w élevée (>0,99). Le niveau de l'activité de transestérification est cependant bien plus élevé pour CpLIP2 et CtroL4a que pour CaLA et AflaL0a (respectivement 98, 90, 55 et 45 % de l'activité totale en moyenne avec 2,2 M de méthanol), ces dernières se rapprochant du comportement des lipases classiques. Par conséquent, CtroL4a s'avère être une nouvelle lipase/acyltransférase remarquable, proche de CpLIP2 en terme d'homologie de séquence et de fonctionnalités : comportement catalytique favorable à la réaction de transfert en présence d'alcool et d'eau, activité catalytique élevée vis-à-vis les substrats lipidiques, pH optimum d'activité neutre et aptitude à catalyser les réactions à basse température. AflaL0a et CaLA, qui sont assez différentes au niveau de leur séquence (31 % d'identité), semblent se comporter plus comme les lipases conventionnelles avec un même comportement catalytique en présence d'alcool (ratio de transestérification moyen, effet activateur du méthanol), un pH optimum d'activité acide et une thermostabilité élevée (surtout pour CaLA).

D'autre part, nous avons montré que la nature du substrat lipidique donneur d'acyle a un effet très significatif sur l'activité totale (niveaux d'activités spécifiques très différents) mais pas sur le ratio de transestérification. Par contre, la nature et la concentration de l'alcool (accepteur d'acyle) ont un effet important sur l'activité totale et sur le ratio de transestérification. Cet effet peut être corrélé à l'activité thermodynamique de l'alcool, qui dépend à la fois de sa concentration et de son hydrophobicité pour un milieu aqueux de composition et de température données : une activité thermodynamique élevée augmente le ratio de transestérification mais diminue l'activité totale, et ce relativement indépendamment de la classe de l'alcool (primaire ou secondaire). Seule AflaL0a a montré un comportement préférentiel net vis-à-vis des alcools primaires.

Finalement, le pH a un impact considérable sur l'activité catalytique des quatres enzymes testées, mais pas, d'une manière générale, sur le ratio de transestérification. Par contre, la composition de tampon a un effet non négligeable sur ces deux paramètres. De la même manière, la tempétature du milieu réactionnel influence leur activité catalytique. En présence du méthanol, l'effet déstabilisant de la haute température devient plus marqué qu'en absence de l'alcool. Par ailleurs, le ratio de transestérification pour les lipases/acyltransférases n'évolue pas avec le changement de la température, contrairement aux lipases classiques.

En conclusion nous avons montré que les deux enzymes les plus homologues, CpLIP2 et CtroL4a (59 % d'identité), sont également celles dont les spécificités de réaction sont les plus proches, notamment par rapport à l'activité de transestérification que nous recherchions dans cette étude. En plus d'un pourcentage d'identité moyen de 59 %, les parties C-terminales de CpLIP2 et CtroL4a (séquences avant le chapeau putatif) sont remarquablement homologues avec 70 % d'identité (dont 14 résidus identiques autour du motif GYSGG), et leurs parties N-terminales sont également proches particulièrement en terme de longueur avec un peptide terminal composé d'une dizaine de résidus qui n'est pas retrouvé dans CaLA ou AflaL0a (Tableau 9). Ces similitudes pourraient donc être impliquées dans leurs propriétés de réaction. D'autre part, les spécificités de substrat varient considérablement d'une enzyme à l'autre, y compris entre CpLIP2 et CtroL4a. La spécificité de substrat paraît donc plus difficile à prédire, peut-être en relation avec les « chapeaux » qui sont les parties les plus variables entre les quatre enzymes. Cette diversité permettrait de développer de nombreuses alternatives ou solutions pour diverses applications et de générer des variants de CpLIP2 avec différentes propriétés fonctionnelles en vue d'études complémentaires et d'améliorations.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette thèse était de découvrir et caractériser de nouvelles lipases/acyltransférases homologues à CpLIP2, mais également d'approfondir notre connaissance des propriétés catalytiques (et structurales) de cette famille originale d'enzymes. Pour cela, deux approches ont été utilisées dans ce travail : approche classique à travers l'exploration et la caractérisation de lipases/acyltransférases chez des souches microbiennes sauvages et approche d'ingénierie génétique à travers l'exploitation bioinformatique des bases de données.

Cette thèse a débuté par une étude de diversité des lipases/acyltransférases chez des souches sauvages apparentées à *C. parapsilosis* CBS 604, qui sécrète la lipase/acyltransférase CpLIP2. Tout d'abord, la mise en évidence de l'activité catalytique (hydrolyse d'huile de colza) de 17 souches sur milieu sélectif a permis de présélectionner six souches pour lesquelles des conditions de production d'enzymes en fioles d'Erlenmeyer ont ensuite été mises au point. Le contenu protéique (homologie de certaines protéines avec des lipases connues) et le niveau d'activité de transestérification des extraits alors obtenus ont permis de sélectionner les souches *Candida viswanathii* CBS4024 (S4), *Candida maltosa* CBS5611 (S6), *Pseudozyma antarctica* CBS516.83 (S11cl) et *Pichia guilliermondii* CBS2030 (S12).

Après l'amélioration du milieu de culture (ratio sucre/huile), des cultures en fermenteur ont été effectuées pour les quatre souches. L'étude des caractéristiques biochimiques des extraits enzymatiques obtenus a été approfondie dans le but d'identifier une nouvelle lipase/acyltransférase homologue à CpLIP2. L'activité lypolytique la plus élevée et le comportement catalytique en présence de méthanol le plus proche de celui de CpLIP2 ont pu être mise en évidence avec la souche de *C. viswanathii*, qui a finalement été retenue comme souche sécrétant une nouvelle lipase/acyltransférase d'intérêt. Cette dernière pourrait très probablement être la protéine nommée CvisL2 de 58 kDa identifiée dans l'extrait et dont le résultat de séquençage peptidique, en cours, devrait permettre de valider l'identification et servir de base pour la recherche du gène correspondant.

Des études détaillées des paramètres cinétiques de culture de la souche de *C. viswanathii* sur le milieu amélioré glucose (1 $g.L^{-1}$) et huile de colza (4,5 $g.L^{-1}$) ont été effectuées afin de maîtriser la production de lipase. La protéine CvisL2 est produite, comme l'activité lipasique, pendant la phase exponentielle de croissance sur huile et au début de la phase stationnaire. Par ailleurs, même en conditions contrôlées en fermenteur, la culture de cette souche s'est avérée difficilement reproductible, notamment à cause de la présence

d'huile dans le milieu (milieu biphasique), ce qui nécessiterait des essais avec d'autres modes de culture (eg. fed-batch) ou avec un mutant déréprimé et hyperproducteur.

Dans un second temps, nous avons également exploité la richesse de la base de données NCBI afin de découvrir et de caractériser de nouvelles lipases/acyltransférases. Pour cela, un travail de bioinformatique a permis de sélectionner 77 séquences de protéines homologues à CpLIP2 (31 à 62 % d'identité). Une interrogation dans la base de données LED a pu mettre en évidence que 26 de ces séquences étaient classées dans différentes familles homologues de la superfamille « *C. antarctica* lipase A like (abH38) », notamment la famille homologue de *C. antarctica* lipase A like (abH38.01), *C. albicans* lipase like (abH38.02) et *Aspergillus* lipase like (abH38.03). Cette classification a servi de référence lors de la construction des arbres phylogénétiques des séquences dans le but d'établir les relations phylogénétiques des nouvelles séquences étudiées. Ces relations ainsi que des critères additionnels ont permis de retenir 13 séquences dont 5 font l'objet de l'étude détaillée dans ce travail : CtroL4a, CalbL3a, CdubL0e, AflaL0a et CaLA. Ces cinq séquences sont assez diversifiées par rapport à leur position sur l'arbre phylogénétique et aux pourcentages d'identités qu'elles partagent entre elles et avec celle de CpLIP2 (30-59 %).

Les séquences nucléotidiques correspondantes ont été synthétisées et sous-clonées dans le vecteur pPICZαB pour ensuite réaliser la transformation de *P. pastoris* X33. Les différents clones de *P. pastoris* X33 transformés avec les 5 gènes ont quasiment la même croissance sur le même milieu synthétique alors que la production de protéine recombinante est considérablement différente d'un transformant à un autre.

Au niveau de la fonctionnalité, CalbL3a (50 % d'identité avec CpLIP2) et CdubL0e (41 % d'identité avec CpLIP2) n'ont pas d'activité lipolytique détectable dans nos conditions. Cette non-fonctionnalité semble être due aux originalités de séquences (motifs conservés, nombre de cystéines, nombre total d'acides aminés), même si elles sont retrouvées dans un même sous-groupe phylogénétique. Contrairement à CalbL3a et CdubL0e, une activité lypolytique a pu être mise en évidence, comme pour CaLA, pour les deux protéines AflaL0a (35 % d'identité avec CpLIP2) et CtroL4a (59 % d'identité avec CpLIP2) qui étaient respectivement identifiées comme la lipase hypothétique de *A. flavus* et le précurseur de lipase de *C. tropicalis*. Ces deux lipases fonctionnelles partagent avec CaLA et CpLIP2 quatre cystéines et les motifs GYSGG, YAPEL et CAPSY dans leur séquence primaire. La conservation parfaite des motifs caractéristiques pourrait donc être nécessaire pour la fonctionnalité de ces enzymes et faire partie des critères de sélection des séquences pour de

futures productions de lipase. Ces raisonnements pourraient être vérifiés au-delà de cette thèse en travaillant sur des variants obtenus par mutagenèse dirigée de CalbL3a et de CdubL0e. Nos résultats montrent néanmoins que notre système d'expression avec le vecteur pPICZαB dans *P. pastoris* a permis d'obtenir une production suffisamment importante des protéines recombinantes pour la caractérisation fonctionnelle.

Concernant la spécificité de réaction, nous avons montré que les quatre enzymes fonctionnelles peuvent catalyser la production d'esters en milieu aqueux avec une a_w élevée (>0,99). Comme CpLIP2, CtroL4a montre un niveau d'activité de transestérification (en présence de méthanol) bien plus élevé que CaLA et AflaL0a, ces deux dernières se rapprochant du comportement des lipases classiques [Lecointe *et al.*, 1996]. Par conséquent, CtroL4a s'avère être une nouvelle lipase/acyltransférase remarquable, proche de CpLIP2 en terme d'homologie de séquence (59 % d'identité), de relations phylogénétiques et de fonctionnalités : comportement catalytique favorable à la réaction de transfert en présence d'alcool et d'eau, activité catalytique élevée vis-à-vis les substrats lipidiques (surtout les esters insaturés), pH optimum d'activité neutre et aptitude à fonctionner à basse température (5 °C). AflaL0a et CaLA, qui sont assez différentes au niveau de leur séquence (31 % d'identité), semblent se comporter plus comme les lipases conventionnelles avec un même comportement catalytique en présence d'alcool (ratio de transestérification moyen, effet activateur du méthanol), un pH optimum d'activité acide et une thermostabilité élevée (surtout pour CaLA). En plus d'un pourcentage d'identité global de 59 %, les parties C-terminales de CpLIP2 et CtroL4a (séquences avant le chapeau putatif) sont remarquablement homologues avec 70 % d'identité (dont 14 résidus identiques autour du motif GYSGG), et leurs parties N-terminales sont également proches, particulièrement en terme de longueur avec un peptide terminal composé d'une dizaine de résidus qui n'est pas retrouvé dans CaLA ou AflaL0a. Ces similitudes pourraient donc être impliquées dans leurs propriétés de réaction. Par ailleurs, nous pouvons déjà observer que les lipases/ acyltransférases CpLIP2, CaLIP4 (CalbL4b) et CtroL4a constituent, avec d'autres protéines d'identité supérieure à 57 % avec CpLIP2, un sous-groupe phylogénétique distinct du GP-1. Par conséquent, il serait intéressant de caractériser d'autres protéines de ce sous-groupe phylogénétique pour identifier d'autres nouvelles lipases/acyltransférases.

