

Enzymes à façon

Adaptation des propriétés de la phosphatase alcaline bactérienne au marquage enzymatique

Jean-Claude Boulain, Bruno H. Muller et Frédéric Ducancel

Summary Fashioned enzymes: adjustment of properties of bacterial alkaline phosphatase to the enzymatic labelling

Enzymatic tracers can be easily designed by genetic fusion between a gene encoding a protein or a protein domain and the gene of the *E. coli* alkaline phosphatase. With the aim to enhance the sensitivity of the tests developed using such conjugates, we describe a strategy to improve the bacterial alkaline phosphatase efficacy. In a first step we generated an inactive form of the enzyme and in a second step we looked for revertants. Finally, the introduction of only two mutations provided an enzyme with a catalytic activity increased 40-fold relative to that of the wild-type enzyme while maintaining high thermostability. A large panel of « lab tests » can be quickly designed using the modified enzyme and the gene fusion approach, with a similar sensitivity to which obtained with conventional tracers.

Mots-clés
Key-words

Phosphatase alcaline, mutagenèse, évolution dirigée.
Alkaline phosphatase, mutagenesis, directed evolution.

La biodiversité naturelle offre un choix extraordinairement varié de protéines. L'accès à cette vaste bibliothèque s'est considérablement étendu récemment, grâce à l'amplification de fragments d'ADN issus des nombreux organismes non cultivables en laboratoire, au séquençage de nouveaux génomes ou encore à l'isolement de gènes issus d'organismes extrémophiles. En matière de catalyse enzymatique, de nouvelles enzymes plus stables ou fonctionnant dans des conditions extrêmes de pH, de salinité ou de température, en un mot mieux adaptées à des applications biotechnologiques ou industrielles, ont ainsi été découvertes.

Cette richesse naturelle a cependant ses limites. Une enzyme naturelle est une protéine hautement spécialisée qui remplit un rôle précis au sein d'un réseau biochimique complexe et régulé dans une cellule vivante. En ce sens, certaines de ses propriétés ne sont pas appropriées pour des applications biotechnologiques et constituent des freins à son utilisation par l'Homme. Il en va ainsi de la vitesse de catalyse ou de la spécificité de substrat, ou encore de la quantité produite par un organisme qui peut être limitée par le produit de la réaction. Par ailleurs, aucune enzyme n'est adaptée pour fonctionner dans des milieux organiques.

La mise en œuvre des techniques d'évolution dirigée appliquées aux enzymes a déjà abouti à la modification de diverses propriétés : augmentation de la thermostabilité, modification de la spécificité de substrat, résistance aux solvants organiques ou à des conditions physico-chimiques extrêmes. Paradoxalement, il est plus difficile d'améliorer les propriétés naturelles des enzymes, particulièrement leur efficacité vis-à-vis de leurs substrats habituels. Cette difficulté reflète probablement le manque de méthodes de criblage adaptées à ce type de sélection. Le passage par une enzyme dépourvue de propriétés catalytiques constitue un moyen de résoudre ce problème.

L'évolution moléculaire dirigée des protéines constitue une approche récente et en constant développement, qui permet de s'affranchir de ces limites en générant artificiellement une nouvelle diversité, source de propriétés inédites identifiées à l'aide de cribles spécifiques [1]. Cette approche est décrite dans l'article qui suit (D. Pompon).

L'exemple développé ici concerne la création d'une enzyme stable et possédant une vitesse de catalyse élevée à partir de la phosphatase alcaline bactérienne d'*Escherichia coli*, l'objectif étant la fabrication de traceurs enzymatiques performants. Un traceur enzymatique est constitué d'une molécule d'intérêt couplée de façon covalente à une enzyme dont l'activité catalytique sur un substrat de synthèse conduit à un produit chromogène, fluorescent ou luminescent aisément détectable. Ce type de construction, permettant le suivi de la molécule initiale, est largement utilisé dans le domaine de l'analyse biologique et plus précisément des dosages immuno-enzymatiques. Dans ces dosages, un anticorps couplé à l'enzyme se fixe spécifiquement sur la substance recherchée.

