Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE NOUVELLES ENZYMES LIPOLYTIQUES THERMOSTABLES PROVENANT D'UNE BANQUE MÉTAGÉNOMIQUE

Par
Amélie Côté

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Vincent MARTIN, Ph.D. Centre for structural and functional genomics Université Concordia
Examinateur interne	Réjean BEAUDET, Ph.D. INRS – Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	François SHARECK, Ph.D. INRS – Institut Armand-Frappier

© Droits réservés d'Amélie Côté, 2010

RÉSUMÉ

L'intérêt des lipases microbiennes pour des applications en biotechnologie a pris un essor fulgurant dans les dernières années. Par conséquent, l'industrie nécessite de nouvelles enzymes qui répondent aux critères d'utilisation, notamment au niveau de la thermostabilité et de la capacité à catalyser des réactions en conditions alcalines. En combinant la métagénomique et l'enrichissement en bioréacteur dans les conditions recherchées, deux nouvelles enzymes lipolytiques ont été identifiées. Ultérieurement au séquençage des cosmides positifs lipIAF1-1 et lipIAF1-6, les protéines encodées par les gènes identifiés ont été comparées avec celles des bases de données. Leur caractère unique a été confirmé par l'homologie de séquences, où le pourcentage d'identité variait entre 21 et 46 % avec différentes protéines conservées et enzymes lipolytiques. Par la suite, les hôtes *E. coli* et *S. lividans* ont été utilisés pour l'expression des gènes d'intérêt. La sécrétion des protéines hétérologues était faible pour l'enzyme LipIAF1-1 alors que l'enzyme LipIAF1-6 s'est avérée bien exprimée chez les deux souches bactériennes. Cette dernière a donc été purifiée et caractérisée. La lipase LipIAF1-6 hydrolysait une large gamme de substrats lipidiques synthétiques de courtes et de longues chaînes carbonées (*p*-NP C_4 à *p*-NP C_{18}). L'activité était maximale à des pH entre 8 et 9 à une température de 60°C. Également, la totalité de son activité était conservée après 30 minutes d'incubation à 70°C. Sa stabilité a également été constatée en présence de concentrations allant jusqu'à 30 % de différents solvants organiques. De plus, la lipase LipIAF1-6 n'était que faiblement inhibée par les composés $CoCl_2$ (14 %), $HgCl_2$ (12 %) et DTT (15 %) en concentration de 10 mM. L'activité était fortement diminuée en présence de 1 et 10 mM de PMSF, qui a réduit l'activité de 39 % et 71 %, respectivement. L'enzyme était également stable en présence de plusieurs agents tensioactifs et oxydants utilisés pour l'industrie des détergents. Enfin, l'immobilisation de la lipase sur deux matrices à base de silice a donné de bons résultats, tout en conservant l'activité catalytique. Ces résultats attestent de l'efficacité de la méthologie et la nouvelle lipase présente des propriétés biochimiques attrayantes pour diverses applications industrielles.

Étudiante — Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je désire d'abord remercier mon directeur de recherche, le Pr. François Shareck, avec qui j'ai eu la chance de faire un stage à l'été 2004 lors duquel j'ai acquis toutes mes connaissances actuelles et l'expérience en biologie moléculaire et en protéomique. Grâce à la confiance que le Pr. Shareck m'a accordée, j'ai pu poursuivre des travaux dans son laboratoire de 2004 à 2007, années lors desquelles le Pr. Shareck m'a également encouragée et soutenue pour la publication d'un article scientifique. Merci.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire que j'ai côtoyée lors de ces années, en particulier la technicienne Liette Biron qui m'a appris les différentes techniques utilisées. Merci également aux autres membres du laboratoire : Julie Séguin, François-Xavier Lussier, Olivier Champbenoit, Catherine Meilleur, Guillaume Brault et Raymonde Jetté qui ont su m'aider dans l'avancement de mes travaux par leur écoute et précieux conseils.

Parmi les professeurs, je désire remercier le Pr. Claude Dupont pour son aide et le prêt de matériel pour une bonne partie des expérimentations lors du volet protéomique ainsi que les professeurs François Lépine et Richard Villemur pour leurs conseils en biochimie et génomique, respectivement.

Je tiens également à remercier mes parents, Danielle et Jean ainsi que mes amis et le reste de ma famille qui m'ont soutenue tout au long de la poursuite de mes études universitaires et post-universitaires.

Finalement, merci à la Fondation Armand-Frappier qui m'a offert un soutien financier lors de ces deux années.

Amélie Côté

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ I

REMERCIEMENTS II

LISTE DES TABLEAUX VI

LISTE DES FIGURES VIII

LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS XI

1. INTRODUCTION 1

2. REVUE DE LITTÉRATURE 3

2.1 LES BIOTECHNOLOGIES 3
2.2 L'APPROCHE MÉTAGÉNOMIQUE 7
2.2.1 Les micro-organismes non cultivables 7
2.2.2 Extraire et analyser l'information génétique 10
2.2.3 Enrichissement couplé à la métagénomique 15
2.2.4 Limites de l'approche 17
2.3 LES ENZYMES LIPOLYTIQUES 19
2.3.1 Généralités 19
2.3.2 Estérases versus lipases 22
2.3.3 Motifs conservés 24
2.3.4 Classification des lipases 27
2.3.5 Effet de différents composés sur l'activité et la stabilité 32
2.4 INTÉRÊT INDUSTRIEL DES LIPASES 36
2.4.1 Les domaines d'applications 36
2.4.2 L'immobilisation des lipases 40
2.4.3 Les extrémophiles 46
2.5 EXPRESSION DE PROTÉINES HÉTÉROLOGUES 49
2.5.1 Clonage chez l'hôte *Escherichia coli* 49
2.5.2 Clonage chez l'hôte *Streptomyces lividans* 50
2.6 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE 51

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES 52

3.1 VECTEURS D'EXPRESSION ET SOUCHES BACTÉRIENNES 52
3.1.1 Vecteurs et souches de *Escherichia coli* 52
3.1.2 Vecteurs et souches de *Streptomyces lividans* 52
3.2 MISE EN CULTURE 54
3.2.1 Milieux nutritifs pour la croissance de *E. coli* 54
3.2.2 Milieux nutritifs pour la croissance de *S. lividans* 54
3.2.2.1 Culture en milieu solide 54
3.2.2.2 Culture en milieu liquide 55
3.3 TECHNIQUES DE CLONAGE ET DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 57
3.3.1 Synthèse d'oligonucléotides 57
3.3.2 Amplification des gènes d'intérêt 58
3.3.3 Électrophorèse en gel d'agarose 58
3.3.4 Extraction d'un fragment d'ADN d'un gel d'agarose 59
3.3.5 Digestion de l'ADN 59
3.3.6 Techniques de clonage chez l'hôte *Escherichia coli* 60
3.3.6.1 Ligation et transformation 60
3.3.6.2 Expression des protéines d'intérêt 61
3.3.6.3 Isolement des cosmides/plasmides transformés chez *E. coli* 61

3.3.7 Techniques de clonage chez l'hôte *S. lividans* ... 61
3.3.7.1 Ligation et transformation ... 61
3.3.7.2 Expression des protéines d'intérêt ... 62
3.3.7.3 Isolement des plasmides transformés chez *S. lividans* ... 62
3.4 TECHNIQUES DE PROTÉOMIQUE ... 65
3.4.1 Dosage de protéines ... 65
3.4.2 Concentration des protéines ... 65
3.4.3 Préparation des échantillons ... 65
3.4.4 Gels de polyacrylamide et migration des protéines ... 66
3.4.5 Techniques de coloration des protéines ... 66
3.4.5.1 Bleu de Coomassie ... 66
3.4.5.2 Nitrate d'argent ... 66
3.4.6 Analyse en spectrométrie de masse ... 67
3.5 DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE ... 67
3.5.1 Criblage sur Pétri ... 67
3.5.2 Zymogramme sur SDS-PAGE ... 68
3.6 PURIFICATION DE PROTÉINES ... 69
3.6.1 Préparation des cultures pour la purification ... 69
3.7 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ENZYMES LIPOLYTIQUES ... 70
3.7.1 Courbes standards de para-nitrophénol ... 71
3.7.2 Détermination du pH optimal ... 71
3.7.3 Détermination de la température optimale ... 71
3.7.4 Détermination du substrat préférentiel ... 71
3.7.5 Thermostabilité ... 72
3.7.6 Effet de différents composés sur l'activité ... 72
3.8 IMMOBILISATION ... 73
3.8.1 Immobilisation par adsorption ... 73
3.8.2 Immobilisation par liaison covalente ... 73