La nature du substrat lipidique donneur d'acyle, le pH et la température du milieu réactionnel ont un effet très significatif sur l'activité totale des enzymes testées (niveaux d'activités spécifiques très différents) mais globalement pas (ou peu d'effet) sur le ratio de

transestérification. Par contre, la nature et la concentration de l'alcool (accepteur d'acyle) ont un effet important sur l'activité totale ainsi que sur le ratio de transestérification. Cet effet peut être corrélé à l'activité thermodynamique de l'alcool, qui dépend à la fois de sa concentration et de son hydrophobicité (en milieu aqueux de composition et de température données) : une activité thermodynamique élevée augmente le ratio de transestérification mais diminue l'activité totale, et ce relativement indépendamment de la classe de l'alcool (primaire ou secondaire). Seule AflaL0a a montré un comportement préférentiel net vis-à-vis des alcools primaires. Cependant, les lipases/acyltransférases sont les plus prometteuses pour des réactions en milieux bi-phasique aqueux où l'on recherche à la fois un niveau d'activité de transfert élevé et une faible activité d'hydrolyse résiduelle, y compris lorsque la transestérification se fait avec les alcools à courtes chaines (méthanol) dont l'activité thermodynamique dans l'eau est relativement faible.

Les spécificités de substrat des enzymes sont apparues indépendante des homologies de séquences, mais varient considérablement d'une enzyme à l'autre, y compris entre CpLIP2 et CtroL4a. Il paraît donc difficile de les prédire en se basant sur les pourcentages d'identités que partagent les enzymes ou sur leurs relations phylogénétiques. Elles pourraient dépendre particulièrement des « chapeaux » qui sont les parties les plus variables entre les quatre enzymes étudiées. Cette diversité permettrait néanmoins de développer de nombreuses alternatives ou solutions pour diverses applications et de générer des variants de CpLIP2 avec différentes propriétés fonctionnelles en vue d'études complémentaires et d'améliorations.

En résumé, l'utilisation des deux approches de recherche de nouvelles enzymes dans ce travail de thèse ont permis d'identifier deux nouvelles lipase/acyltransférases d'intérêt : CvisL2 de *C. viswanathii* et CtroL4a de *C. tropicalis*. La première approche dite « classique » reste longue comparée à l'approche d'ingénierie génétique basée sur la sélection bioinformatique. En effet, cette dernière approche a permis d'avoir directement le gène codant pour CtroL4a et donc de la produire en quantité importante avec un niveau de pureté élevé pour aboutir à une caractérisation fonctionnelle détaillée, alors que la première n'a pas encore abouti à la caractérisation complète de CvisL2. En plus, l'accès rapide à la séquence peut permettre un travail de modélisation structurale et donc l'identification des résidus ou motifs impliqués dans la fonctionnalité de l'enzyme. Finalement, l'accumulation incessante des données bioinformatiques favorise la découverte de nouvelles enzymes de propriétés fonctionnelles variées. L'approche classique reste cependant intéressante dans la mesure où elle peut permettre la découverte de protéines particulièrement originales puisqu'elle n'est pas

basée sur des *à priori* trop ciblés (comme les homologies de séquence). De plus pour une telle approche, les moyens à mettre en œuvre pour obtenir des activités enzymatiques sont moins coûteux et plus facilement « exportable ».

Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse donne un certain nombre de débouchés pour les travaux qui suivront:

Concernant la nouvelle lipase/acyltransférase CvisL2 issue de la souche sauvage de *C. viswanathii*, deux possibilités de poursuite pourraient être considérées. La première consiste à la production optimisée couplée à la purification de protéine pour une caractérisation complète de cette nouvelle lipase/acyltransférase. D'autres modes de culture devraient alors être envisagées pour pallier au problème répétabilités des cultures en milieu huile/eau. Finalement, le clonage du gène codant pour cette enzyme pourrait également faire l'objet de la suite de ce travail dans le but de la surexpression hétérologue et la caractérisation fonctionnelle complète de cette lipase/acyltransférase. Ce second volet pourrait enfin permettre d'améliorer l'enzyme à travers la modélisation structurale et la mutagénèse.

Au niveau du choix des séquences informatiques de protéines pour l'étude passant par l'expression hétérologue et la caractérisation biochimique de nouvelles enzymes, les protéines non-fonctionnelles CalbL3a et CdubL0e pourraient servir pour valider l'hypothèse sur l'origine de la non-fonctionnalité. En effet, des mutants de ces proétines avec seulement quatre cystéines et/ou des motifs conservés identiques à ceux des séquences de référence (CpLIP2 et CaLA) pourraient être générés par mutagenèse dirigée afin de vérifier leur fonctionnalité. Ce travail devrait permettre de confirmer la stratégie de sélection des séquences informatiques développée dans cette thèse.

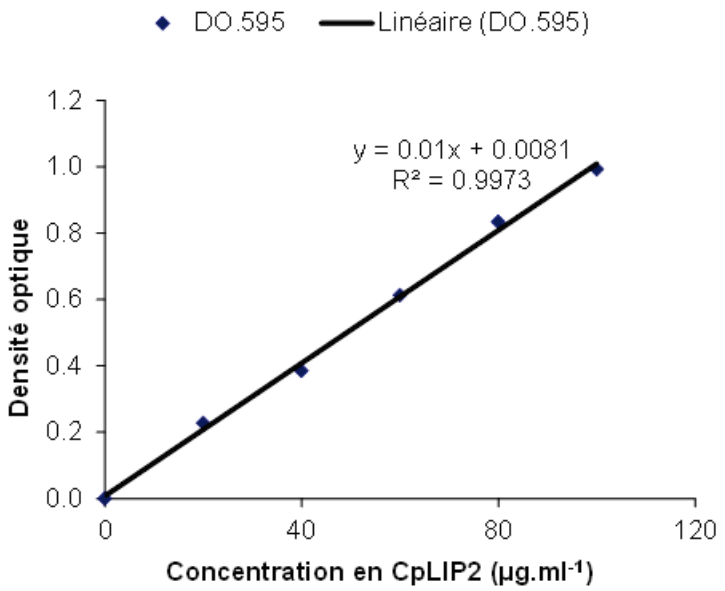
A partir de la nouvelle lipase/acyltransférase CtroL4a (59 % d'identité par rapport à CpLIP2) qui partage la spécificité de réaction mais pas la spécificité de substrats avec CpLIP2, un travail de modélisation structurale pourrait être entrepris pour identifier des motifs impliqués dans les spécificités de réactions et de substrat. En plus, malgré son homologie importante par rapport à CpLIP2, la protéine CtroL4a semble être moins glycosylée et moins s'agréger. Cette propriété fait que cette protéine serait un candidat de

choix pour des essais de cristallisation en vue de la résolution de la structure tridimensionnelle.

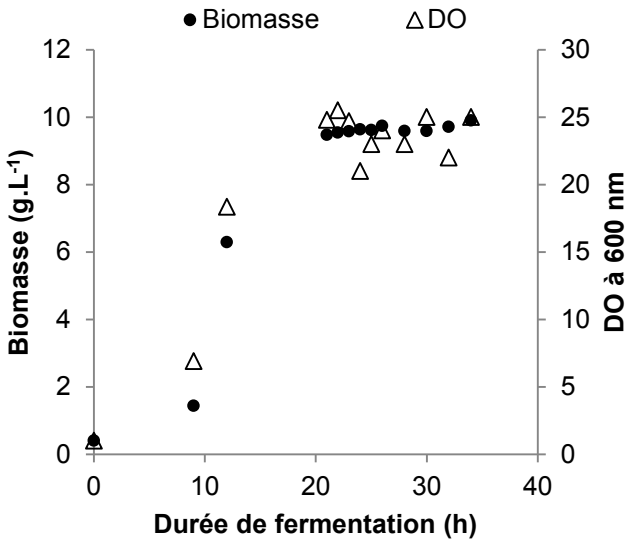
L'étude des sept séquences restantes (sélectionnées à partir de l'étude phylogénétique) pourrait se poursuivre afin de découvrir de nouvelles enzymes aux propriétés intéressantes et d'avoir suffisamment d'informations pour établir des relations séquence/structure/fonction, pour comprendre l'évolution de ces enzymes et développer des stratégies de sélection rationnelle améliorées.

ANNEXES

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de protéines par méthode de Bradford



Annexe 2 : Variation des paramètres exprimant la croissance cellulaire (DO et biomasse) de la souche S4 cultivée dans le milieu YNBH2. Ce résultat donne un rapport Biomasse/DO de 0,39 ± 0,04 g.L^{-1}



Annexe 3: liste des séquences peptidiques identifiées dans des protéines sécrétées par la souche S4

Bande de protéine sur gel SDS-PAGE	Séquences peptidiques identifiées au seuil de 95 % de confiance	Protéines/Lipases dont une ou des séquences peptidiques sont appariées
1	K.EGSYCSYACQSGMSK.T ; K.EGSYCSYACQSGMSK.T + Oxidation (M)	Protéine de *Candida albicans* SC5314 (gi|68489582)
	R.VLHGYTLTK.E	13 phospholipases C de *Neurospora crassa* (gi|71089872 ; gi|71089874 ; gi|71089876 ; gi|71089878 ; gi|71089880 ; gi|71089882 ; gi|71089884 ; gi|71089886 ; gi|71089888 ; gi|71089890 ; gi|71089892 ; gi|71089894 ; gi|71089896)
	R.EKEFWQDK.L ; R.YGTMTPGGSVR.G + Oxidation (M)	Protéine hypothétique AN2945.2 de *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (gi|67524975)
2	K.QSGQAVLNSIR.A	Lipases 4, 5, 8 et 9 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68487709 ; gi|68477995 ; gi|68489021 ; gi|68477981)
	R.SAKSLLEAVQK.T	Synthétase de glucosamine 6-phosphate : COG0449 de *Actinobacillus pleuropneumoniae serovar* 1 str. 4074 (gi|53729274). Il contient les domaines d'amidotransférase et phosphosucre isomérase
	K.DHDGIAIGVAFLK.F	Protéine hypothétique de *Aspergillus fumigatus* Af293 (gi|70997593)
	K.IEISDIRK.K	Protéine hypothétique CaO19.11906 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68483966)
3	K.DGYYCSYACQAGMSK.T + Oxidation (M)	Protéine CaO19.12499 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68467373)
	R.ETYGIQTESKR.H	Protéine : phosphomutase de *Candida albicans* SC5314 (gi|68473105)
	K.IFLVGSEALYR.E	1,3-beta-glucosidase de *Candida albicans* 5476 (gi|1168656) Hydrolase potentielle de glycosyl de *Candida albicans* SC5314 (gi|68466015)
	K.LASVDMR.R + Oxidation (M)	Protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169772831)
	K.ISLSKIPEPTK.S	Protéine de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323250)
	K.FFVSPLR.R	Protéine hypothétique de *Candida glabrata* CBS 138 (gi|50292235) Protéine : phosphomutase de *Candida albicans* SC5314] (gi|68473107)
	K.YMETAIALK.T + Oxidation (M)	Protéine Bud20p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323103)
	R.QMAALPAPEK.K	Protéine hypothétique NCU08984 de *Neurospora crassa* OR74A (gi|85091664)