Le couplage entre les partenaires s'effectue par voie chimique à l'aide de réactifs bifonctionnels. Lorsque la molécule d'intérêt est une protéine, il est également possible de créer de tels traceurs en fusionnant un gène codant pour une protéine ou un domaine protéique au gène de la phosphatase alcaline d'*E. coli* [2-3]. La bactérie synthétise alors le traceur enzymatique et l'exporte vers son périplasme¹ où il est aisément récupéré (figure 1). Cette technologie, simple à mettre en œuvre, peut être appliquée dans n'importe quel laboratoire pour réaliser des dosages à façon, mais également pour d'autres utilisations telles que l'étude d'interactions protéine-protéine ou la détection de différents composés. Nous avons cherché à accroître la vitesse de catalyse de l'enzyme bactérienne afin

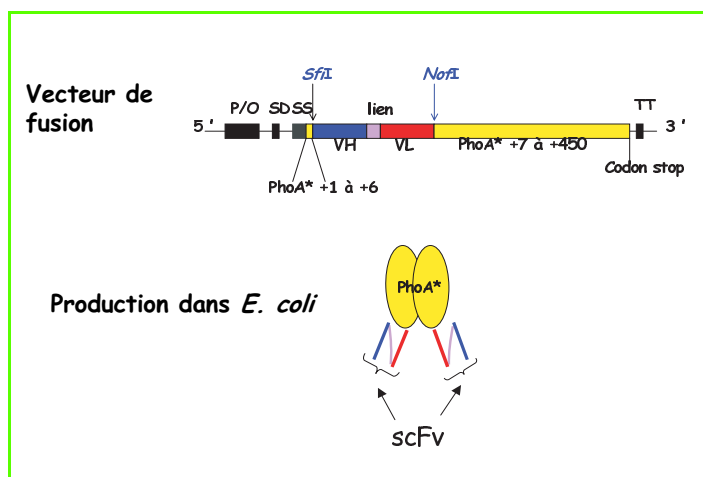


Figure 1 - Système de fusion génétique pour la préparation d'un conjugué immunoenzymatique, ici un fragment d'anticorps recombinant scFv. P/O : promoteur/opérateur ; SD : Shine-Dalgarno ; SS : séquence signal ; VH, VL : domaine variable de chaînes lourde et légère ; TT : terminateur de transcription. La molécule produite dans le périplasma bactérien à partir de l'expression du gène de fusion est représentée en bas de la figure. Deux fragments scFv sont associés à un dimère de phosphatase alcaline.

d'augmenter la sensibilité et la rapidité des tests réalisés avec ces traceurs recombinants.

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est une phospho-monoestérase à large spécificité, le groupement associé au phosphate n'intervenant pas dans la liaison du substrat à l'enzyme. Elle est constituée de deux sous-unités comportant chacune 450 résidus et deux ponts disulfure. Sous sa forme dimérique active, elle est localisée dans le périplasma bactérien. Chaque monomère contient un site actif au sein duquel on trouve deux atomes de zinc et un atome de magnésium (figure 2). Son mécanisme réactionnel comprend deux attaques nucléophiles (figure 3). La première est celle de la sérine 102 sur le substrat phosphaté qui a pour conséquences la libération d'un alcool et la formation d'un complexe covalent enzyme-phosphate. Elle est suivie par l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le complexe phospho-séryl avec formation d'un complexe non-covalent enzyme-phosphate stabilisé par un réseau dense de liaisons hydrogène [4]. Dans les conditions optimales de

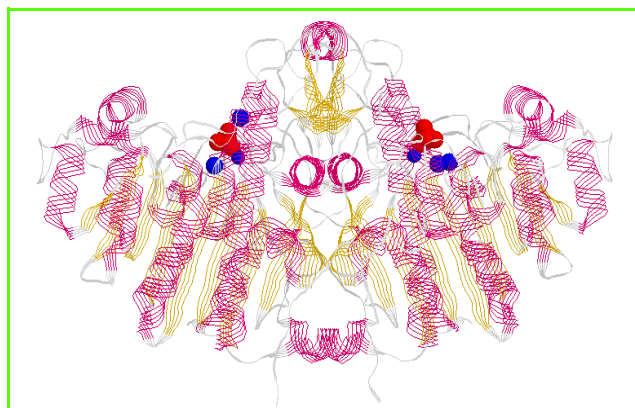


Figure 2 - Structure tridimensionnelle de la phosphatase alcaline d'*E. coli*.

L'extrémité N-terminale de chaque monomère, lieu de la fusion avec une autre protéine, apparaît en bas de la figure. Les deux atomes de zinc et l'atome de magnésium présents dans le site catalytique sont représentés en bleu. Le phosphate est en rouge.