4. RÉSULTATS ... 75

4.1 CRIBLAGE ET SÉQUENÇAGE DES CLONES POSITIFS ... 75
4.1.1 Criblage de la banque cosmidique ... 75
4.1.2 Isolement des cosmides et sous-clonage ... 76
4.1.3 Séquençage du gène de lipase provenant du cosmide lipIAF1-1 ... 78
4.1.4 Séquençage du gène de lipase provenant du cosmide lipIAF1-6 ... 78
4.2 ALIGNEMENT DES PROTÉINES AVEC DES LIPASES CONNUES ... 82
4.2.1 Homologie de l'enzyme LipIAF1-1 ... 82
4.2.2 Homologie de l'enzyme LipIAF1-6 ... 82
4.3 CLONAGE DES GÈNES CODANT POUR DES ENZYMES LIPOLYTIQUES ... 87
4.3.1 Clonage et expression chez *E. coli* ... 87
4.3.2 Clonage et expression chez *S. lividans* ... 90
4.3.3 Analyse en spectrométrie de masse de l'enzyme LipIAF1-6 ... 92
4.4 PURIFICATION DE L'ENZYME LIPOLYTIQUE LIPIAF1-6 ... 94
4.4.1 Chromatographie à interaction hydrophobe ... 94
4.4.2 Rendement de purification ... 94
4.5 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'ENZYME PURIFIÉE ... 97
4.5.1 Détermination du pH optimal ... 97
4.5.2 Détermination de la température optimale ... 97
4.5.3 Substrat préférentiel ... 99
4.5.4 Détermination de la thermostabilité ... 101
4.5.5 Stabilité en présence de solvants ... 102
4.5.6 Effet de cations et inhibiteurs ... 103
4.5.7 Stabilité en présence d'agents tensioactifs et oxydants ... 105
4.6 IMMOBILISATION DE L'ENZYME PURIFIÉE ... 107
4.6.1 Immobilisation par adsorption sur diatomite et gel de silice ... 107
4.6.2 Adsorption versus liaison covalente ... 107

4.6.3 Activité de l'enzyme immobilisée 110

5. DISCUSSION 111

5.1 IDENTIFICATION DE 2 NOUVEAUX GÈNES CODANT POUR DES ENZYMES LIPOLYTIQUES 111
5.1.1 Analyse de séquence et classification de l'enzyme LipIAF1-1 111
5.1.2 Analyse de séquence et classification de l'enzyme LipIAF1-6 113
5.2 EXPRESSION ET PURIFICATION DE PROTÉINES HÉTÉROLOGUES 114
5.2.1 Problématique reliée à l'expression de l'enzyme LipIAF1-1 114
5.2.2 Expression et purification de l'enzyme LipIAF1-6 116
5.3 CARACTÉRISATION DE LA LIPASE LIPIAF1-6 116
5.3.1 Spectre d'activité 116
5.3.2 Effet de différents composés sur la stabilité et l'activité enzymatique 117
5.4 IMMOBILISATION DE LA LIPASE LIPIAF1-6 120
5.4.1 Comparaison des matrices de diatomite et gel de silice 120
5.4.2 Efficacité des méthodes d'immobilisation 121
5.4.3 Activité de l'enzyme immobilisée 121

6. CONCLUSION 123

LISTE DES RÉFÉRENCES 125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.I	Exemples d'enzymes d'intérêt industriel et leurs applications dans les différentes industries	5
Tableau 2.II	Liste de quelques motifs conservés chez les enzymes lipolytiques	26
Tableau 2.III	Système de classification des familles d'enzymes lipolytiques établi par Arpigny et Jaeger, 1999	32
Tableau 2.IV	Aperçu global des secteurs dans lesquels les enzymes lipolytiques sont utilisées	39
Tableau 2.V	Liste d'estérases et de lipases thermophiles identifiées par des méthodes de métagénomique	49
Tableau 3.I	Description des souches de *E. coli* et *S. lividans* ainsi que des vecteurs utilisés	54
Tableau 3.II	Liste et composition des milieux de cultures utilisés pour la croissance de *S. lividans*	57
Tableau 3.III	Liste des amorces ayant servies au séquençage et à l'amplification des gènes d'intérêt. Les sites de restrictions sont soulignés	58
Tableau 3.IV	Liste et composition des solutions utilisées lors de l'isolement des plasmides transformés dans la souche *S. lividans* 10-164	65
Tableau 3.V	Gradient d'élution suivi lors de la purification de l'enzyme sur une colonne Butyl Sepharose 4 Fast Flow	71
Tableau 4.I	Liste de quelques enzymes homologues aux enzymes lipolytiques LipIAF1-1 et LipIAF1-6 identifiées lors du criblage de la banque métagénomique. Les logiciels informatiques en ligne NCBI BLASTp et SignalP 3.0 Server ont été utilisés respectivement pour l'homologie de séquences et déterminer la présence d'un peptide signal	84
Tableau 4.II	Tableau de purification de l'enzyme LipIAF1-6	96
Tableau 4.III	Spécificité de l'enzyme LipIAF1-6 envers différents esters de *p*-NP	100
Tableau 4.IV	Effet de différents composés sur l'activité de l'enzyme LipIAF1-6	104

Tableau 4.V Effet de différents agents tensioactifs et oxydants sur l'activité et la stabilité de la lipase LipIAF1-6 après 1h d'incubation à température pièce 106

Tableau 4.VI Comparaison de l'immobilisation par adsorption de la lipase LipIAF1-6 sur deux supports différents : le gel de silice aminopropylé et la poudre de diatomée 109

Tableau 4.VII Comparaison de l'immobilisation de la lipase LipIAF1-6 par adsorption et liaison covalente sur 150 mg d'un gel de silice aminopropylé 109

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Bilan du rapport annuel 2008 sur le marché global des enzymes industrielles publié par l'entreprise BBC (*Business Communications Company,* Inc.). Le graphique indique l'argent en milliards de dollars US qui a été investi entre l'année 2005 et 2007 et les prédictions concernant l'année 2012 6

Figure 2.2 Aperçu de la stratégie menant à l'étude du génome de micro-organismes non cultivables 12

Figure 2.3 Réaction d'hydrolyse des triglycérides effectuée par les enzymes lipolytiques 21

Figure 2.4 Schéma du repliement α/β retrouvé chez un grand nombre d'enzymes possédant une triade catalytique composée d'un nucléophile (une sérine chez les lipases), un acide carboxylique (aspartate/glutamate) et une histidine. (Source : (Nardini *et al.* 2000) 21

Figure 2.5 Image tirée de Fickers *et al* (2008) démontrant le phénomène d'activation interfaciale des lipases par l'hydrolyse de la triacétine (C2 :0). Lorsque la concentration du substrat atteint une valeur où l'insolubilité de ce dernier est atteinte, les lipases voient leur activité augmentée drastiquement comparativement aux estérases 23

Figure 2.6 Arrangement des molécules d'agents tensioactifs lorsque la concentration micellaire critique est atteinte 36

Figure 2.7 Activation chimique d'un support de silice par un agent de silanisation afin d'ajouter un groupement aminopropyle - $(CH_2)_3 - NH_2$ 45

Figure 2.8 Processus d'immobilisation par liaison covalente avec l'agent couplant glutaraldéhyde 46

Figure 4.1 Résultats du criblage des cosmides transfectés chez l'hôte *E. coli.* Les flèches rouges représentent les clones positifs lipIAF1-1 (gauche) et lipIAF1-6 (droite) 74

Figure 4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose illustrant les patrons de digestion SphI des cosmides lipIAF1-1 (puits 1) et lipIAF1-6 (puits 2) provenant des deux clones positifs issus de la banque génomique 77

Figure 4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose démontrant les résultats de la digestion SphI des cosmides lipIAF1-1 et lipIAF1-6 issus du sous-clonage des fragments. Les puits 2, 5, 6, 10 et 11 représentent les cosmides positifs issus du sous-clonage des cosmides lipIAF1-1 (gauche) et lipIAF1-6 (droite) respectivement. Il en est de même pour les puits 1, 3, 4, 7, 8 et 9 représentant les cosmides négatifs 77

Figure 4.4 Séquence nucléotidique du gène codant pour l'enzyme lipolytique provenant du cosmide lipIAF1-1 et séquence en acides aminés de la protéine encodée. La formyl-méthionine du codon initiateur est encerclée, le peptide signal présomptif est en caractères gras et le motif conservé GxSxG contenant la sérine du site actif est encadré 80

Figure 4.5 Séquence nucléotidique du gène codant pour l'enzyme lipolytique provenant du cosmide lipIAF1-6 et séquence en acides aminés de la protéine encodée. La formyl-méthionine du codon initiateur est encerclée, le peptide signal est en caractères gras et le pentapeptide conservé GxSxG est encadré 81

Figure 4.6 Alignement des séquences en acides aminés entre l'enzyme LipIAF1-1 et les trois protéines homologues à l'aide du logiciel Clustal 2.0.11. L'emplacement des résidus catalytiques potentiels (Ser, Asp, His) est indiqué par un point noir. La légende pour les symboles est la suivante : « * » : a.a. conservés au sein de toutes les séquences; « : » : les a.a. modifiés font partie du même groupe; « . » : a.a. semi-conservés 85