Annexe 4 : liste des séquences peptidiques identifiées dans des protéines sécrétées par la souche S6

Bande de protéine sur gel SDS-PAGE	Séquences peptidiques identifiées au seuil de 95 % de confiance	Protéines/Lipases dont une ou des séquences peptidiques sont appariées
4	K.STFTVGLQSGR.A ; R.ASNLEYPGTPQSIK.N ; R.NVPNPLTNVFTPVK.V	Lipase CpLIP2 de *Candida parapsilosis* (gi|21953342)
	R.TLQYGDASCSCWK.T	Protéine Tos1p de *Saccharomyces cerevisisae* S288C (gi|6319638)
	R.GFLGDDFEEGK.T	Protéine CaO19.11238 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68485289)
	K.GVSIPSEKDLK.K	Protéine de *Aspergillus fumigatus* Af293 (gi|70984858)
	K.SRIPSLQMPK.K + Oxidation (M)	Protéine NCU01901 de *Neurospora crassa* OR74A (gi|85118886)
	K.IEISDIRK.K	Protéine hypothétique CaO19.11906 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68483966)
	R.LEISNEIR.A	Protéine hypothétique CNBG1080 de *Cryptococcus neoformans* var. neoformans B-3501A (gi|134113755)
	K.GITYSPYSDNGGCK.S	Hydrolase potentielle de glycosyl de *Candida albicans* SC5314 (gi|68483450)
5	R.TIPVGYSAASVDEYR.L	Protéine hypothétique CaO19.11518 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68467891)
	R.TLQYGDASCSCWK.T	Protéine Tos1p de *Saccharomyces cerevisisae* S288C (gi|6319638)
	K.TYLSLIPNPNNK.D	Protéine hypothétique CaO19.12499 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68467373)
	K.EESSWRAEQVAQLVK.F	Protéine hypothétique UM03488.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71018809)
6	R.TIPVGYSAASVDEYR.L	Protéine hypothétique CaO19.11518 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68467891)
	K.GITYSPYSDNGGCK.S	Hydrolase potentielle de glycosyl de *Candida albicans* SC5314 (gi|68483450)
	K.TENAIEWDFKK.L	Glucan 1,3-beta-glucosidase 1 de *Wickerhamomyces anomalus* (Pichia *anomala*) (gi|46395630)
	K.ISLSKIPEPTK.S	Protéine Rsa3p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323250)
	K.STGIDSPR.C	Protéine hypothétique NCU07147 de *Neurospora crassa* OR74A (gi|85084790)
	K.GEAQKADQK.E	Protéine hypothétique CHGG_10635 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116205503)

Annexe 5: liste des séquences peptidiques identifiées dans des protéines sécrétées par la souche S11cnl

Bande de protéine sur gel SDS-PAGE	Séquences peptidiques identifiées au seuil de 95 % de confiance	Protéines/Lipases dont une ou des séquences peptidiques sont appariées
7	R.SMGTFVYLPDGK.L R.FSTTAPYYDGDGGAAAR.F	Protéine hypothétique UM01149.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71005260)
	K.LVLGIPLYGR.G; K.IAASWSYDSAK.R; R.EFISYDTPQNVLLK.C	Protéine hypothétique UM04261.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71020355)
	K.DLGINTIR.V	Protéine de *Candida glabrata* (gi|50287201)
	K.DLGLNTIR.V	Protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169777545)
	K.NHVVVLDQGGR.N	Protéine hypothétique UM03860.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019553)
	K.TTSVTEYHPIGTASMLPR.K + Oxidation (M)	Protéine hypothétique UM04044.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019921)
	R.EVASAGTVLLK.N	Protéine hypothétique UM00446.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71003854)
	R.AWGFLLDR.I	Protéine hypothétique UM05945.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71023725)
	K.VVISQDPSSR.R	Protéine hypothétique CHGG_09088 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116202407)
	K.DLGIQSIR.D	Protéine hypothétique ECU04_0560 de *Encephalitozoon cuniculi* GB-M1 (gi|19074133)
8	R.FAGNFSLSR.L ; K.LNAETIGVYR.V ; K.FSMGLSQGLDAVR.A + Oxidation (M)	Protéine hypothétique UM00791.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71004544)
	K.LVLGIPLYGR.G ; K.IAASWSYDSAK.R; R.EFISYDTPQNVLLK.C	Protéine hypothétique UM04261.1 de *Ustilago maydis* 521] (gi|71020355)
	K.ATDLLPK.L ; K.EALAEAGYKP.-; K.GLGCPPGLMVLAASK.K	Protéine hypothétique UM02621.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71015054)
	R.IGLGQR.R ; K.NHVVVLDQGGR.N	Protéine hypothétique UM03860.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019553)
	K.EAVGPNAPYLTLNR.F	Protéine hypothétique UM00876.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71004714)
	R.NTGFNQGAR.D	Protéine hypothétique UM04064.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019961)
	K.TTSVTEYHPIGTASMLPR.K	Protéine hypothétique UM04044.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019921)
	R.TIALLER.A	Protéine YALI0E12177p de *Yarrowia lipolytica* CLB122 (gi|50552884)
	R.IGIGKR.I	Protéine de *Aspergillus fumigatus* Af293 (gi|70982734) et protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169785184)
	K.LGLGKR.L	Protéine de *Cryptococcus neoformans* var. neoformans JEC21 (gi|58267970)

Annexe 6 : liste des séquences peptidiques identifiées dans des protéines sécrétées par la souche S11cl

Bande de protéine sur gel SDS-PAGE	Séquences peptidiques identifiées au seuil de 95 % de confiance	Protéines/Lipases dont une ou des séquences peptidiques sont appariées
9	R.QNLQGVFSGLR.Y ; R.ANYWAQQAQAR.K	Protéine hypothétique UM02212.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71010210)
	R.YLAGLISAYEIGGK.K	Protéine hypothétique UM01957.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71007165)
	K.EQSPDRSFFGAILAIHR.N	Protéine de *Aspergillus fumigatus* Af293 (gi|71001358) et protéine hypothétique de Aspergillus *oryzae* RIB40 (gi|169783508)
	K.TTSVTEYHPIGTASMLPR.K	Protéine hypothétique UM04044.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019921)
	K.ISLSKIPEPTK.S	Protéine Rsa3p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323250)
	R.FPSLDSTR.T	Protéine hypothétique NCU04732 de *Neurospora crassa* OR74A (gi|85097024)
	K.VVISQDPSSR.R	Protéine hypothétique CHGG_09088 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116202407)
	K.NHVVVLDQGGR.N	Protéine hypothétique UM03860.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019553)
10	K.LVLGIPLYGR.G ; R.EFISYDTPQNVLLK.C; R.GAMFWELSGDATK.S + Oxidation (M)	Protéine hypothétique UM04261.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71020355)
	K.NHVVVLDQGGR.N	Protéine hypothétique UM03860.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71019553)
	K.VVISQDPSSR.R	Protéine hypothetique CHGG_09088 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116202407)
	R.VFGVDGLR.V	Protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169772013)
	.MPKESMLIASGQGGGNFSNIR. V + 2 Oxidation (M)	Protéine de *Encephalitozoon cuniculi* GB-M1 (gi|19074966)
	R.IAFEAAR.A	Endo-1,4 beta-D-xylanase de *Aspergillus sojae* (gi|7328942), xylanase de famille 10 de *Cryptovalsa* sp. BCC 7197 (gi|53636303), Protéine hypothétque UM03411.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71018655), Protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169778405)
	K.ISLSKIPEPTK.S	Protéine Rsa3p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323250)
	R.FPSLDSTR.T	Protéine hypothétique NCU04732 de *Neurospora crassa* OR74A] (gi|85097024)
	R.QANLAAATAPER.L	Protéine hypothétique CHGG_01359 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116181462)
	R.DRLSAFPR.F	Protéine hypothétique UM01027.1 de *Ustilago maydis* 521 (gi|71005016)
	K.LAFNANK.A	Protéine YALI0F13387p de *Yarrowia lipolytica* (gi|50555926)

Annexe 7 : liste des séquences peptidiques identifiées dans des protéines sécrétées par la souche S12

Bande de protéine sur gel SDS-PAGE	Séquences peptidiques identifiées au seuil de 95 % de confiance	Protéines/Lipases dont une ou des séquences peptidiques sont appariées
11	R.QSGKATLNSIR.A	Lipase 10 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68464861)
	K.EGSYCSYACQSGMSK.T + Oxidation (M)	Protéine : SUN family beta-glucosidase de *Candida albicans* SC5314 (gi|68489582)
12	R.TLQYGDASCSCWK.T	Protéine Tos1p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6319638)
	R.QSGKATLNSIR.A	Lipase 10 de *Candida albicans* SC5314 (gi|68464861)
	K.EGSYCSYACQSGMSK.T	Protéine : SUN family beta-glucosidase de *Candida albicans* SC5314 (gi|68489582)
	R.IGAIVANR.Q	Protéine AEL111Cp de *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (gi|45190496)
	R.GITYSPYASDGTCK.S	Protéine AGL354Cp de *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (gi|45200743)
	R.IGSIVANR.Q	Protéines nécessaires à la stabilité de paroi cellulaire ou à la thermorésistance : Pir2p (gi|218459), Pir3p (gi|404129) et HSP150 (gi|256081) de *Saccharomyces cerevisiae*; Cis3p (gi|6322303), Pir1p (gi|6322684); Pir3p (gi|6322685), Hsp150p (gi|116006493) de *Saccharomyces cerevisiae* S288c, Pir2p de *Pichia angusta* (gi|33339732)
	K.VVISQDPSSR.R	Protéine hypothétique CHGG_09088 de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 (gi|116202407)
	K.MDQFDLK.S + Oxidation (M)	Protéine hypothétique de *Schizosaccharomyces pombe* (gi|6473921), sous-unité Bgs3 de synthase de 3-beta-glucan de *Schizosaccharomyces pombe* 972h-] (gi|19115678)
	K.ISVADLVK.F	Protéine hypothétique ECU11_0910 de *Encephalitozoon cuniculi* GB-M1 (gi|19074891)
	R.VFGVDGLR.V	Protéine hypothétique de *Aspergillus oryzae* RIB40 (gi|169772013)
13	R.TLQYGDASCSCWK.T	Protéine Tos1p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6319638)
	R.IGAIVANR.Q	AEL111Cp de *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (gi|45190496)
	K.EGSYCSYACQSGMSK.T + Oxidation (M)	Protéine : SUN family beta-glucosidase de *Candida albicans* SC5314 (gi|68489582)
	R.GITYSPYASDGTCK.S	AGL354Cp de *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (gi|45200743)
	K.ERGLGSMEGR.R	Protéine hypothétique CND04610 de *Cryptococcus neoformans* var. neoformans JEC21 (gi|58266892)
	K.ISLSKIPEPTK.S	Protéine Rsa3p de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (gi|6323250)