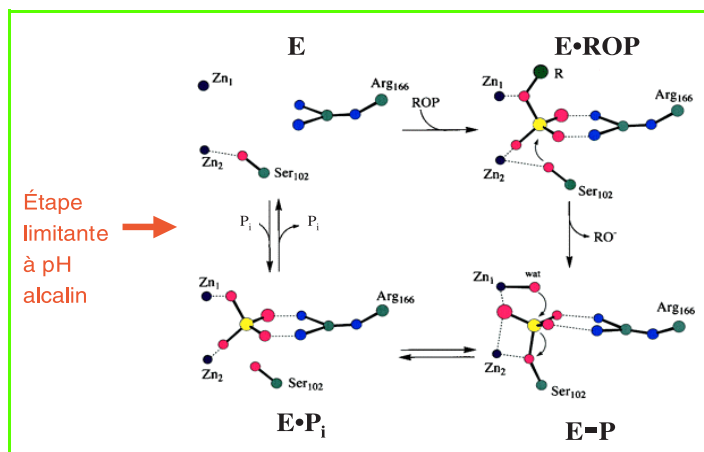


Figure 3 - Schéma du mécanisme catalytique de la phosphatase alcaline. Le groupement phosphate du substrat à hydrolyser est symbolisé par les sphères jaunes (phosphore) et rouges (oxygène).

fonctionnement, c'est la dissociation de ce complexe qui constitue l'étape limitante de la réaction et qui est responsable de la faible vitesse de catalyse de l'enzyme ($k_{cat} = 65 \text{ s}^{-1}$). Sa déstabilisation est donc une condition nécessaire à l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse du substrat.

Les progrès réalisés dans le domaine de la modélisation moléculaire ne permettent pas, encore aujourd'hui, de prévoir l'ensemble des conséquences résultant de l'introduction d'une ou plusieurs mutations dans une séquence protéique. Ces conséquences potentielles sont nombreuses : niveau d'expression du gène dans l'organisme hôte, effet sur le repliement ou la stabilité de la protéine, influence sur les différentes étapes de la réaction enzymatique, etc. Une approche rationnelle était par conséquent difficilement envisageable pour augmenter la vitesse de catalyse de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. La stratégie que nous avons développée comprend une succession d'étapes de mutagenèse dirigée et de mutagenèse aléatoire.

Dans une **première étape**, une enzyme chimère a été construite en introduisant dans la phosphatase alcaline bactérienne quatre résidus présents à des positions correspondantes dans la phosphatase alcaline d'intestin bovin. Ces résidus sont situés dans ou à proximité du site catalytique et constituent les principales différences de séquence entre les deux types d'enzyme dans cette région. Cette simple transposition fournit une enzyme chimère normalement produite par la bactérie mais dépourvue d'activité catalytique.

Dans une **seconde étape**, des mutations provoquant la réversion de cette inactivation ont été recherchées. Pour cela, le gène spécifiant l'enzyme chimère a été soumis à une mutagenèse aléatoire par une réaction d'amplification génique (PCR) conçue de manière à introduire des erreurs dans la séquence du gène [5]. En bref, le principe de cette méthode consiste à effectuer plusieurs cycles d'amplification de l'ADN (cf encadré *Enzymes issus d'extrémophiles et PCR* dans l'article de Y. Gueguen et J. Dietrich).

Chaque cycle comporte plusieurs étapes : i) dénaturation thermique de l'ADN afin de séparer les deux brins ; ii) hybridation d'amorces sur chacun des brins ; iii) extension *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase thermostable dans

des conditions où l'enzyme va introduire des erreurs de façon aléatoire dans la copie qu'il effectue. Les clones bactériens contenant les différents gènes modifiés ont été mis en culture en présence d'un substrat chromogène de l'enzyme. Ceux ayant recouvré une activité enzymatique phosphatase alcaline hydrolysent le substrat et apparaissent bleus. Parmi les nombreux clones obtenus, l'un d'eux exprimait une enzyme active. La mutation responsable de cet effet, identifiée par séquençage du gène, correspond à l'apparition d'un résidu asparagine en position 330 de l'enzyme, située en dehors du site catalytique, à 12 Å du phosphate. Dans un troisième temps, cette mutation a été transférée dans l'enzyme de type sauvage où elle remplace un acide aspartique. La vitesse de catalyse s'en trouve augmentée d'un facteur 3.