Figure 4.7 Alignement des séquences en acides aminés entre l'enzyme lipolytique LipIAF1-6 et les 5 protéines homologues effectué à l'aide du logiciel Clustal 2.0.11. Les résidus de la triade catalytique (Ser, Asp, His) sont indiqués par un point noir. La légende est la même que celle indiquée dans la Figure 4.6 86

Figure 4.8 Détection par zymogramme de l'activité lipolytique des protéines sécrétées chez *E. coli* par les clones lipIAF1-1 et lipIAF1-6 suivie de l'analyse des protéines sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (A) Puits (1) : marqueur de poids moléculaire, (2) : témoin négatif, (3) protéines extracellulaires du clone lipIAF1-1, (4 et 5) zymogramme des cultures témoins et LipIAF1-1. (B) Puits (1) : protéines extracellulaires du clone lipIAF1-6, (2) marqueur de poids moléculaire et (3) zymogramme 89

Figure 4.9 Détection par zymogramme de l'activité lipolytique des protéines sécrétées chez *S. lividans* 10-164 par les clones lipIAF1-1 et lipIAF1-6 suivie de l'analyse des protéines sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (A) Puits (1) : protéines sécrétées par le clone lipIAF1-1, (2) : marqueur de poids moléculaire, et (3) : zymogramme. (B) Puits (1) : marqueur de poids moléculaire, (2) : protéines sécrétées par le clone lipIAF1-6 et (3) zymogramme 91

Figure 4.10 Résultats obtenus en spectrométrie de masse lors de l'analyse de la protéine LipIAF1-6. (A) Probabilité, établie à l'aide du logiciel Mascot, que la bande excisée corresponde à LipIAF1-6; (B) peptides identifiés en SM couvrant l'ensemble de cette protéine (en gris) 93

Figure 4.11 Gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent illustrant une aliquote de surnageant brut (1) le marqueur de poids moléculaire (2) et une aliquote de la protéine LipIAF1-6 purifiée après le passage sur une colonne hydrophobe HiTrap Butyl FF (3) 96

Figure 4.12 Effet du pH sur l'activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. Les essais enzymatiques ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.2 à 9 (●) et dans un tampon NaOH-glycine 50 mM pH 9 à 11.3 (▲) avec 0.05% de $CaCl_2$ à 21°C envers le substrat *p*-NP décanoate (C_{10}) 98

Figure 4.13 Effet de la température sur l'activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. Les essais enzymatiques ont eu lieu dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ envers le *p*-NP décanoate (C_{10}) 98

Figure 4.14 Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. L'activité résiduelle a été calculée à 60°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ envers le *p*-NP décanoate (C_{10}) 101

Figure 4.15 Activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6 après 1h d'incubation à température pièce en présence de 10 et 30 % de différents solvants organiques 102

LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

°C :	Degrés Celsius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARN 16S :	Acide ribonucléique, sous-unité de 16 Svedberg
AT :	Adénine-thymine
ATP :	Adénosine triphosphate
BLAST :	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA :	Albumine sérique bovine
CG :	Cytosine-guanine
CMC :	Concentration micellaire critique
Da :	Dalton
DMSO :	Diméthylsulfoxide
dNTP :	Déoxynucléotide triphosphate (contient une concentration égale de déoxyadénosine triphosphate, déoxyguanosine triphosphate, déoxycytidine triphosphate et déoxythymidine triphosphate
DTT :	Dithiothréitol
E. coli :	*Escherichia coli*
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétracétique
g :	Gramme
GTh :	Glutaraldéhyde
h :	Heure
IPTG :	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb :	Kilobases
kDa :	Kilodalton
L :	Litre
m :	Mètre
M :	Molaire
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire
MUF :	4-méthylumbelliférone
ng :	Nanogramme
nm :	Nanomètre
p/v :	Poids/volume
pbs :	Paire de bases
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne
***p*-NP** :	*para*-nitrophényl
PMSF :	Phénylméthylsulphonyle fluoride
Pwo :	ADN polymérase de l'organisme *Pyrococcus woseii*
rpm :	Révolutions par minute
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
S. lividans :	*Streptomyces lividans*

TBE :	Tampon Tris-Borate-EDTA
TE :	Tampon Tris-HCl – EDTA
TES :	Acide N-[tris(hydroxyméthyl)-méthyl]-2-aminoéthanesulfonique
TSB :	Bouillon de soja tryptique (Tryptic soy broth)
U:	Unité
µg :	Microgramme
UI:	Unité internationale
µL :	Microlitre
µm :	Micromètre
µM :	Micromolaire
UV :	Ultraviolet
V :	Volt
v/v :	Volume/volume
Xgal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1. INTRODUCTION

À tous les jours, l'ensemble de la population consomme des biens et services qui sont issus des biotechnologies. Qu'il s'agisse d'un aliment, d'un médicament, d'une pièce de vêtement, d'un détergent, d'une crème hydratante ou parfois même de certaines matières plastiques, de biocarburant ou d'un simple papier, une ou plusieurs des étapes de production de ces produits a vraisemblablement nécessité l'action d'enzymes microbiennes (Kirk *et al.* 2002).

Parmi les nombreuses enzymes utilisées, les industries démontrent un intérêt grandissant pour les lipases, dont les domaines d'applications ne cessent de s'accroître (Pandey *et al.* 1999; Hasan *et al.* 2006). Toutefois, l'utilisation de biocatalyseurs n'est pas sans difficultés pour les différentes entreprises. En effet, les procédés industriels sont limités par la stabilité des enzymes et leur incapacité à catalyser les réactions dans des conditions extrêmes de pH, température, salinité ou encore en présence de quantités élevées de solvants (Ahuja *et al.* 2004). De plus, la majorité des procédés doivent être effectués à des températures élevées. Les raisons principales qui justifient ce choix sont l'augmentation de la solubilité des substrats, de la vitesse de réaction et aussi la diminution du risque de contamination par d'autres micro-organismes nuisibles (Demirjian *et al.* 2001; Hasan *et al.* 2006). Afin de répondre aux besoins de l'industrie, il devient donc primordial d'identifier de nouvelles enzymes qui possèdent les propriétés qui leur permettront de catalyser les réactions dans les conditions désirées.

En réalité, même si les micro-organismes dominent la Terre entière, à peine 1 % de ces derniers ont été étudiés (Amann *et al.* 1995; Pace 1997). Par conséquent, le bagage enzymatique de nombreux micro-organismes reste inexploré et beaucoup d'enzymes d'intérêt industriel dorment encore au sein du génome de ces bactéries. Heureusement, plusieurs techniques ont été développées afin d'accéder à cette diversité inconnue, parmi lesquelles la métagénomique, c'est-à-dire l'extraction directe du matériel génétique d'un consortium bactérien, qui permet de contourner les méthodes traditionnelles de culture pure (Handelsman 2004). À plusieurs reprises, le criblage de librairies d'ADN sur différents substrats a témoigné du succès de la méthode par

l'identification de nouvelles enzymes lipolytiques (Kim et Lee 2006; Lee *et al.* 2006; Lammle *et al.* 2007; Chu *et al.* 2008).

Néanmoins, un problème persistait : le nombre de clones à cribler était aberrant, dépassant souvent les dizaines, voir les centaines de milliers de clones (Handelsman 2004). Afin de remédier à ce problème, les techniques de métagénomique pouvaient être combinées à un enrichissement bactérien. Cette méthode permettait dès lors d'obtenir des micro-organismes adaptés aux conditions d'enrichissement et par conséquent, ces derniers contenaient des gènes encodant des protéines qui pouvaient catalyser les réactions dans les mêmes conditions. Par le fait même, le nombre de clones à cribler était moins élevé et un plus grand nombre de clones positifs étaient identifiés (Elend *et al.* 2006).