Annexe 8 : Liste des séquences de protéine obtenues après la recherche sur BLAST dans la base de données NCBI utilisant la séquence de CpLIP2 comme requête

**Deux séquences identiques mais avec différentes identifications (gi68487419 et gi7769754) se référencent à la même protéine.*

No	Annotation de séquence	Description	Identité (%)	Référence de séquence	Souche	Espèce
1	AcapL0a	Lipase	35	EER38698.1 GI : 240275183	H143	*Ajellomyces capsulatus*
2	AbenHpa	Protéine hypothétique ARB_00790	36	XP_003012908.1 GI : 302501833	CBS 112371	*Arthroderma benhamiae*
3	AbenL0a	Lipase	35	XP_003010553.1 GI : 302497105	CBS 112371	
4	AotaL0a	Lipase	35	XP_002849122.1 GI : 296817571	CBS 113480	*Arthroderma otae*
5	AotaL1a	Lipase 1	35	XP_002848360.1 GI : 296816046	CBS 113480	
6	AadeL0a	Lipase	39	CAI51321.1 GI : 58651819	-	*Arxula adeninivorans*
7	AflaL0a	Lipase putative	35	XP_002373916.1 GI : 238485356	NRRL3357	*Aspergillus flavus*
8	AflaL2a	Précurseur putatif de lipase 2	36	XP_002385299.1 GI : 238508196	NRRL3357	
9	AflaL8a	Précurseur putatif de lipase 8	35	XP_002384809.1 GI : 238507215	NRRL3357	
10	AfumL0a	Lipase	35	XP_746917.1 GI : 70982778	Af293	*Aspergillus fumigatus*
11	AfumL0b	Lipase putative	36	EDP47960.1 GI : 159122840	A1163	
12	AnidHpa	Protéine hypothétique AN1799.2	35	XP_659403.1 GI : 67522685	FGSC A4	*Aspergillus nidulans*
13	AoryHpa	Protéine hypothétique	35	XP_001820488.1 GI : 169772037	RIB40	*Aspergillus oryzae*
14	AoryHpb	Protéine hypothétique	37	XP_001826767.1 GI : 169784612	RIB40	
15	AoryHpc	Protéine hypothétique	35	XP_001823700.1 GI : 169778470	RIB40	
16	AterHpa	Protéine hypothétique	36	XP_001215422.1 GI : 115399588	NIH2624	*Aspergillus terreus*
17	AterPpa	Protéine prédite	35	XP_001214163.1 GI : 115397143	NIH2624	
18	BfucHpa	Protéine hypothétique BC1G_07483	39	XP_001553923.1 GI : 154309177	B05.10	*Botryotinia fuckeliana*
19	CalbHpa	Protéine hypothétique	59	CAA21952.1 GI : 3850152	Ca35A5	*Candida albicans*
20	CalbHpb	Protéine hypothétique CAWG_05629	59	EEQ47072.1 GI : 238883434	WO-1	

21	CalbHpc	Protéine hypothétique CAWG_05663	58	EEQ47104.1 GI : 238883466	WO-1	
22	CalbHpd	Protéine hypothétique CAWG_05624	57	EEQ47068.1 GI : 238883430	WO-1	
23	CalbHpe	Protéine hypothétique CaO19_5172	57	XP_888897.1 GI:77022906	SC5314	
24	CalbHpf	Protéine hypothétique CAWG_00442	50	EEQ42238.1 GI : 238878600	WO-1	
25	CalbHpg	Protéine hypothétique conservée	50	EEQ42267.1 GI : 238878629	WO-1	
26	CalbHph	Protéine hypothétique CAWG_02195	41	EEQ43939.1 GI : 238880301	WO-1	
27	CalbL0a	Lipase	56	AAC99990.1 GI : 4096660	-	
28	CalbL1a	Lipase 1	55	XP_723507.1 GI : 68464859	SC5314	
29	CalbL1b	Lipase 1	55	O94091.2 GI : 38503392	-	
30	CalbL2a	Lipase 2	51	XP_723490.1 GI : 68464825	SC5314	
31	CalbL2b	Précurseur de lipase 2	50	Q9P8W5.1 GI : 38503219	-	
32	CalbL3a	Lipase 3	50	Q9P8W2.2 GI : 38503218	-	
33	CalbL3b	Lipase 3	50	XP_723541.1 GI : 68464927	SC5314	
34	CalbL4a	Lipase 4	61	XP_712265.1 GI : 68487709	SC5314	
35	CalbL4b (ou CaLIP4)*	Lipase 4	61	XP_712408.1 GI : 68487419	SC5314	
36	CalbL5a	Lipase 5	59	Q9P8W0.1 GI : 38503216	-	
37	CalbL5b	Lipase 5	59	XP_717001.1 GI : 68477995	SC5314	
38	CalbL6a	Lipase 6	52	XP_723509.1 GI : 68464863	SC5314	
39	CalbL7a	Lipase 7	41	XP_716454.1	SC5314	
40	CalbL8a	Lipase 8	58	XP_711667.1 GI : 68489021	SC5314	
41	CalbL8b	Lipase 8	58	XP_711685.1 GI : 68488984	SC5314	
42	CalbL9a	Précurseur de lipase 9	57	Q9P4E6.1 GI : 38503212	-	
43	CalbL10a	Lipase 10	50	XP_723508.1 GI: 68464861	SC5314	
44	CdubL0a	Précurseur putatif de lipase	60	XP_002421466.1 GI : 241957493	CD36	*Candida dubliniensis*
45	CdubL0b	Lipase putative	59	XP_002421207.1	CD36	

				GI : 241956974		
46	CdubL0c	Précurseur putatif de lipase	59	XP_002421470.1 GI:241957501	CD36	
47	CdubL0d	Précurseur putatif de lipase	58	XP_002421506.1 GI : 241957573	CD36	
48	CdubL0e	Précurseur putatif de lipase	41	XP_002422397.1 GI : 241959356	CD36	
49	CdubL10a	Précurseur de lipase 10	50	XP_002417547.1 GI : 241949649	CD36	
50	CdubL1a	Précurseur putatif de lipase 1	55	XP_002417546.1 GI:241949647	CD36	
51	CdubL2a	Précurseur de lipase 2	50	XP_002417532.1 GI: 241949619	CD36	
52	CdubL3a	Précurseur de lipase 3	49	XP_002417575.1 GI : 241949705	CD36	
53	CdubL6a	Précurseur putatif de lipase 6	53	XP_002417548.1 GI : 241949651	CD36	
54	CparL1a	Lipase 1	62	CAC86399.1 GI : 21953341	CBS604	*Candida parapsilosis*
55	CtroL1a	Précurseur de lipase 1	53	XP_002549891.1 GI : 255729932	MYA-3404	*Candida tropicalis*
56	CtroL1b	Précurseur de lipase 1	48	XP_002548502.1 GI : 255727152	MYA-3404	
57	CtroL4a	Précurseur de lipase 4	58	XP_002548755.1 GI : 255727659	MYA-3404	
58	CtroPpa	Protéine prédite	47	XP_002549588.1 GI : 255729326	MYA-3404	
59	CtroPpb	Protéine prédite CIMG_06664	38	XP_002546452.1 GI : 255723036	MYA-3404	
60	CimmHpa	Protéine hypothétique CIMG_06664	37	XP_001242768.1 GI : 119183459	RS	*Coccidioides immitis*
61	CposL0a	Protéine	37	XP_003069926.1 GI : 303319853	C735 delta SOWgp	*Coccidioides posadasii*
62	DhanXpa	Protéine	47	XP_458997.2 GI : 294656694	CBS767	*Debaryomyces hansenii*
63	DhanXpb	Protéine	42	XP_456367.2 GI : 294654324	CBS767	
64	DhanXpc	Protéine	41	XP_456344.2 GI : 294654310	CBS 767	
65	LeloHpa	Protéine hypothétique LELG_04890	42	XP_001524077.1 GI : 149236399	NRRL YB-4239	*Lodderomyces elongisporus*
66	LeloL1a	Précurseur de lipase 1	53	XP_001528669.1 GI :149248564	NRRL YB-4239	
67	LeloL1b	Précurseur de lipase 1	42	XP_001523985.1 GI : 149236215	NRRL YB-4239	
68	NfisL0a	Lipase putative	35	XP_001262626.1 GI : 119488165	NRRL 181	*Neosartorya fischeri*
69	PmarL0a	Lipase putative	35	XP_002143885.1 GI : 212527456	ATCC 18224	*Penicillium marneffei*
70	PnodHpa	Protéine hypothétique SNOG_05468	41	XP_001795873.1 GI : 169604905	SN15	*Phaeosphaeria nodorum*
71	PguiHpa	Protéine	49	XP_001482788.1	ATCC	*Pichia*

		hypothétique PGUG_04743		GI : 146413635	6260	*guilliermondii*
72	RopaL0a	Lipase putative	36	YP_002781891.1 GI : 226364109	-	*Rhodococcus opacus*
73	SstiPpa	Protéine prédite	48	XP_001386828.2 GI : 308198082	CBS 6054	*Scheffersomyces stipitis*
74	SsclHpa	Protéine hypothétique SS1G_08644	37	XP_001590903.1 GI : 156049873	-	*Sclerotinia schlerotiorum*
75	TverHpa	Protéine hypothétique TRV_07791	37	XP_003018216.1 GI : 302652744	HKI 0517	*Trichophyton verrucosum*
76	TverL0a	Lipase putative	35	XP_003023382.1 GI : 302663480	HKI 0517	

Annexe 9 : Liste des séquences protéiques faisant l'objet de sélection (no 1 à 13) en vue de leur expression et caractérisation