Un tel effet positif d'une mutation de réversion réintroduite dans un contexte sauvage a déjà été suggéré dans des études réalisées sur le répresseur du phage Lambda² [6]. L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène était que la mutation provoquant la réversion peut soit simplement corriger l'altération provoquée par la première mutation, soit compenser cette altération en augmentant la fonction de la protéine par un autre moyen. Dans ce dernier cas, on s'attend effectivement à ce que la mutation responsable de la réversion ait un effet positif sur l'activité de la protéine naturelle. Cette stratégie, consistant à générer un mutant inactif puis à rechercher des mutations provoquant la réversion, pourrait constituer une approche générale dans le cadre de l'amélioration des propriétés catalytiques des enzymes.

Enfin, dans une **dernière étape**, la substitution D330N a été associée à une autre mutation préalablement identifiée au niveau du résidu 153. A cette position, un résidu aspartique avait été substitué par un résidu glycine, provoquant une augmentation modérée de la vitesse catalytique [7]. Cette combinaison D153G/D330N a donné naissance à une enzyme dont la vitesse de catalyse est augmentée 40 fois et atteint un niveau comparable à l'enzyme d'origine bovine (tableau I). Elle présente également une stabilité thermique proche de l'enzyme initiale et des propriétés de conservation exceptionnelles [8]. Afin de comprendre les modifications intervenues au niveau du site catalytique et associées à de tels changements de propriétés, des études structurales, réalisées par diffraction aux rayons X, ont été entreprises. Elles révèlent que, dans le mutant sélectionné, le réseau de liaisons hydrogène maintenant le phosphate dans le site catalytique a été fortement réduit en comparaison avec la

situation observée dans l'enzyme initiale. Ce phénomène est probablement responsable de l'importante accélération de la vitesse de libération du phosphate à partir du complexe non covalent enzyme-phosphate, et par conséquent de l'augmentation de la vitesse de catalyse.

L'enzyme ainsi modifiée a été fusionnée avec les fragments scFv (« single chain fragment variable », fragment variable simple chaîne) d'anticorps anti-oestradiol selon le schéma présenté figure 1. La protéine recombinante obtenue a été utilisée pour identifier les résidus de l'anticorps participant à l'interaction avec son antigène. Pour cela, différentes mutations ont été introduites dans la séquence codante du fragment scFv d'anticorps. L'influence de chacune des mutations sur la liaison anticorps-antigène a été évaluée en mesurant l'intensité du signal associé au complexe formé entre les deux partenaires. La grande vitesse de catalyse de l'enzyme permet un marquage direct de l'anticorps étudié et de ses variants, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser un second anticorps de révélation [9].

Dans une seconde construction, l'enzyme modifiée a été fusionnée avec un fragment scFv dérivé d'un anticorps reconnaissant l'acétylaminofluorène (AAF). Cet haptène est couplé avec un oligonucléotide pour préparer des sondes ADN ou ARN capables de s'hybrider à des fragments de gènes d'ARN ribosomiaux. Cette sonde est alors utilisée pour mettre au point un test de typage de souches bactériennes s'appuyant sur la détection de gènes conservés dans toutes les espèces bactériennes étudiées à ce jour et dont le principe est le suivant : l'ADN génomique de différentes souches bactériennes est enzymatiquement digéré et les fragments résultants sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les fragments s'hybrident à la sonde sont alors révélés avec le scFv fusionné à l'enzyme et reconnaissant l'AAF. Les profils obtenus sont spécifiques de chaque espèce bactérienne. Ce test présente la même sensibilité et la même spécificité que celui réalisé avec un conjugué classique préparé par voie chimique et utilisant l'enzyme bovine [3].

Cette évolution artificielle de la phosphatase alcaline bactérienne montre que deux substitutions introduites dans la séquence de la phosphatase bactérienne suffisent à lui conférer un ensemble de propriétés (k_{cat} , K_M , mais aussi pH optimum et activation par le magnésium) similaires à celles de l'enzyme intestinale bovine, pourtant différente par plus de 70 % de sa séquence. Ces observations sont à rapprocher de l'analyse réalisée par F.H. Arnold [10] qui oppose la grande dérive génétique des séquences naturelles au faible nombre de mutations qu'il est nécessaire d'introduire pour conférer à une enzyme tout ou partie des propriétés d'une autre enzyme de la même famille. Par exemple, la conversion d'une subtilisine psychrophile³ (active à basse température) en enzyme thermophile est obtenue en substituant un très petit nombre d'acides aminés, alors que les séquences naturelles présentant ces propriétés respectives sont très éloignées. Ainsi, la flexibilité fonctionnelle des protéines en général, et des enzymes en particulier, apparaît plus importante que ne le laissait penser la simple observation des séquences naturelles. Cette flexibilité fonctionnelle ne se limite d'ailleurs pas à la modulation de propriétés existantes, mais peut également conduire à la création d'enzymes qui fonctionnent dans des milieux organiques ou qui transforment des substances non naturelles. L'industrie chimique future pourrait se trouver considérablement transformée par ces nouvelles approches biotechnologiques.