Le présent projet a donc pour but d'identifier de nouvelles enzymes lipolytiques qui répondent à deux critères importants de l'industrie. Ces derniers sont la thermostabilité et la capacité d'hydrolyser des acides gras en conditions alcalines. Pour ce faire, les enzymes ont été recherchées au sein d'une banque métagénomique qui provenait de micro-organismes dont la croissance a été effectuée dans des bioréacteurs enrichis et soumis aux conditions désirées (Hupé 2008). En résumé, différents bioréacteurs contenant des sources de carbone variées (viande, gélatine, huile d'olive, etc.) ont été soumis à des changements de pH (7 > 8.5 > 7) et de température (50°C > 70°C > 50°C). Ces changements ont eu lieu sur une période de 72h. La biomasse initiale était variée (extrait de compost de crevettes, biomasse provenant de réacteurs thermophiles, extrait de sol, etc.) et les bioréacteurs sont restés en fonction pour une période de 3 mois afin de stabiliser la biomasse préalablement au criblage fonctionnel. La section suivante mettra en revue l'intérêt industriel des enzymes, les avantages et les désavantages de la métagénomique, l'expression de gènes hétérologues et plusieurs caractéristiques biochimiques connues chez un grand nombre d'enzymes lipolytiques. Par la suite, suivant la section sur la méthodologie, les résultats sur les deux enzymes lipolytiques identifiées seront exposés, puis critiqués.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les biotechnologies

2.1.1 Les enzymes et leurs applications

Les enzymes sont des biocatalyseurs permettant de faciliter et accélérer les réactions biologiques essentielles au métabolisme des êtres vivants. Il existe différentes catégories d'enzymes selon la nature de la réaction catalysée. En 2001, le nombre d'enzymes connues était estimé à 4000 et seulement 200 étaient utilisées commercialement (Sharma *et al.* 2001). Dans l'industrie, la majorité des enzymes utilisées sont des hydrolases, c'est-à-dire des molécules dont la fonction est de dégrader son substrat en clivant des liaisons esters (Kirk *et al.* 2002). Le marché des enzymes comprend cinq secteurs qui utilisent plus de 75 % de ce qui est commercialement disponible. Dans cette proportion, entre 40 et 60 % des enzymes sont destinées à l'industrie des produits nettoyants. Les autres industries se partageant le reste des parts du marché sont l'industrie du textile, celle de la transformation de l'amidon, l'utilisation d'enzymes en boulangerie et la nutrition animale (Lorenz et Eck 2005; Hasan *et al.* 2006). Dans les prochaines années, les applications industrielles s'étendront également à d'autres secteurs d'activité, tels que la production de biocarburants, de plastiques biodégradables ou encore le développement de nouvelles molécules pour l'industrie pharmaceutique (Lorenz et Eck 2005; Langer *et al.* 2006). Parmi les enzymes commercialisées se trouvent les protéases, les amylases, les cellulases, les lipases, les laccases, les chitinases et bien d'autres encore. À elles seules, les enzymes protéolytiques représentent un peu plus de 40 % des enzymes industrielles (Sharma *et al.* 2001). Le Tableau 2.I présente une liste de quelques enzymes fréquemment utilisées et leurs applications dans les différentes industries.

Plusieurs raisons justifient l'utilisation grandissante de cette technologie verte. L'impact environnemental est incontestablement la raison principale ayant mené au développement de procédés enzymatiques. En effet, beaucoup de procédés industriels génèrent des effluents qui contiennent des substances toxiques et polluantes pour l'environnement. Ainsi, certaines enzymes peuvent être utiles afin de remplacer ou de se débarrasser de ces matières polluantes. Également, les enzymes sont des biocatalyseurs

qui possèdent un substrat spécifique et permettent, par le fait même, d'obtenir des produits de meilleure qualité et d'une grande pureté. De plus, les enzymes ont fait leurs preuves dans plusieurs procédés. En effet, il a été démontré que l'utilisation d'enzymes augmentait le rendement de production de façon économique, tout en diminuant l'utilisation d'eau et donc des effluents à traiter. Un autre avantage justifiant leur utilisation provient du fait que les enzymes sont renouvelables puisqu'une fois le substrat hydrolysé et le produit libéré, elles peuvent catalyser de nouveau une autre molécule de substrat. Seules les conditions de stabilité et d'activité (pH, température, salinité, solvants, etc.) de l'enzyme représentent un facteur limitant dans la réaction. Enfin, ces molécules sont biodégradables et ne causent donc pas de problèmes environnementaux (Ahuja *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006).

La nature contient une source inestimable d'enzymes d'intérêt industriel provenant principalement des animaux, des plantes et des micro-organismes. Toutefois, les micro-organismes restent encore la meilleure source d'enzymes. Ceci s'explique d'abord par le fait que les micro-organismes possèdent des activités catalytiques variées. Au cours des millions d'années pendant lesquelles les micro-organismes ont dominé la vie sur la Terre, les enzymes ont évolué afin d'adapter leur activité catalytique aux conditions environnantes (Lorenz *et al.* 2002). Ainsi, un grand nombre de bactéries sont adaptées à des environnements extrêmes. Par conséquent, leur génome peut contenir des gènes codant pour des enzymes généralement plus stables et générant une activité enzymatique plus élevée que les enzymes provenant des plantes ou des mammifères (Sharma *et al.* 2001; Hasan *et al.* 2006). Ces enzymes répondraient donc mieux aux demandes industrielles. Les manipulations des souches, tant au niveau de la multiplication bactérienne que de la production enzymatique, sont également facilitées chez les micro-organismes. Également, en 2006, Hasan et ses collaborateurs estimaient à seulement 2 % l'ensemble des souches bactériennes ayant été examinées pour leur potentiel enzymatique. Enfin, l'intérêt grandissant pour les enzymes se traduit par les statistiques et prédictions concernant le marché enzymatique. L'entreprise BBC (*Business Communications Company Inc.*) est spécialisée dans l'analyse statistique des marchés représentant les secteurs majeurs de l'industrie. Le dernier rapport publié en

Tableau 2.I : Exemples d'enzymes d'intérêt industriel et leurs applications dans les différentes industries.

Enzymes	Applications
Protéase	Nettoyage de résidus protéiques (détergents)
	Nutriment pour la croissance des levures
	Industrie laitière (lait infantile, coagulant pour le lait, saveur)
	Détachement de biofilms dans les pâtes et papiers
	Changement des propriétés des pâtes à biscuit
	Nettoyage de verres de contact
	Traitement du cuir
Amylase	Nettoyages de résidus d'amidon (détergents)
	Conversion d'amidon en glucose
	Mollesse et volume de la pâte à pain
	Traitement de boissons
	Assouplissement de vêtements
	Éliminer les tâches d'encre (pâtes et papiers)
Lipase	Dégraissage de vêtements et du cuir (détergents)
	Développement de saveurs (industrie fromagère)
	Émulsifiant dans la pâte alimentaire
	Dégradation de résines (pâtes et papiers)
	Transestérification d'huiles et graisses
	Synthèse organique
Cellulase	Nettoyage de vêtements
	Finition du denim et assouplissement du coton
	Modification des fibres (pâtes et papiers)
Xylanase	Réduction de la viscosité lors de la conversion de l'amidon
	Augmentation de la digestibilité de la nourriture animale
	Blanchiment du papier
Pectinase	Produits à base de fruits (industrie alimentaire)
	Clarification des boissons à base de fruits
Laccase	Clarification des boissons à base de fruits
	Développement de saveurs dans la bière
	Traitement du liège
	Blanchiment des vêtements
	Délignification du papier (pâtes et papiers)

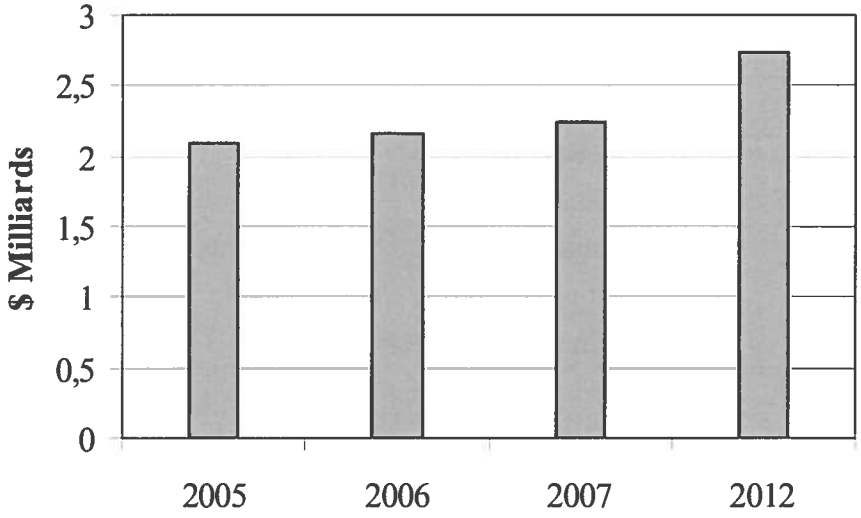


Figure 2.1 : Bilan du rapport annuel 2008 sur le marché global des enzymes industrielles publié par l'entreprise BBC (*Business Communications Company,* Inc.). Le graphique indique l'argent en milliards de dollars US qui a été investi entre l'année 2005 et 2007 et les prédictions concernant l'année 2012.

janvier 2008 estimait une augmentation annuelle du marché enzymatique de 4 % d'ici l'année 2012 (Figure 2.1).