**Séquences sélectionnées et étudiées dans cette étude*

No	Annotation/Identification	Description	Identité (%)	Nb de cystéines (Séq. signale+ principale)	Code génétique	Séquence signale/Nb d'aa	Espèce
1	AflaL0a_gi 238485356*	Lipase putative	35	0+4	standard	1..20/453aa	*Aspergillus flavus*
2	BfucHpa_gi154 309177	Protéine hypothétique BC1G_07483	39	0+4	standard	1..20/453aa	*Botryotinia fuckeliana*
3	CalbHpe_gi770 22906	Protéine hypothétique CaO19_5172	57	0+4	12 : CUG=Ser	1..14/461	*Canida albicans*
4	CdubL0e_gi241 959356*	Précurseur putatif de lipase	41	1+6	12 : CUG=Ser	1..15/426	*Candida dubliniensis*
5	CposL0a_gi 303319853	Protéine	37	1+5	standard	1..20/455	*Coccidioides posadasii*
6	SstiPpa_gi 308198082	Protéine prédite	48	2+4	12 : CUG=Ser	1..21/82	*Scheffersomyces (Pichia) stipitis*
7	CalbL3a_gi 38503218*	Lipase 3	50	1+5	12 : CUG=Ser	1..16/471	*Candida albicans*

8	CalbL8b_gi 68488984	Lipase 8	58	0+4	12 : CUG=Ser	1..14/460	*Candia albicans*
9	CdubL1a_gi241 949647	Précurseur putatif de lipase 1	55	0+4	12 : CUG=Ser	1..16/468	*Candida dubliniensis*
10	CdubL2a_gi241 949619	Précurseur de lipase 2	50	0+4	12 : CUG=Ser	1..16/466	*Candida dubliniensis*
11	CdubL0a_gi241 957493	Précurseur putatif de lipase	60	0+4	12 : CUG=Ser	1..14/460	*Candida dubliniensis*
12	CtroL4a_gi255 727659*	Précurseur de lipase 4	58	1+4	12 : CUG=Ser	1..16/463	*Candida tropicalis*
13	CaLA_gi 160286179*	Lipase A	31	0+4	12 : CUG=Ser/S	0..0/441	*Candida antarctica*
14	CalbL4b_gi68 487419 (ou CaLIP4)	lipase 4(lipase/acyltran sférase)	61	0+4	12 : CUG=Ser/S	1..14/459	*Candida albicans*
15	CparL2a_gi219 53342 (ou CpLIP2)	Lipase 2 (lipase/acyltransf érase)	100	0+4	12 : CUG=Ser	1..16/465aa	*Candida parapsilosis*

Annexe 10 : Activité thermodynamique de l'eau, de l'alcool et de l'ester dans le milieu réactionnel

Le milieu est composé de 900 µL d'eau (tampon phosphate 50 mM), de 100 µL d'émulsion (PVA) de C18 :1 ME et de 0,03 M ou 0,3 M d'alcool (même expérience de la Figure 44). Les activités thermodynamiques sont estimées à l'aide du modèle UNIFAC-LLE, en tenant compte de la présence de l'alcool, de l'eau et de l'ester dans le système biphasique à 30 °C.

Classe	Alcool	Concentration en alcool (M)	Activité de l'eau	Activité d'alcool	Activité d'ester (C18:1ME)
Primaire	Ethanol	0,03	1,000	0,004	0,953
		0,30	0,990	0,038	0,940
	1-propanol	0,03	1,000	0,011	0,950
		0,30	0,995	0,096	0,924
	2-méthyle-1-propanol	0,03	1,000	0,028	0,945
		0,30	0,995	0,242	0,866
	1-butanol	0,03	1,000	0,011	0,950
		0,30	0,995	0,096	0,924
Secondaire	2-propanol	0,03	1,000	0,011	0,950
		0,30	0,995	0,096	0,920
	2-butanol	0,03	1,000	0,028	0,945
		0,30	0,995	0,242	0,866
	3-pentanol	0,03	1,000	0,075	0,927
		0,30	0,995	0,595	0,633
Tertiaire	2-méthyle-2-propanol	0,03	1,000	0,026	0,946
		0,30	0,995	0,228	0,875
Moyenne ± écart-type			0,997 ± 0,003	0,114 ± 0,153	0,907 ± 0,079

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd Rahman R. N., Shariff F. M., Basri M. and Salleh A. B. (2012). "3D structure elucidation of thermostable L2 lipase from thermophilic *Bacillus sp.* L2." *International Journal of Molecular Sciences* **13**(7): 9207-9217.

Agrawal Y. K., Kaur H. and Menon S. K. (1999). "Poly(styrene-p-hydroxamic acids): synthesis, and ion exchange separation of rare earths." *Reactive & Functional Polymers* **39**(2): 155-164.

Agrawal Y. K. and Roshania R. D. (1980). "Hydroxamic acids in gravimetric analysis." *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* **89**(3): 159-174.

Agrawal Y. K. and Sharma C. R. (2007). "A novel [2] rotaxane hydroxamic acid for the liquid-liquid extraction and determination of vanadium(V)." *Indian Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry* **46**(11): 1772-1777.

Akoh C. C., Lee G. C., Liaw Y. C., Huang T. H. and Shaw J. F. (2004). "GDSL family of serine esterases/lipases." *Progress in Lipid Research* **43**(6): 534-552.

Alexander E. T., Bhat S., Thomas M. J., Weinberg R. B., Cook V. R., Bharadwaj M. S. and Sorci-Thomas M. (2005). "Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity." *Biochemistry* **44**(14): 5409-5419.

Altenburger J. M., Lebeau L., Mioskowski C. and Schirlin D. (1992a). "Synthesis of new glycerolipids linked to hydroxamate derivatives designed for 2-dimensional crystallization of aminopeptidase-M." *Helvetica Chimica Acta* **75**(8): 2538-2544.

Altenburger J. M., Mioskowski C., Dorchymont H., Schirlin D., Schalk C. and Tarnus C. (1992b). "Useful hydroxylamine derivatives for the synthesis of hydroxamic acids." *Tetrahedron Letters* **33**(35): 5055-5058.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**(3): 403-410.

Ballas S. K. and Krasnow S. H. (1980). "Structure of erythrocyte membrane and its transport functions." *Annals of Clinical and Laboratory Science* **10**(3): 209-219.

Banas A., Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M. and Stymne S. (2000). "The involvement of phospholipid : diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production." *Biochemical Society Transactions* **28**: 703-705.

Barbe S., Lafaquiere V., Guieysse D., Monsan P., Remaud-Simeon M. and Andre I. (2009). "Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations." *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **77**(3): 509-523.

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J. and Sayers E. W. (2009). "GenBank." *Nucleic Acids Res.* **37**: D-26-31.

Bonelli F. S. and Jonas A. (1989). "Reaction of lecithin cholesterol acyltransferase with water-soluble substrates." *Journal of Biological Chemistry* **264**(25): 14723-14728.

Bosley J. A., Casey J., Macrae A. R. and MyCock G. (1997). Process for the esterification of carboxylic acids with tertiary alcohols using a lipase from *Candida antarctica*. *United States Patent*. **5658769**.

Bousquet-Dubouch M. P., Graber M., Sousa N., Lamare S. and Legoy M. D. (2001). "Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water." *Biochimica et Biophysica Acta* **1550**(1): 90-99.

Boutur O., Dubreucq E. and Galzy P. (1995). "Factors influencing ester synthesis catalysed in aqueous media by the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra." *Journal of Biotechnology* **42**(1): 23-33.

Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Brenneis R. and Baeck B. (2012). "Esterification of fatty acids using *Candida antarctica* lipase A in water-abundant systems." *Biotechnology Letters* **34**(8): 1459-1463.

Brenneis R., Baeck B. and Kley G. (2004). "Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests." *European Journal of Lipid Science and Technology* **106**(12): 809-814.

Briand D., Dubreucq E. and Galzy P. (1994). "Enzymatic fatty esters synthesis in aqueous medium with lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice." *Biotechnology Letters* **16**(8): 813-818.

Briand D., Dubreucq E. and Galzy P. (1995a). "Factors affecting the acyltransfer activity of the lipase from *Candida parapsilosis* in aqueous media." *Journal of the American Oil Chemists Society* **72**(11): 1367-1373.

Briand D., Dubreucq E. and Galzy P. (1995b). "Functioning and regioselectivity of the lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in aqueous medium. New interpretation of regioselectivity taking acyl migration into account." *European Journal of Biochemistry / FEBS* **228**(1): 169-175.

Briand D., Dubreucq E., Grimaud J. and Galzy P. (1995c). "Substrate-Specificity of the Lipase from *Candida parapsilosis*." *Lipids* **30**(8): 747-754.

Brick D. J., Brumlik M. J., Buckley J. T., Cao J. X., Davies P. C., Misra S., Tranbarger T. J. and Upton C. (1995). "A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize." *FEBS Letters* **377**(3): 475-480.

Brumlik M. J. and Buckley J. T. (1996). "Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*." *Journal of Bacteriology* **178**(7): 2060-2064.

Brumlik M. J., van der Goot F. G., Wong K. R. and Buckley J. T. (1997). "The disulfide bond in the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity." *Journal of Bacteriology* **179**(10): 3116-3121.

Brunel L. (2005). La lipase/acyltransférase de *Candida parapsilosis*: surexpression hétérologue, essais de caractérisation structurale et mise en oeuvre de bioréacteurs à enzyme immobilisée. Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Brunel L., Neugnot V., Landucci L., Boze W. N., Moulin G., Bigey F. and Dubreucq E. (2004). "High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*." *Journal of Biotechnology* **111**(1): 41-50.

Buckley J. T. (1982). "Substrate specificity of bacterial glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase." *Biochemistry* **21**(26): 6699-6703.

Buckley J. T., Halasa L. N. and MacIntyre S. (1982). "Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid: cholesterol acyltransferase." *Journal of Biological Chemistry* **257**(6): 3320-3325.

Carlucci A., Cigliano L., Maresca B., Spagnuolo M. S., Di Salvo G., Calabro R. and Abrescia P. (2012). "LCAT cholesterol esterification is associated with the increase of ApoE/ApoA-I ratio during atherosclerosis progression in rabbit." *Journal of physiology and biochemistry* **68**(4): 541-553.

Chahinian H. and Sarda L. (2009). "Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases." *Protein & Peptide Letters* **16**(10): 1149-1161.

Cheng M., Angkawidjaja C., Koga Y. and Kanaya S. (2012). "Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures." *FEBS Journal* **279**(19): 3727-3737.

Cherukuvada S. L., Seshasayee A. S., Raghunathan K., Anishetty S. and Pennathur G. (2005). "Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: insights from molecular dynamics simulations." *PLOS Computational Biology* **1**(3): 0182-0189.

Chulalaksananukul W., Condoret J. S., Delorme P. and Willemot R. M. (1990). "Kinetic-Study of Esterification by Immobilized Lipase in N-Hexane." *FEBS Letters* **276**(1-2): 181-184.

Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M., Banas A., Lee M., Sandager L., Ronne H. and Stymne H. (2000). "Phospholipid : diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(12): 6487-6492.

de Kreij A., Madrid S. M., Mikkelsen J. D. and Søe J. B. (2004). Method of producing esters. *Patent Cooperation Treaty*. **WO 2004/064987 A2**.

de Kreij A., Madrid S. M., Mikkelsen J. D. and Søe J. B. (2010). Method of using lipid acyltransferase. *United States Patent*. **US7807398 B2**.

de Maria P. D., Carboni-Oerlemans C., Tuin B., Bargeman G., van der Meer A. and van Gemert R. (2005). "Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **37**(1-6): 36-46.