Tableau I - Comparaison des principales propriétés de la phosphatase alcaline modifiée avec celles de l'enzyme naturelle bactérienne et de l'enzyme bovine intestinale.

[a] Les expériences ont été réalisées dans les conditions optimales d'activité pour chacune des enzymes :

- 1 M Tris pH 8,0 et 25 °C pour l'enzyme bactérienne de type sauvage,
- 1 M diéthanolamine pH 10,0 et 37 °C pour le double mutant,
- Les paramètres cinétiques de la phosphatase alcaline bovine sont issus de Weissig *et al.*, *Biochem J.*, **1993**, 290, p. 503.

Enzyme	K_{cat} (s ⁻¹) [a]	K_m (μM) [a]	K_{cat}/K_m (x10 ⁶) (M ⁻¹ .s ⁻¹)
Type sauvage <i>E. coli</i>	65 +/- 1	23 +/- 1	2,80
D153G/D330N <i>E. coli</i>	3202 +/- 75	567 +/- 7	5,65
Intestinale bovine	3435 +/- 84	660 +/- 23	5,20

Notes

¹périplasme : compartiment cellulaire des bactéries à Gram négatif localisé entre la membrane interne et la membrane externe.

²répresseur du phage lambda : protéine qui inhibe la synthèse d'une particule de phage lambda.

³subtilisine psychrophile : enzyme isolée d'un organisme psychrophile (organisme dont la température optimale de croissance est d'environ 0 °C).

Remarque : mésophile environ 37 °C, thermophile > 60 °C, hyperthermophile > 80 °C.

Références

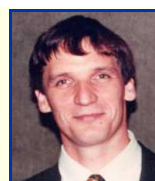
- [1] Arnold F.H., *Nature*, **2001**, 409, p. 253.
- [2] Gillet D. *et al.*, *Protein Eng.*, **1992**, 5, p. 273.
- [3] Muller B.H. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **1999**, 227, p. 177.
- [4] Kim E.E., Wyckoff H.W., *J. Mol. Biol.*, **1991**, 218, p. 449.
- [5] Cadwell R.C., Joyce G.F., *Methods Appl.*, **1994**, 3, p. 136.
- [6] Hecht M.H., Sauer R.T., *J. Mol. Biol.*, **1985**, 186, p. 53.
- [7] Dealwis C.G. *et al.*, *Protein Eng.*, **1995**, 8, p. 865.
- [8] Muller B.H. *et al.*, *ChemBioChem*, **2001**, 2, p. 517.
- [9] Bettsworth F. *et al.*, *J. Mol. Recognit.*, **2001**, 14, p. 99.
- [10] Arnold F.H. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2001**, 26, p. 100.



J.-C. Boulain

Jean-Claude Boulain

est chef de Laboratoire au Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines (DIEP) du CEA de Saclay*.



F. Ducancel

Bruno H. Muller

est cadre de recherche au sein de l'unité mixte CEA/BioMérieux.



B.H. Muller

Frédéric Ducancel

est responsable de l'unité mixte CEA/BioMérieux.

* DIEP, CEA Saclay, bâtiment 152, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Tél. : 01 69 08 71 34. Fax : 01 69 08 90 71.

E-mail : jean-claude.boulain@cea.fr

Information aux annonceurs

Rejoignez notre **CLUB PARTENAIRES** dès **Janvier 2003**

Faites apparaître votre **LOGO**, vos **COORDONNÉES**
et vos **COMPÉTENCES**

pendant **6 mois** consécutifs pour **530 €**



Z.A. de Courtabœuf
17, avenue du Hoggar
BP 112
91944 LES ULIS Cedex A
Tél. : 01.69.18.75.75
Fax : 01.69.86.07.65
www.edpsciences.org

Compétences : Éditeur scientifique international
(astronomie, chimie, électricité & électronique,
sciences de la vie, mathématiques, physique,
radioprotection)

Contact publicitaire : Céline HOARAU
hoarau@edpsciences.org

Pour toute adhésion
avant **novembre 2002**,
soyez **en plus** présent sur
le site **WEB** de la **SFC**
pendant un mois
www.sfc.fr