2.2 L'approche métagénomique

2.2.1 Les micro-organismes non cultivables

Les micro-organismes jouent un rôle clé dans tous les environnements. Ainsi, ils sont au centre de plusieurs cycles biogéochimiques. Les bactéries peuvent également éliminer plusieurs toxines de l'environnement et sont associées au système digestif de plusieurs organismes vivants (Handelsman 2004). Également, tel que mentionné précédemment, la grande diversité des micro-organismes les rend attrayants pour plusieurs applications biotechnologiques. Par conséquent, l'intérêt marqué pour les enzymes microbiennes mène à une quête perpétuelle afin d'identifier de nouvelles protéines. En parallèle, les industries se voient confrontées à une compétition grandissante étant donné la baisse continuelle des coûts des produits. Afin d'assurer une bonne concurrence, les compagnies doivent ainsi concevoir des produits plus performants entre autres en ciblant l'utilisation de nouvelles enzymes répondant aux exigences de leur secteur d'application. Or, les enzymes connues provenant des micro-organismes étudiés par les techniques de cultures traditionnelles ne répondent pas adéquatement à ces exigences et par conséquent, ce sont les procédés industriels qui doivent être modifiés afin d'optimiser le rendement de leurs biotechnologies. Les industries se sont donc retrouvées face à un besoin grandissant : identifier rapidement de nouveaux biocatalyseurs qui doivent répondre à des critères d'activité, de stabilité et de spécificité (Lorenz *et al.* 2002; Daniel 2004; Lorenz et Eck 2005; Langer *et al.* 2006).

Jadis, seules les techniques de cultures pures étaient employées pour les études microbiologiques. Les nouvelles souches isolées étaient étudiées pour leur potentiel à produire des biocatalyseurs et à ce moment, la charge de travail semblait suffisante puisqu'à peine 2 % des espèces connues avaient été étudiées pour leur potentiel enzymatique (Hasan *et al.* 2006). À cette époque, une culture contenant plus d'un micro-organisme était considérée comme contaminée. Présentement, il est bien connu qu'une grande majorité des micro-organismes vit en consortium dans leur environnement naturel.

En effet, les bactéries vivent au sein de communautés où elles communiquent, s'échangent des molécules et souvent dépendent l'une de l'autre pour leurs activités métaboliques (Lorenz *et al.* 2002; Vieites *et al.* 2009). Avec l'arrivée de nouvelles technologies dans les 20 dernières années, les scientifiques ont constaté peu à peu l'insuffisance des cultures pures afin d'étudier la diversité du monde microbien. En effet, en comparant le nombre de colonies sur Pétri avec les observations au microscope et conjointement, avec l'analyse de la diversité microbienne par le séquençage des ARN ribosomaux, les microbiologistes n'eurent d'autres choix que de constater que seule une mince fraction de la diversité était représentée par les techniques de culture traditionnelles. Par conséquent, la diversité du monde microscopique était sérieusement sous-estimée. À ce moment, le pourcentage de bactéries échappant aux cultures sur des milieux nutritifs solides a été estimé entre 99 et 99.9 %. Ce sont tous les groupes taxonomiques qui ont été sous-estimés (Kaeberlein *et al.* 2002; Lorenz et Eck 2005; Langer *et al.* 2006; Fierer *et al.* 2007; Bertin *et al.* 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Les questions survenues étaient alors les suivantes : quels sont les micro-organismes présents dans les différents environnements et quelles sont leurs fonctions ? Comment interagissent-ils entre eux et possèdent-ils des gènes codant pour des enzymes pouvant répondre efficacement aux besoins de l'industrie ?

Afin d'accéder à cette diversité inconnue, les techniques de cultures des micro-organismes de l'environnement ont d'abord été perfectionnées. En effet, de simples détails pouvaient, dans certains cas, permettre l'identification de nouveaux micro-organismes. Par exemple, incuber les Pétri contenant les échantillons environnementaux de micro-organismes plus de trois jours a permis de révéler la présence de bactéries à croissance plus lente (Kaeberlein *et al.* 2002; Cardenas et Tiedje 2008). Certains agents gélifiants utilisés pour la préparation des géloses pouvaient également influencer la croissance bactérienne. Il arrivait ainsi qu'il soit plus avantageux de remplacer l'agar par la gomme gélane. D'un autre côté, la reproduction exacte des conditions d'un écosystème demeurait un défi de taille. En effet, chaque biotope détient une combinaison unique de nutriments et d'oligoéléments et présente des conditions spécifiques de pH, salinité, pression et niveau d'oxygène qui peuvent être difficiles à reproduire en laboratoire. L'amélioration des conditions de croissance bactérienne afin de se

rapprocher des conditions du milieu naturel a donc également contribué à l'identification de certains micro-organismes auparavant non cultivables (Kaeberlein *et al.* 2002; Li et Qin 2005; Cardenas et Tiedje 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008).

Par contre, ces efforts sont restés insuffisants pour explorer l'abondante diversité du monde microscopique. D'autres techniques ont dû être développées afin de découvrir et étudier les micro-organismes non cultivables et par le fait même, identifier de nouveaux catalyseurs pour les applications biotechnologiques. C'est en réponse à cette problématique que l'idée d'isoler directement l'ADN microbien de l'environnement a émergé vers la fin des années 1970. Plus tard, le terme métagénomique est survenu afin de désigner l'isolement, puis l'analyse de l'ensemble du matériel génétique provenant d'une communauté bactérienne (Lorenz *et al.* 2002; Handelsman 2004; Cardenas et Tiedje 2008; Hugenholtz et Tyson 2008). Il s'agit d'une méthode novatrice permettant de contourner l'étape d'isolement des souches en laboratoire afin d'accéder directement au réservoir génétique d'un consortium bactérien (Lorenz et Eck 2005). Dès les débuts, l'isolement de l'ADN total d'une biomasse complexe telle que celle retrouvée dans le sol a démontré le potentiel de cette méthode afin d'identifier de nouvelles espèces. En effet, l'analyse de l'ADN provenant d'un échantillon de terre démontrait une diversité 100 fois plus élevée que les résultats issus des anciennes techniques (Handelsman 2004). De plus, ces techniques combinées à d'autres technologies moins coûteuses et plus accessibles ont également permis le premier séquençage d'un génome bactérien en contournant la culture en laboratoire (DeLong 2004). Les outils utilisés afin d'étudier le bassin génétique d'un environnement complexe englobent ainsi toutes les technologies récentes : le séquençage, le développement de vecteurs et de souches d'expression afin de cloner de l'ADN hétérologue, le développement de logiciels en bioinformatiques afin d'analyser les données recueillies, la fabrication de biopuces et bien d'autres avancées technologiques (DeLong 2004). La métagénomique a ainsi ouvert la voie à l'étude des micro-organismes non cultivables incluant les eucaryotes, procaryotes (bactéries et archaebactéries) et les virus (Fierer *et al.* 2007).

2.2.2 Extraire et analyser l'information génétique

Les étapes permettant la construction d'une banque génomique d'ADN hétérologue ainsi que les applications subséquentes sont résumées dans la Figure 2.2. D'abord, l'ADN total doit être extrait d'un environnement puis ensuite purifié. Cette étape est d'une importance capitale puisqu'elle déterminera la quantité et la qualité des données qui seront recueillies pour des fins d'analyse. Les méthodes d'extraction de l'ADN sont variées et dans plusieurs cas, chaque laboratoire a optimisé son protocole. Les modifications permettent principalement de minimiser la dégradation du matériel génétique au cours de l'isolement et de réduire ou empêcher l'extraction conjointe de contaminants présents au sein de la niche écologique (Lorenz *et al.* 2002; Cowan *et al.* 2004; Rajendhran et Gunasekaran 2008). D'autres facteurs viennent influencer la stratégie d'extraction de l'ADN. Entre autres, la lyse des parois cellulaires est affectée par le type de paroi. Par la suite, une fois le matériel génétique extrait et purifié, ce dernier doit être fragmenté afin de générer des brins d'ADN d'une certaine longueur pouvant être liguées dans un vecteur approprié. Ce dernier peut ensuite être inséré ou non dans un phage afin que l'ADN soit transformé dans une souche bactérienne connue. Les souches bactériennes utilisées dépendent de la nature de l'ADN isolé. Les hôtes les plus fréquemment utilisés sont *E. coli*, *S. lividans*, *Bacillus* sp. et *P. putida* (Steele et Streit 2005; Rajendhran et Gunasekaran 2008). À la fin de toutes ces étapes, les transformants obtenus constituent la banque génomique. C'est cette librairie d'ADN qui sert ensuite de base pour les investigations ultérieures (Figure 2.2) (Lorenz *et al.* 2002; Cardenas et Tiedje 2008; Hugenholtz et Tyson 2008).