Deive F. J., Rodriguez A., Rebelo L. P. N. and Marrucho I. M. (2012). "Extraction of *Candida antarctica* lipase A from aqueous solutions using imidazolium-based ionic liquids." *Separation and Purification Technology* **97**: 205-210.

Derewenda U., Swenson L., Wei Y. Y., Green R., Kobos P. M., Joerger R., Haas M. J. and Derewenda Z. S. (1994). "Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface - Crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*." *Journal of Lipid Research* **35**(3): 524-534.

Dergunov A. D. (2012). "A mechanistic model of lecithin:cholesterol acyltransferase activity exploits discoidal HDL composition and structure." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **520**(2): 81-87.

Dimitrijevic A., Velickovic D., Bihelovic F., Bezbradica D., Jankov R. and Milosavic N. (2012). "One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite." *Bioresource Technology* **107**: 358-362.

Dubreucq E., Bigey F., Moulin G. and Weiss A. (2003). Lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*. *European Patent Application*. **EP 01401855**.

Duka A., Fotakis P., Georgiadou D., Kateifides A., Tzavlaki K., von Eckardstein L., Stratikos E., Kardassis D. and Zannis V. I. (2013). "ApoA-IV promotes the biogenesis of apoA-IV-containing HDL particles with the participation of ABCA1 and LCAT." *Journal of Lipid Research* **54**(1): 107-115.

Engstrom K., Nyhlen J., Sandstrom A. G. and Backvall J. E. (2010). "Directed evolution of an enantioselective lipase with broad substrate scope for hydrolysis of alpha-substituted esters." *Journal of the American Chemical Society* **132**(20): 7038-7042.

Entressangles B. and Desnuelle P. (1968). "Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system." *Biochimica et Biophysica Acta* **159**(2): 285-295.

Ericsson D. J., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandstrom A. G., Backvall J. E. and Mowbray S. L. (2008). "X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation." *Journal of Molecular Biology* **376**(1): 109-119.

Feller G., Thiry M. and Gerday C. (1991). "Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues." *DNA and Cell Biology* **10**(5): 381-388.

Fischer M. and Pleiss J. (2003). "The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families." *Nucleic Acids Research* **31**(1): 319-321.

Fournand D., Bigey F., Ratomahenina R., Arnaud A. and Galzy P. (1997). "Biocatalyst improvement for the production of short-chain hydroxamic acids." *Enzyme and Microbial Technology* **20**(6): 424-431.

Fournand D., Vaysse L., Dubreucq E., Arnaud A. and Galzy P. (1998). "Monohydroxamic acid biosynthesis." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5**(1–4): 207-211.

Frank P. G. and Marcel Y. L. (2000). "Apolipoprotein A-I: structure-function relationships." *Journal of Lipid Research* **41**(6): 853-872.

Fraser T., Waters A., Chatrattanakunchai S. and Stobart K. (2000). "Does triacylglycerol biosynthesis require diacylglycerol acyltransferase (DAGAT)?" *Biochemical Society Transactions* **28**(6): 698-700.

Fredenslund A., Jones R. L. and Prausnitz J. M. (1975). "Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures." *AIChE Journal* **21**(6): 1086-1099.

Galtier N., Gouy M. and Gautier C. (1996). "SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." *Comput. Appl. Biosci.* **12**(6): 543-548.

Goldberg M., Thomas D. and Legoy M. D. (1990). "The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity." *European Journal of Biochemistry / FEBS* **190**(3): 603-609.

Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. (2010). "SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building." *Molecular Biology and Evolution* **27**(2): 221-224.

Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. and Gascuel O. (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* **59**(3): 307-321.

Guindon S. and Gascuel O. (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Systematic Biology* **52**(5): 696-704.

Halling P. J. (1984). "Effects of water on equilibria catalyzed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems." *Enzyme and Microbial Technology* **6**(11): 513-516.

Halling P. J. (2000). "Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions." *Current Opinion in Chemical Biology* **4**(1): 74-80.

Hanahan D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* **166**(4): 557-580.

Hansen H. K., Rasmussen P., Fredenslund A., Schiller M. and Gmehling J. (1991). "Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution .5. Revision and extension." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **30**(10): 2352-2355.

Hansen H. K., Riverol C. and Acree W. E. (2000). "Solubilities of anthracene, fluoranthene and pyrene in organic solvents: Comparison of calculated values using UNIFAC and modified UNIFAC (Dortmund) models with experimental data and values using the mobile order theory." *Canadian Journal of Chemical Engineering* **78**(6): 1168-1174.

Haron J., Jahangirian H., Silong S., Yusof N. A., Kassim A., Moghaddam R. R., Peyda M., Abdollahi Y., Amin J. and Gharayebi Y. (2012a). "Copper extraction by fatty hydroxamic acids derivatives synthesized based on palm kernel oil." *Journal of Oleo Science* **61**(4): 189-195.

Haron M. J., Jahangirian H., Silong S., Yusof N. A., Kassim A., Rafiee-Moghaddam R., Mahdavi B., Peyda M., Abdollahi Y. and Amin J. (2012b). "Benzyl and methyl fatty hydroxamic acids based on palm kernel oil as chelating agent for liquid-liquid iron(III) extraction." *International Journal of Molecular Sciences* **13**(2): 2148-2159.

Hasan F., Shah A. A. and Hameed A. (2006). "Industrial applications of microbial lipases." *Enzyme and Microbial Technology* **39**(2): 235-251.

Hengstschlager-Ottnad E., Kuchler K. and Schneider W. J. (1995). "Chicken lecithin-cholesterol acyltransferase. Molecular characterization reveals unusual structure and expression pattern." *Journal of Biological Chemistry* **270**(44): 26139-26145.

Henke E., Pleiss J. and Bornscheuer U. T. (2002). "Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: Insights into structure-function relationships." *Angewandte Chemie International Edition* **41**(17): 3211-3213.

Henri V. (1903). Lois générales de l'action des diastases. Paris, Hermann.

Hiller K., Grote A., Scheer M., Munch R. and Jahn D. (2004). "PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions." *Nucleic Acids Research* **32**(Web Server issue): W375-379.

Hilton S., McCubbin W. D., Kay C. M. and Buckley J. T. (1990). "Purification and spectral study of a microbial fatty acyltransferase: activation by limited proteolysis." *Biochemistry* **29**(38): 9072-9078.

Hjorth A., Carriere F., Cudrey C., Woldike H., Boel E., Lawson D. M., Ferrato F., Cambillau C., Dodson G. G., Thim L., *et al.* (1993). "A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase." *Biochemistry* **32**(18): 4702-4707.

Hoegh I., Patkar S., Halkier T. and Hansen M. T. (1995). "2 Lipases from *Candida antarctica* - Cloning and expression in *Aspergillus oryzae*." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **73**: S869-S875.

Holmquist M., Tessier D. C. and Cygler M. (1997). "Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II." *Biochemistry* **36**(48): 15019-15025.

Horton P., Park K. J., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C. J. and Nakai K. (2007). "WoLF PSORT: protein localization predictor." *Nucleic Acids Research* **35**(Web Server issue): W585-587.

Huang X. and Miller W. (1991). "A time-efficient, linear-space local similarity algorithm." *Advances in Applied Mathematics* **12**(3): 337-357.

Husson E., Humeau C., Harscoat C., Framboisier X., Paris C., Dubreucq E., Marc I. and Chevalot I. (2011). "Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine: Reaction performances in organic and aqueous media." *Process Biochemistry* **46**(4): 945-952.

Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.

Isha A., Yusof N. A., Ahmad M., Suhendra D., Yunus W. M. and Zainal Z. (2007). "Optical fibre chemical sensor for trace vanadium(V) determination based on newly synthesized palm based fatty hydroxamic acid immobilized in polyvinyl chloride membrane." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **67**(5): 1398-1402.

Jaeger K. E., Dijkstra B. W. and Reetz M. T. (1999). "Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases." *Annual Review of Microbiology* **53**: 315-351.

Jaeger K. E. and Eggert T. (2002). "Lipases for biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* **13**(4): 390-397.

Jahangirian H., Haron M. J., Silong S. and Yusof N. A. (2011a). "Enzymatic synthesis of phenyl fatty hydroxamic acids from canola and palm oils." *Journal of Oleo Science* **60**(6): 281-286.

Jahangirian H., Haron M. J., Silong S. and Yusof N. A. (2011b). "Preparation of fatty hydroxamic acid from canola oil." *Asian Journal of Chemistry* **23**(8): 3371-3374.

Jahangirian H., Haron M. J., Yusof N. A., Silong S., Kassim A., Rafiee-Moghaddam R., Peyda M. and Gharayebi Y. (2011c). "Enzymatic synthesis of fatty hydroxamic acid derivatives based on palm kernel oil." *Molecules* **16**(8): 6634-6644.

Janssen A. E. M., Sjursnes B. J., Vakurov A. V. and Halling P. J. (1999). "Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters." *Enzyme and Microbial Technology* **24**(8-9): 463-470.

Jonas A. (2000). "Lecithin cholesterol acyltransferase." *Biochimica et Biophysica Acta* **1529**(1-3): 245-256.

Joshi B., Li L., Taffe B. G., Zhu Z., Wahl S., Tian H., Ben-Josef E., Taylor J. D., Porter A. T. and Tang D. G. (1999). "Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer

compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain." *Cancer Research* **59**(17): 4343-4355.

Kasrayan A., Bocola M., Sandstrom A. G., Laven G. and Backvall J. E. (2007). "Prediction of the *Candida antarctica* lipase a protein structure by comparative modeling and site-directed mutagenesis." *Chembiochem* **8**(12): 1409-1415.

Kirk O. and Christensen M. W. (2002). "Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin." *Organic Process Research & Development* **6**(4): 446-451.

Kitabatake K., Piran U., Kamio Y., Doi Y. and Nishida T. (1979). "Purification of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and its specificity towards the acyl acceptor." *Biochimica et Biophysica Acta* **573**(1): 145-154.

Klibanov A., Samokhin G. P., Martinek K. and Berezin I. V. (1977). "A new approach to preparative enzymatic synthesis." *Biotechnology and Bioengineering* **19**(9): 1351-1361.

Kouker G. and Jaeger K. E. (1987). "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(1): 211-213.

Krishna S. H., Persson M. and Bornscheuer U. T. (2002). "Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*." *Tetrahedron-Asymmetry* **13**(24): 2693-2696.

Kurzak B., Kozowski H. and Farkas E. (1992). Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions. Kidlington, Royaume-Uni, Elsevier. **114**.

Laemmli U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lang C., Rastew E., Hermes B., Siegbrecht E., Ahrends R., Banerji S. and Flieger A. (2012). "Zinc metalloproteinase ProA directly activates *Legionella pneumophila* PlaC glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase." *Journal of Biological Chemistry* **287**(28): 23464-23478.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. and Higgins D. G. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.

Lecointe C., Dubreucq E. and Galzy P. (1996). "Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases." *Biotechnology Letters* **18**(8): 869-874.

Lee K. K. and Ellis A. E. (1990). "Glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (Lps) is a major lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas-Salmonicida* - Lps stabilizes and enhances toxicity of the enzyme." *Journal of Bacteriology* **172**(9): 5382-5393.

Lehner R. and Kuksis A. (1993). "Triacylglycerol Synthesis by an Sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes." *Journal of Biological Chemistry* **268**(12): 8781-8786.

Lehner R. and Kuksis A. (1996). "Biosynthesis of triacylglycerols." *Progress in Lipid Research* **35**(2): 169-201.

Lineweaver H. and Burk D. (1934). "The Determination of enzyme dissociation constants." *Journal of the American Chemical Society* **56**(3): 658-666.

Liu M., Krul E. S. and Subbaiah P. V. (1992). "Effect of apoprotein B conformation on the activation of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase. Studies with subfractions of low density lipoproteins." *The Journal of biological chemistry* **267**(8): 5139-5147.

Liu M. and Subbaiah P. V. (1994). "Hydrolysis and transesterification of platelet-activating-factor by lecithin-cholesterol acyltransferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(13): 6035-6039.

Lockhart B. P., Hamedi-Sangsari F., Vignon J., Privat A. and Vila J. (1995). "A N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxic effect of aspartate-based hydroxamate compounds in rat primary neuronal cultures." *Brain Research* **670**(2): 313-316.

Lockhart B. P., Vila J., Hamedi-Sangsari F., Privat A. and Vignon J. (1993). "Neurotoxic effect of the anti-HIV drug D-aspartate beta-hydroxamate for rat primary neuronal cultures: attenuation by N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists." *Brain Research* **630**(1-2): 32-40.

Longhi S. and Cambillau C. (1999). "Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme." *Biochimica et Biophysica Acta* **1441**(2-3): 185-196.

Lopes D. B., Fraga L. P., Fleuri L. F. and Macedo G. A. (2011). "Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?" *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **31**(3): 608-613.

Lung S.-C. and Weselake R. (2006). "Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis." *Lipids* **41**(12): 1073-1088.

Lyon R. C., McComb J. A., Schreurs J. and Goldstein D. B. (1981). "A relationship between alcohol intoxication and the disordering of brain membranes by a series of short-chain alcohols." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **218**(3): 669-675.

MacIntyre S. and Buckley J. T. (1978). "Presence of glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase and phospholipase in culture supernatant of *Aeromonas hydrophila*." *Journal of Bacteriology* **135**(2): 402-407.

MacIntyre S., Trust T. J. and Buckley J. T. (1979). "Distribution of glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase in selected bacterial species." *Journal of Bacteriology* **139**(1): 132-136.

Magnussen T., Rasmussen P. and Fredenslund A. (1981). "UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibria." *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **20**: 331-339.

Malcata F. X., Reyes H. R., Garcia H. S., Hill C. G. and Amundson C. H. (1992). "Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases." *Enzyme and Microbial Technology* **14**(6): 426-446.

Marangoni A. G. (2003). Enzyme kinetics : a modern approach. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience**:** 229 p.

Martinek K., Semenov A. N. and Berezin I. V. (1981). "Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift." *Biochimica et Biophysica Acta* **658**(1): 76-89.

Martinelle M., Holmquist M. and Hult K. (1995). "On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase." *Biochimica et Biophysica Acta* **1258**(3): 272-276.

Martinelle M. and Hult K. (1995). "Kinetics of acyl transfer-reactions in organic media catalyzed by *Candida antarctica* lipase B." *Biochimica et Biophysica Acta* **1251**(2): 191-197.

Martinez C., Degeus P., Lauwereys M., Matthyssens G. and Cambillau C. (1992). "*Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent." *Nature* **356**(6370): 615-618.

Martinez C., Nicolas A., Vantilbeurgh H., Egloff M. P., Cudrey C., Verger R. and Cambillau C. (1994). "Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole." *Biochemistry* **33**(1): 83-89.

Mclean J., Fielding C., Drayna D., Dieplinger H., Baer B., Kohr W., Henzel W. and Lawn R. (1986). "Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(8): 2335-2339.

Mcneill C. P. and Berger R. (1995). "Lipase-catalyzed synthesis of esters by reverse hydrolysis." *OCL-Oléagineux Corps Gras Lipides* **2**(5): 359-363.

Mhaske V., Beldjilali K., Ohlrogge J. and Pollard M. (2005). "Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knockout line for phospholipid: diacylglycerol transacylase gene (At5g13640)." *Plant Physiology and Biochemistry* **43**(4): 413-417.

Michaelis L., Menten M. L., Johnson K. A. and Goody R. S. (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." *Biochemistry* **50**(39): 8264-8269.

Nakagawa E., Amano T., Hirai N. and Iwamura H. (1995). "Non-induced cyclic hydroxamic acids in wheat during juvenile stage of growth." *Phytochemistry* **38**(6): 1349-1354.

Nakhjavani M., Morteza A., Karimi R., Banihashmi Z. and Esteghamati A. (2013). "Diabetes induces gender gap on LCAT levels and activity." *Life sciences* **92**(1): 51-54.

Neugnot V. (2001). Caractérisation du gène codant la lipase/acyltransférase de *Candida parapsilosis* et étude de l'enzyme recombinante modifiée ou non par mutagenèse dirigée. Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Neugnot V., Moulin G., Dubreucq E. and Bigey F. (2002). "The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* - Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes." *European Journal of Biochemistry / FEBS* **269**(6): 1734-1745.

Nini L., Sarda L., Comeau L. C., Boitard E., Dubes J. P. and Chahinian H. (2001). "Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study." *Biochimica et Biophysica Acta* **1534**(1): 34-44.

Nishio T., Chikano T. and Kamimura M. (1988). "Studies on *Pseudomonas fragi* 22.39B Lipase .4. Ester Synthesis by the Lipase from *Pseudomonas fragi* 22.39B." *Agricultural and Biological Chemistry* **52**(5): 1203-1208.

Nozac'h H. (2008). Etude structurale et amélioration d'un biocatalyseur d'intérêt industriel, la lipase/acyltransférase de *Candida parapsilosis*. Doctorat, Montpellier SupAgro.

Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., *et al.* (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." *Protein Engineering* **5**(3): 197-211.

Osorio N. M., Dubreucq E., da Fonseca M. M. R. and Ferreira-Dias S. (2009a). "Lipase/acyltransferase-catalysed interesterification of fat blends containing n-3 polyunsaturated fatty acids." *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**(2): 120-134.

Osorio N. M., Dubreucq E., da Fonseca M. M. R. and Ferreira-Dias S. (2009b). "Operational stability of immobilised lipase/acyltransferase during interesterification of fat blends." *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**(4): 358-367.

Owens J. J. (1974). "The egg yolk reaction produced by several species of bacteria." *Journal of Applied Bacteriology* **37**(1): 137-148.

Paiva A. L., Balcão V. M. and Malcata F. X. (2000). "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases." *Enzyme and Microbial Technology* **27**(3-5): 187-204.

Paterson S. J., Butler K. W., Huang P., Labelle J., Smith I. C. and Schneider H. (1972). "The effects of alcohols on lipid bilayers: a spin label study." *Biochimica et Biophysica Acta* **266**(3): 597-602.

Peelman F., Vinaimont N., Verhee A., Vanloo B., Verschelde J. L., Labeur C., Seguret-Mace S., Duverger N., Hutchinson G., Vandekerckhove J., Tavernier J. and Rosseneu M. (1998). "A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): Identification of the catalytic triad and molecular modeling." *Protein Science* **7**(3): 587-599.

Pfeffer J., Richter S., Nieveler J., Hansen C. E., Rhlid R. B., Schmid R. D. and Rusnak M. (2006). "High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation." *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**(5): 931-938.

Pfeffer J., Rusnak M., Hansen C. E., Rhlid R. B., Schmid R. D. and Maurer S. C. (2007). "Functional expression of lipase A from *Candida antarctica* in *Escherichia coli* - A prerequisite for high-throughput screening and directed evolution." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **45**(1-2): 62-67.

Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C. and Schmid R. D. (2000). "Lipase engineering database - Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**(5): 491-508.

Pownall H. J., Pao Q. and Massey J. B. (1985). "Acyl chain and headgroup specificity of human-plasma lecithin-cholesterol acyltransferase - Separation of matrix and molecular specificities." *Journal of Biological Chemistry* **260**(4): 2146-2152.

Rajakumari S. and Daum G. (2010a). "Janus-faced enzymes yeast Tgl3p and Tgl5p catalyze lipase and acyltransferase reactions." *Molecular Biology of the Cell* **21**(4): 501-510.

Rajakumari S. and Daum G. (2010b). "Multiple functions as lipase, steryl ester hydrolase, phospholipase, and acyltransferase of Tgl4p from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **285**(21): 15769-15776.

Riaublanc A., Ratomahenina R., Galzy P. and Nicolas M. (1993). "Peculiar properties of lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice." *Journal of the American Oil Chemists Society* **70**(5): 497-500.

Robertson D. L., Hilton S. and Buckley J. T. (1992). "Stereochemical and positional specificity of the lipase/acyltransferase produced by *Aeromonas hydrophila*." *Biochemistry* **31**(21): 4974-4980.

Robertson D. L., Hilton S., Wong K. R., Koepke A. and Buckley J. T. (1994). "Influence of active site and tyrosine modification on the secretion and activity of the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase." *Journal of Biological Chemistry* **269**(3): 2146-2150.

Robinson L. A., Wilson D. M., Delaet N. G., Bradley E. K., Dankwardt S. M., Campbell J. A., Martin R. L., Van Wart H. E., Walker K. A. and Sullivan R. W. (2003). "Novel inhibitors of procollagen C-proteinase. Part 2: glutamic acid hydroxamates." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**(14): 2381-2384.

Roshan B., Ganda O. P., DeSilva R., Ganim R. B., Ward E., Haessler S. D., Polisecki E. Y., Asztalos B. F. and Schaefer E. J. (2011). "Homozygous lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency due to a new loss of function mutation and review of the literature." *Journal of Clinical Lipidology* **5**(6): 493-499.

Roustan J. L., Rascon Chu A., Moulin G. and Bigey F. (2005). "A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterisation of the recombinant enzyme." *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**(2): 203-212.

Sakai T. (1963). "Studies on metal complexes of higher fatty hydroxamic acid. VII. Structure and composition of iron. (III). Complexes in crystal and solution." *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **83**: 44-50.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandager L., Dahlqvist A., Banas A., Stahl U., Lenman M., Gustavsson M. and Stymne S. (2000). "An acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT)-related gene is involved in the accumulation of triacylglycerols in Saccharomyces cerevisiae." *Biochemical Society Transactions* **28**: 700-702.

Sandstrom A. G., Engstrom K., Nyhlen J., Kasrayan A. and Backvall J. E. (2009). "Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomaly replicating yeast plasmid dagger." *Protein Engineering Design & Selection* **22**(7): 413-420.