Les microbiologistes désirent obtenir une vision intégrée et globale des activités ayant lieu dans une communauté complexe. Suivant les étapes de construction de la banque génomique à partir d'un consortium bactérien, une panoplie d'informations peut être retirée. En premier lieu, il est possible de déterminer la diversité microbienne d'un écosystème (Schwartz 2006; Bertin *et al.* 2008; Hugenholtz et Tyson 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008; Schmitz *et al.* 2008). En effet, en 1985, il fut confirmé que l'ARN ribosomal 16S présent chez toutes les espèces bactériennes permettait d'établir un lien évolutif entre deux micro-organismes. Le développement de nombreux protocoles

d'extraction du matériel génétique permettait dès lors également d'extraire les ARN ribosomaux d'un échantillon environnemental sans isoler les micro-organismes en culture pure. Aujourd'hui, ce sont les techniques d'amplification de l'ADN (PCR) qui sont le plus souvent effectuées suivant l'extraction de l'ADN total afin d'amplifier les gènes codants pour ces ARNr 16S. La raison principale justifiant le choix du PCR plutôt que l'extraction des ARN vient du fait que ces derniers sont moins stables que l'ADN. Les amorces utilisées servent à amplifier de courtes régions qui permettent de classer les bactéries selon leur genre (Handelsman 2004; Steele et Streit 2005; Blow 2008; Cardenas et Tiedje 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Les outils bioinformatiques sont devenus indispensables afin de comparer les séquences obtenues avec celles provenant de micro-organismes connus qui sont conservées dans des banques de données. Il est avantageux de procéder ainsi afin d'établir la diversité microbienne entre autres puisque ces méthodes permettent de recueillir des informations en évitant le séquençage complet du génome de la bactérie étudiée (Cowan *et al.* 2005; Blow 2008). L'analyse des ARN ribosomaux permet donc non seulement d'établir les genres bactériens présent dans un biotope donné, mais également d'établir le pourcentage que chacune des espèces occupe dans ce même biotope (Handelsman 2004). La diversité d'écosystèmes uniques tels que la microflore digestive de l'Homme, les eaux thermales sulfureuses ou encore les sols désertiques a pu être évaluée.

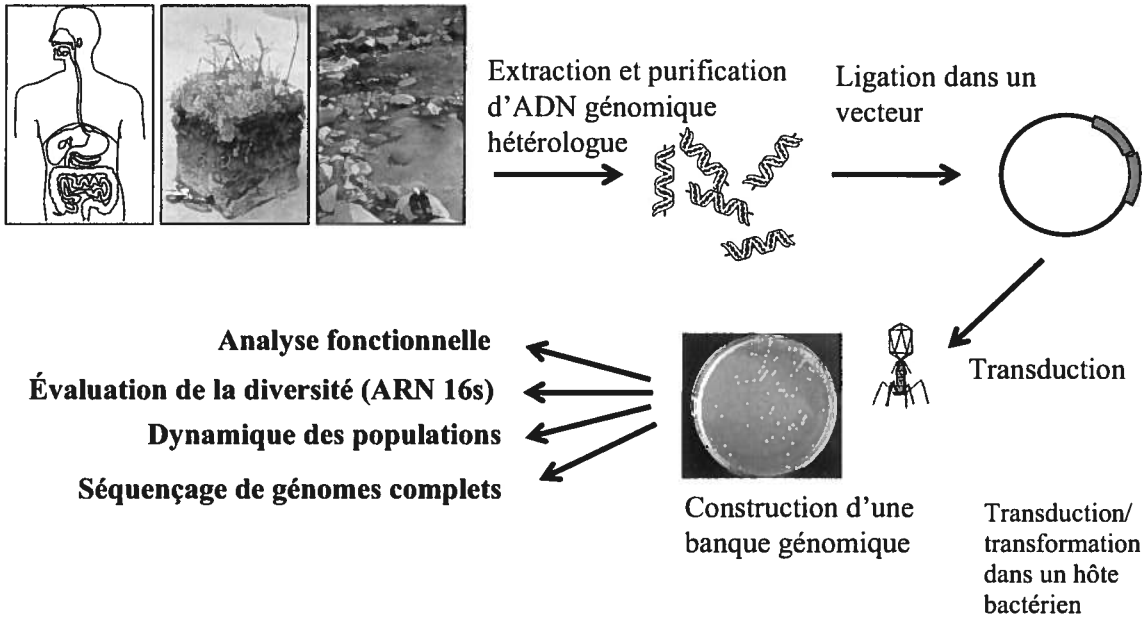


Figure 2.2 : Aperçu de la stratégie menant à l'étude du génome de micro-organismes non cultivables.

D'autre part, les études métagénomiques ont alloué l'approfondissement des connaissances sur l'écologie microbienne. Dans cette branche, sont incluses les questions concernant les relations symbiotiques entre procaryotes et eucaryotes ainsi que les moyens de communication entre les micro-organismes. Il importe également de comprendre ce qui permet à ces derniers de s'associer et ou au contraire, d'entrer en compétition les uns avec les autres (Handelsman 2004; Hugenholtz et Tyson 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Certaines de ces connaissances ont été acquises par le séquençage des gènes issus de banques génomiques. Dans un premier temps, l'analyse transcriptomique, c'est-à-dire de tous les ARN messagers transcrits, donne des indices sur les activités métaboliques d'un consortium bactérien. Également, les biofilms, une structure formée d'une communauté complexe de micro-organismes, sont au sein de plusieurs études en microbiologie. Les technologies de séquençage aléatoire appliquées à l'ensemble du matériel génétique extrait d'un biofilm peuvent ainsi permettre la reconstruction des différents génomes au sein du biofilm. Ces précieuses données combinées aux analyses des ARNr 16S sont ensuite analysées afin de relier les gènes d'une voie métabolique à une bactérie (Handelsman 2004; Steele et Streit 2005). Les biofilms ne sont pas les seules communautés microbiennes à attirer de l'attention. Les symbiontes bactériens obligatoires établissant un lien étroit avec des organismes supérieurs, tels que les insectes sont également au centre de plusieurs études métagénomiques.

De plus, le séquençage de génomes complet ou encore l'amplification à partir d'amorces dégénérées peuvent non seulement fournir des indices sur la dynamique d'une population mais également servir à identifier de nouveaux gènes et parfois même, des opérons complets impliqués dans certains cycles biogéochimiques (Schloss et Handelsman 2003). Toutes ces méthodes combinées permettent l'identification, par homologie de séquences, de gènes codant pour des protéines aux fonctions attrayantes (Schloss et Handelsman 2003; Cowan *et al.* 2005; Schmeisser *et al.* 2007; Bertin *et al.* 2008). Ainsi, la souche bactérienne ayant servi d'hôte pour la construction de la banque ne doit pas être optimisée pour l'expression des gènes puisque ces derniers sont identifiés par des méthodes de séquençage. Par contre, cette méthode possède une faille. En effet, les gènes issus du séquençage sont comparés aux gènes déjà identifiés. Or, en tenant

compte qu'à peine 1 % des bactéries ont été isolées et classées, il n'est pas rare que les séquences trouvées n'aient que très peu d'homologie avec les autres séquences et par conséquent, leur fonction reste souvent inconnue. Ainsi, la majorité des gènes provenant des banques métagénomiques sont associés à des fonctions hypothétiques. La conséquence de cette problématique est apparente : beaucoup de gènes d'intérêt peuvent être écartés lors de la recherche étant donné leur faible homologie avec les gènes résultants des connaissances actuelles (Schmeisser *et al.* 2007).

Pour cette raison, un criblage fonctionnel des librairies métagénomiques est beaucoup plus fructueux afin d'identifier de nouvelles enzymes d'intérêt industriel et consiste en la dernière application possible pouvant être effectuée à partir du matériel génétique isolé (Schloss et Handelsman 2003; Schmeisser *et al.* 2007; Bertin *et al.* 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008; Schmitz *et al.* 2008). Contrairement aux méthodes de séquençage, PCR et analyses bioinformatiques afin d'identifier de nouveaux gènes, l'analyse fonctionnelle consiste en premier lieu en l'étude de la protéine. Les recherches se concentrent alors sur l'observation du phénotype plutôt que du génotype des clones composants la banque d'ADN. Ce n'est que par la suite que l'on remonte au gène codant qui, une fois identifié, est séquencé. Ainsi, ce type de recherche implique le développement d'essais enzymatiques variés et sensibles afin de détecter même les faibles taux d'activité (Handelsman 2004; Schloss et Handelsman 2005; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Le criblage fonctionnel comporte certains avantages. D'abord, le travail laborieux de séquençage de la banque métagénomique en entier peut être évité. Aussi, cette méthode permet d'approfondir les connaissances sur les classes d'enzymes grâce aux séquences nouvelles. Toutefois, les vecteurs et les souches d'expression doivent être optimisés afin que les gènes soient transcrits puis traduits adéquatement. Selon le type de vecteur utilisé, les fragments d'ADN peuvent être plus petits que 10 kilobases pour les petites librairies. Dans d'autres cas, la longueur peut varier entre 25 et 40 kilobases lorsque les fragments sont clonés dans des cosmides. Dans tous les cas, les promoteurs d'origine doivent être fonctionnels dans la souche choisie (Henne *et al.* 2000; Rondon *et al.* 2000; Entcheva *et al.* 2001; Hardeman et Sjoling 2007). Même s'il peut être difficile d'associer le gène identifié à un micro-organisme non cultivable, cette

méthode permet de fournir aux entreprises des enzymes complètement nouvelles pour les applications en biotechnologie.

2.2.3 Enrichissement couplé à la métagénomique

Lors du criblage fonctionnel, ce sont typiquement des centaines de milliers, parfois même des millions de transformants issus du clonage de la banque métagénomique qui doivent être testés afin d'identifier de nouvelles enzymes d'intérêt industriel (Handelsman 2004; Sharma *et al.* 2005). Ceci est dû en grande partie au fait que les gènes ciblés ne représentent qu'une infime partie du bassin génétique d'un environnement complexe. À titre d'exemple, Henne et ses collaborateurs (2000) ont dû cribler 730 000 clones afin de détecter une enzyme hydrolysant le substrat lipidique trioléine. Également, l'équipe de Rolf Daniel a criblé plus de 2 millions de clones, résultant en l'identification de 20 clones contenant des gènes catalysant les polyols (Henne *et al.* 2000; Daniel 2004; Handelsman 2004). Un autre exemple est le criblage de 100 000 clones afin d'identifier une seule enzyme protéolytique (Schmeisser *et al.* 2007). Le nombre de clones positifs identifiés dépend essentiellement de la qualité et de la quantité d'ADN isolé, des vecteurs et hôtes d'expression et du développement de méthodes efficaces et sensibles de criblage pour l'activité ciblée. Les fragments d'ADN doivent aussi posséder une certaine longueur afin de conserver, dans certains cas, tous les gènes nécessaires à l'expression de la protéine recherchée (Cowan *et al.* 2005; Hardeman et Sjoling 2007).

Or, certains problèmes ont été associés à l'isolement de l'ADN directement de l'environnement. Tel que mentionné dans la précédente section, les équipes de chercheurs des différents laboratoires doivent développer un protocole différent pour chaque biotope étudié. Au cours de l'extraction, l'ADN peut être dégradé ou encore co-purifié avec des contaminants du milieu comme les polyphénols, inhibant les étapes ultérieures de biologie moléculaire. En conséquence, plusieurs chercheurs ont échoué à la construction d'une banque génomique (Entcheva *et al.* 2001; Cowan *et al.* 2004).

Il devient dès lors indispensable de développer des méthodes alternatives permettant à la fois d'obtenir de l'ADN de meilleure qualité et de diminuer le nombre de clones à cribler afin d'identifier des gènes nouveaux. Pour ce faire, certaines étapes

peuvent être effectuées préalablement à la construction de la banque métagénomique. Il est possible, par exemple, d'effectuer des centrifugations différentielles permettant de séparer les génomes riches en GC des génomes riches en AT. L'enrichissement bactérien est également une excellente méthode alternative. L'inoculum de départ reste un consortium bactérien prélevé d'un environnement complexe. Par la suite, une fois prélevées, les bactéries sont cultivées en laboratoire. De cette façon, les techniques traditionnelles d'isolement bactérien sont également contournées et les conditions de laboratoire étant contrôlées, il est aussi possible d'ajouter un substrat spécifique dans un fermenteur, permettant de favoriser la croissance des souches bactériennes possédant la capacité de dégrader ou utiliser le substrat ajouté. Dans les faits, il a été démontré que la diversité bactérienne issue des enrichissements était moins complexe que celle de l'environnement. Ces observations sont dues entre autres au fait que les micro-organismes à croissance rapide sont favorisés au détriment de ceux à croissance plus lente. Par contre, les observations au microscope et les analyses phylogénétiques ont mis en évidence une diversité tout de même très variée (Entcheva *et al.* 2001; Daniel 2004; Cowan *et al.* 2005).

Dès les débuts de la métagénomique, certains laboratoires de recherche se sont aventurés à coupler métagénomique et enrichissements bactériens. Aussi tôt que 1995, le groupe de Healy *et al.* a isolé l'ADN d'un bioréacteur qui était en fonction depuis 1986. Ce bioréacteur fonctionnait en conditions thermophiles (55°C) à un pH de 6.5-7. Les sources de carbones étaient essentiellement de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine et l'équipe s'intéressait principalement aux enzymes cellulolytiques (Healy *et al.* 1995). En criblant leur banque métagénomique issue de leur bioréacteur, Healy *et al.* (1995) a réussi à identifier 12 clones positifs sur 15 000 clones criblés. Les nouveaux gènes séquencés ont été comparés à ceux conservés dans les banques de données universelles et dans les meilleurs cas, présentaient 40 % ou moins d'homologie avec les cellulases connues. L'enrichissement peut aussi se faire sur une période de temps moins longue. Un deuxième exemple intéressant a été l'étude publiée par Knietsch et ses collaborateurs en 2003. La biomasse provenant de 4 types de sols différents a été prélevée et inoculée dans un fermenteur en laboratoire pour une période de 48h à 30°C. Les enzymes recherchées devaient posséder une activité oxydoréductase. Des 100 000

clones criblés, 24 démontraient une activité positive. Encore une fois, les gènes identifiés n'avaient jamais été étudiés auparavant et provenaient de micro-organismes nouveaux (Knietsch *et al.* 2003). Voget *et al* (2003) a également criblé une banque métagénomique issue d'un enrichissement bactérien afin d'isoler 4 cosmides de la librairie d'ADN contenant 12 cadres de lecture codant pour des agarases. Au total, seulement 1532 clones avaient été criblés (Voget *et al.* 2003).

En résumé, les gènes encodés par les micro-organismes provenant d'environnements complexes peuvent devenir accessibles par la métagénomique. De plus, la croissance en laboratoire de la biomasse d'un consortium bactérien par des méthodes d'enrichissement a fait ses preuves : la diversité suite à l'enrichissement reste élevée et permet d'identifier rapidement des nouveaux biocatalyseurs pour les entreprises intéressées à diverses applications en biotechnologies et ce, en criblant un nombre moins élevé de transformants.

2.2.4 Limites de l'approche

L'approche métagénomique a permis l'exploration de milieux qui étaient auparavant inaccessibles. Il est donc incontestable que ces nouvelles technologies reliées à l'étude des micro-organismes non cultivables ont permis l'accès à de précieuses informations sur la vie au sein des biotopes de la Terre (Handelsman 2004; Hugenholtz et Tyson 2008). Toutefois, malgré les développements fulgurants, quelques difficultés persistent. Les limites de l'approche seront donc énumérées dans la présente section.

En premier lieu, les études métagénomiques visaient à identifier la diversité des micro-organismes. Par contre, la microflore subit constamment des modifications selon les conditions de l'environnement et par conséquent, afin que les résultats soient représentatifs, plusieurs échantillonnages devraient être effectués avant de conclure sur la diversité d'un environnement. Également, lors de l'extraction, les espèces bactériennes présentes en faibles proportions dans le consortium sont souvent sous représentées lors des analyses phylogénétiques (Fierer *et al.* 2007; Blow 2008; Vieites *et al.* 2009).

L'autre problématique difficile à contourner est que le séquençage des banques métagénomiques génère une quantité phénoménale d'informations à analyser (DeLong 2004). Ces études nécessitent non seulement le développement d'outils bioinformatiques

puissants, mais également beaucoup de temps afin d'interpréter les données. Malheureusement, la majorité des séquences obtenues ne sont apparentées à aucun gène des banques génomiques. Encore aujourd'hui, 25 à 40 % des gènes codants ne sont affiliés à aucune fonction connue (Bertin *et al.* 2008). Par exemple, lors de l'expédition visant à effectuer un échantillonnage des océans (*Global Ocean Sampling Expedition*), 6.12 millions de gènes ont été séquencés. Parmi les protéines encodées par ces gènes, 1700 d'entre elles n'étaient associées à aucune famille connue. Par conséquent, ceci confirme la lacune au niveau des connaissances. D'autres types d'analyses doivent être entreprises puisque l'analyse de la banque métagénomique par le séquençage uniquement ne peut servir à interpréter les données obtenues (Blow 2008; Cardenas et Tiedje 2008; Hugenholtz et Tyson 2008; Vieites *et al.* 2009).

Aussi, quoique la métagénomique ait déjà été utilisée afin de reconstruire des génomes complets de micro-organismes non cultivables, cette technique se limite à des biotopes peu complexes contenant une diversité limitée (Handelsman 2004; Blow 2008; Cardenas et Tiedje 2008; Hugenholtz et Tyson 2008). En effet, les contigs issus du séquençage de communautés complexes peuvent être difficiles à assembler. Beaucoup de gènes nouveaux ainsi séquencés ne peuvent être associés au micro-organisme desquels ils sont issus. Également, il ne faut pas négliger les problèmes d'extraction de l'ADN déjà mentionnés dans les précédentes sections. De nos jours, certaines entreprises ont commercialisé des trousses permettant de faciliter l'extraction et la purification de l'ADN. Certaines publications ont établi une liste de ces trousses et d'autres ont comparé leur efficacité (Handelsman 2004; Schmeisser *et al.* 2007; Cardenas et Tiedje 2008; Rajendhran et Gunasekaran 2008).