Sandstrom A. G., Wikmark Y., Engstrom K., Nyhlen J. and Backvall J. E. (2012). "Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(1): 78-83.

Santarossa G., Lafranconi P. G., Alquati C., DeGioia L., Alberghina L., Fantucci P. and Lotti M. (2005). "Mutations in the "lid" region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi lipase*." *FEBS Letters* **579**(11): 2383-2386.

Sarda L. and Desnuelle P. (1958). "[Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions]." *Biochimica et Biophysica Acta* **30**(3): 513-521.

Schmid R. D. and Verger R. (1998). "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications." *Angewandte Chemie International Edition* **37**(12): 1609-1633.

Schrag J. D. and Cygler M. (1997). "Lipases and alpha/beta hydrolase fold." *Lipases, Part A: Biotechnology* **284**: 85-107.

Servat F., Montet D., Pina M., Galzy P., Arnaud A., Ledon H., Marcou L. and Graille J. (1990). "Synthesis of fatty hydroxamic acids catalyzed by the lipase of *Mucor miehei*." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **67**(10): 646-649.

Shoji K., Morita H., Ishigaki Y., Rivard C. J., Takayasu M., Nakayama K., Nakayama T., Inoue Y., Ayaki M. and Yoshimura A. (2011). "Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency without mutations in the coding sequence: a case report and literature review." *Clinical Nephrology* **76**(4): 323-329.

Solymar M., Fulop F. and Kanerva L. T. (2002). "*Candida antarctica* lipase A - a powerful catalyst for the resolution of heteroaromatic beta-amino esters." *Tetrahedron-Asymmetry* **13**(21): 2383-2388.

Staszak M. A. and Doecke C. W. (1994). "The use of N,O-Bis(Tert-Butoxycarbonyl)-hydroxylamine in the synthesis of N-hydroxylamines and hydroxamic acids." *Tetrahedron Letters* **35**(33): 6021-6024.

Stobart K., Mancha M., Lenman M., Dahlqvist A. and Stymne S. (1997). "Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (Carthamus tinctorius L) seeds." *Planta* **203**(1): 58-66.

Strom E. H., Sund S., Reier-Nilsen M., Dorje C. and Leren T. P. (2011). "Lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency: renal lesions with early graft recurrence." *Ultrastructural Pathology* **35**(3): 139-145.

Subbaiah P. V. (1982). "Requirement of low density lipoproteins for the lysolecithin acyl transferase activity in human plasma: assay of enzyme activity in abetalipoproteinemic patients." *Metabolism: Clinical and Experimental* **31**(3): 294-298.

Subbaiah P. V., Albers J. J., Chen C. H. and Bagdade J. D. (1980). "Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase." *Journal of Biological Chemistry* **255**(19): 9275-9280.

Subbaiah P. V., Banerji B., Gregg R. E. and Bagdade J. D. (1990). "Molecular species of cholesteryl esters formed in abetalipoproteinemia: effect of apoprotein B-containing lipoproteins." *Journal of Lipid Research* **31**(5): 927-932.

Subbaiah P. V., Chen C. H., Albers J. J. and Bagdade J. D. (1982). "Studies on the cofactor requirement for the acylation and hydrolysis reactions catalyzed by purified lecithin-cholesterol acyltransferase. Effect of low density lipoproteins and apolipoprotein A-i." *Atherosclerosis* **45**(2): 181-190.

Subbaiah P. V., Chen C. H., Bagdade J. D. and Albers J. J. (1985). "Role of low density lipoprotein in the activation of plasma lysolecithin acyltransferase activity. Effect of chemical and enzymatic modifications of the lipoprotein on enzyme activity." *Atherosclerosis* **54**(1): 99-110.

Subbaiah P. V., Sowa J. M. and Davidson M. H. (2004). "Evidence for altered positional specificity of LCAT in vivo: studies with docosahexaenoic acid feeding in humans." *Journal of Lipid Research* **45**(12): 2245-2251.

Sugita T. and Nakase T. (1999). "Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus Candida." *Systematic and Applied Microbiology* **22**(1): 79-86.

Tanaka D., Yoneda S., Yamashiro Y., Sakatoku A., Kayashima T., Yamakawa K. and Nakamura S. (2012). "Characterization of a New Cold-adapted Lipase from *Pseudomonas sp* TK-3." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **168**(2): 327-338.

Tecelão C., Silva J., Dubreucq E., Ribeiro M. H. and Ferreira-Dias S. (2010). "Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65**(1–4): 122-127.

Thornton J., Howard S. P. and Buckley J. T. (1988). "Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with

lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases." *Biochimica et Biophysica Acta* **959**(2): 153-159.

Tischler J. L., Abuaita B., Cuthpert S. C., Fage C., Murphy K., Saxe A., Furr E. B., Hedrick J., Meyers J., Snare D. and Zand A. R. (2008). "Simple inhibitors of histone deacetylase activity that combine features of short-chain fatty acid and hydroxamic acid inhibitors." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **23**(4): 549-555.

Tsafack A., Loyevsky M., Ponka P. and Cabantchik Z. I. (1996). "Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **127**(6): 574-582.

Tweddell R. J., Kermasha S., Combes D. and Marty A. (1998). "Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: A comparative study." *Enzyme and Microbial Technology* **22**(6): 439-445.

Upton C. and Buckley J. T. (1995). "A new family of lipolytic enzymes." *Trends in Biochemical Sciences* **20**(5): 178-179.

Vaysse L., Dubreucq E., Pirat J.-L. and Galzy P. (1997). "Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyltransferase from *Candida parapsilosis*." *Journal of Biotechnology* **53**(1): 41-46.

Vaysse L., Ly A., Moulin G. and Dubreucq E. (2002). "Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous." *Enzyme and Microbial Technology* **31**(5): 648-655.

Verger R. (1997). "'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts." *Trends in Biotechnology* **15**(1): 32-38.

Verger R. and Dehaas G. H. (1976). "Interfacial enzyme-kinetics of lipolysis." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **5**: 77-117.

Verger R., Mieras M. C. and de Haas G. H. (1973). "Action of phospholipase A at interfaces." *Journal of Biological Chemistry* **248**(11): 4023-4034.

Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J. and Haas M. J. (2000). "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**(4-6): 113-148.

Widmann M., Juhl P. B. and Pleiss J. (2010). "Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A." *BMC Genomics* **11**: 123.

Xu T., Liu L., Hou S., Xu J., Yang B., Wang Y. and Liu J. (2012). "Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from Malassezia globosa reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity." *Journal of Structural Biology* **178**(3): 363-369.

Yang C. F., Wang F. H., Lan D. M., Whiteley C., Yang B. and Wang Y. H. (2012). "Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*." *Process Biochemistry* **47**(3): 533-537.

Zaks A. and Klibanov A. M. (1985). "Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(10): 3192-3196.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publication

Neang P. M., Subileau M., Perrier V. and Dubreucq E. (2013)
Peculiar features of four enzymes of the CaLA superfamily in aqueous media: Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis.
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 94(0): 36-46.

Communication orale

Neang P., Subileau M., Perrier V. and Dubreucq E. (2012)
Production and functional characterization of lipases with various substrate specificities and abilities to catalyze acyltransfer reactions in water.
The 6th International Congress on Biocatalysis (BIOCAT'12), Hamburg, Germany.

Communications par affiche

Neang P., Perrier V., Dubreucq E. and Subileau M. (2011)
Study of the diversity of lipases/acyltransferases in yeasts.
BIOTRANS 2011, Giardini-Naxos, Italy.

Neang P., Dubreucq E. and Subileau M. (2011)
Phylogenie structurale et fonctionnelle d'une famille d'enzymes d'interêt industriel : les lipases/acyltransferases de levure. *Journées de l'Ecole doctorale SPSA*, Montpellier, France.

RESUME : Les lipases/acyltransférases présentent des propriétés intermédiaires entre les lipases et les acyltransférases. Capables de se comporter comme des hydrolases, elles catalysent cependant la réaction de transfert d'acyle préférentiellement à l'hydrolyse même en milieu aqueux à forte activité thermodynamique de l'eau en présence de divers nucléophiles. La recherche de nouvelles lipases/acyltransférases, soit sécrétées par des levures sauvages, soit identifiées parmi les séquences protéiques disponibles dans des bases de données, nous a permis d'identifier deux nouvelles enzymes de ce type : CvisL2 de *Candida viswanathii* et CtroL4a de *C. tropicalis*. Cette dernière, produite par expression hétérologue, a été plus particulièrement étudiée en comparaison avec les deux lipases/acyltransférases déjà connues, CpLIP2 de *C. parapsilosis* et CaLIP4 de *C. albicans*, ainsi qu'avec des enzymes plus éloignées (AflaL0a d'*Aspergilus flavus,* isolée dans ce travail, et CaLA de *C. antarctica,* qui présentent respectivement 35 % et 31 % d'identité avec CpLIP2). Le caractère spécifique des acyltransférases semble relié à leur degré d'homologie et à leurs relations phylogénétiques. En effet, les trois lipases/acyltransférases étudiées appartiennent à un sous-groupe phylogénétique distinct composé de diverses autres protéines actuellement non-caractérisées présentant plus de 57 % d'identité avec CpLIP2. En plus de leur activité acyltransférase plus ou moins prononcée, ces nouveaux biocatalyseurs diffèrent par leur spécificité de substrat, leur stabilité en présence de fortes concentrations en alcool ou leur activité à basse température, élargissant ainsi le spectre des applications potentielles des lipases et lipases/acyltransférases.

Mots clefs : Lipase/acyltransférase, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Aspergillus flavus*, transestérification, milieu aqueux, phylogénie, biocatalyse.

SUMMARY : Lipases/acyltransferases have intermediate properties between lipases and acyltransferases. Although being active hydrolases, they catalyze acyltransfer reactions preferentially to hydrolysis even in an aqueous medium with a high thermodynamic activity of water in the presence of various nucleophiles. Searching for new lipases/acyltransferases, either secreted by wild yeast strains or identified in protein sequences databases, allowed us to identify two new enzymes of this type: CvisL2 from *Candida viswanathii* and CtroL4a from *C. tropicalis*. The latter, produced by heterologous expression, has been more particularly studied and compared with the two already known, closely related, lipases/acyltransferases, CpLIP2 from *C. parapsilosis* and CaLIP4 from *C. albicans,* and with two more distantly related lipases (a new lipase AflaL0a from *Aspergillus flavus* and CaLA from *C. antarctica*, with 35 % and 31 % identity with CpLIP2, respectively). The specific catalytic behavior of the acyltransferases seems to be associated with sequence homology and phylogenetic relationships. Indeed, the three lipases/acyltransferases studied are part of a phylogenetic subgroup composed of various proteins (identity with CpLIP2 higher than 57 %), currently not characterized. Besides their acyltransfer activity, these new biocatalysts differ in properties such as their substrate selectivity, their stability in the presence of high alcohol concentration or their activity at low temperature, opening the way to new applications.

Keywords: Lipase/acyltransferase, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Aspergillus flavus*, transesterification, aqueous medium, phylogeny.