Le criblage fonctionnel des banques métagénomiques permet d'identifier rapidement des gènes possédant une fonction recherchée mais comporte également quelques désavantages. D'abord, les données générées dépassent la capacité à les analyser. En effet, plusieurs enzymes identifiées par un criblage fonctionnel n'ont pas encore été caractérisées. Environ 14 amylases et plus de 80 lipases ont été identifiées mais à peine quelques unes ont été caractérisées plus en profondeur (Schmeisser *et al.* 2007). Par cette méthode, il est difficile d'associer un micro-organisme au gène identifié. La dernière difficulté a été mentionnée précédemment. Il s'agit du développement de

vecteurs et d'hôtes d'expression efficaces afin d'exprimer les gènes hétérologues. En effet, l'ADN isolé peut provenir d'eucaryotes ou de procaryotes qui diffèrent grandement dans leurs systèmes d'expression des protéines (Handelsman 2004; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Cette problématique sera abordée plus en profondeur dans la section 2.6.

Enfin, ces quelques limites n'arrêteront pas l'application de cette technique pour étudier le génome de micro-organismes non cultivables. Le potentiel de la métagénomique dépasse largement les problème rencontrés et cette technique novatrice reste attrayante afin d'identifier des enzymes pouvant être utilisées en industrie.

2.3 Les enzymes lipolytiques

2.3.1 Généralités

Auparavant, les protéases et les amylases étaient les enzymes microbiennes attirant le plus d'attention pour les applications en biotechnologie. Toutefois, depuis quelques années, l'intérêt pour les enzymes lipolytiques a connu une grande augmentation sur le marché global des enzymes (Hasan *et al.* 2006). Ces protéines sont des hydrolases jouant un rôle clé dans le métabolisme des lipides. Les triglycérides sont des lipides constitués d'une molécule de glycérol et de trois chaînes d'acides gras. Le nombre de carbone détermine la longueur de ces chaînes et par le fait même, la nature des lipides. L'hydrolyse des triglycérides s'effectue par le clivage du lien carboxyl ester (R'-COOH), c'est-à-dire le lien unissant les chaînes carbonées à la molécule de glycérol (Figure 2.3) (Jaeger *et al.* 1994; Jaeger et Reetz 1998; Sharma *et al.* 2001; Fickers *et al.* 2008). Les mammifères, les plantes, les levures, les actinomycètes et les bactéries sont tous de bons producteurs de ces biocatalyseurs. Par contre, les micro-organismes sont de bien meilleures sources de ces enzymes car ils produisent des lipases plus stables ayant des activités catalytiques variées (Sharma *et al.* 2001; Fickers *et al.* 2008).

Les enzymes lipolytiques ont toutes certaines caractéristiques en commun. D'abord, le repliement des chaînes peptidiques suit le modèle alpha/bêta. En somme, lorsque la protéine prend sa conformation tridimensionnelle, il est possible d'observer une alternance de feuillets β et d'hélices α (Figure 2.4). Malgré la disparité entre les

séquences des différentes enzymes faisant partie de la classe des hydrolases, la structure tridimensionnelle des protéases, des déhalogénases, des peroxidases et des époxyde hydrolase prend aussi cette forme (Ollis *et al.* 1992; Heikinheimo *et al.* 1999; Jaeger *et al.* 1999; Nardini *et al.* 2000; Pleiss *et al.* 2000). Les enzymes de ce groupe ont également des propriétés catalytiques semblables. En effet, le site catalytique est constitué de trois résidus : un acide aminé agissant à titre de nucléophile (typiquement une sérine, une cystéine ou un résidu aspartate), un acide carboxylique (résidu aspartate ou glutamate) et une histidine (Figure 2.4). Dans la séquence peptidique, ces acides aminés sont présentés dans l'ordre. De plus, chez les lipases, une sérine agit à titre de nucléophile. Certains résidus interagissent également afin de former une cavité appelée le trou de l'oxyanion, dont le rôle est de stabiliser la molécule intermédiaire au cours de la réaction d'hydrolyse (Heikinheimo *et al.* 1999; Jaeger *et al.* 1999; Nardini *et al.* 2000; Fickers *et al.* 2008). Les enzymes lipolytiques peuvent catalyser un bon nombre de réactions, justifiant l'intérêt grandissant des entreprises envers ces protéines. Par conséquent, plusieurs groupes de recherches se consacrent à l'identification de nouvelles enzymes. Le développement et le perfectionnement des techniques de métagénomique ont permis d'identifier un peu plus de 80 nouvelles enzymes lipolytiques (Schmeisser *et al.* 2007). Les prochaines sections mettront en revue les principales caractéristiques de ces enzymes et discuteront en détails des différents domaines d'applications.

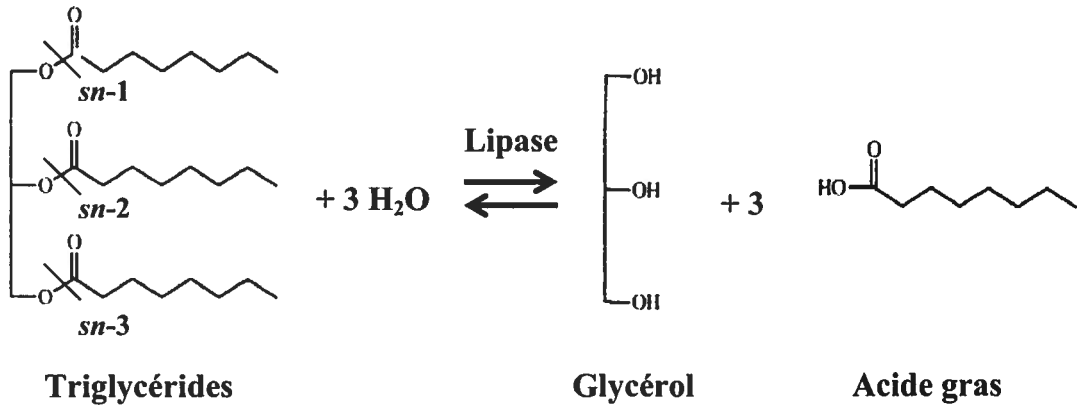


Figure 2.3 : Réaction d'hydrolyse des triglycérides effectuée par les enzymes lipolytiques.

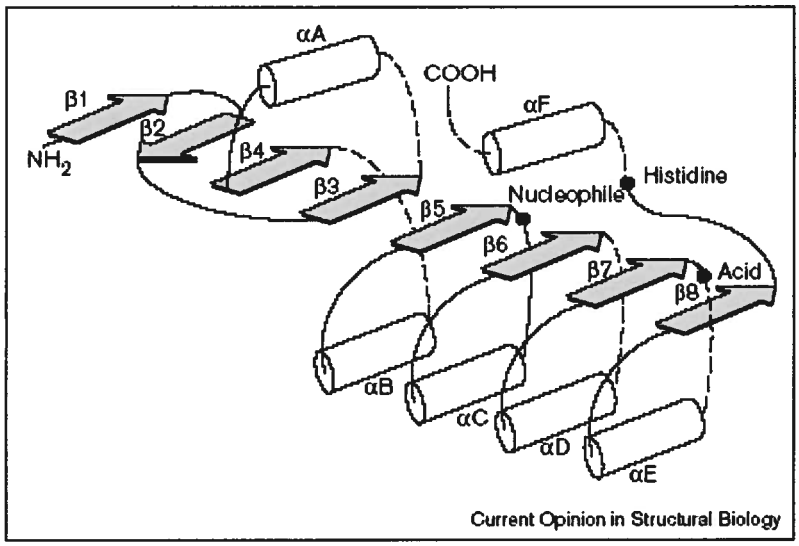


Figure 2.4 : Schéma du repliement α/β retrouvé chez un grand nombre d'enzymes possédant une triade catalytique composée d'un nucléophile (une sérine chez les lipases), un acide carboxylique (aspartate/glutamate) et une histidine. (Source : (Nardini *et al.* 2000))

2.3.2 Estérases versus lipases

Les enzymes lipolytiques sont parfois aussi appelées des lipases. Toutefois, les connaissances acquises sur ces enzymes ont démontré qu'il existait deux types d'enzymes lipolytiques : les estérases et les lipases « vraies ». Le mécanisme d'hydrolyse des triglycérides est le même pour ces deux types d'enzymes (Fojan *et al.* 2000). Par contre, la principale différence se situe au niveau de la nature du substrat à hydrolyser. En effet, les estérases ne peuvent hydrolyser que les triglycérides à courtes chaînes carbonées (2 à 6 ou 8 carbones). Ces substrats sont solubles en solution aqueuse. Au contraire, la gamme de substrats hydrolysés par les lipases est généralement plus variée et souvent, ces dernières démontrent une préférence pour les moyennes et les longues chaînes carbonées ($\geq$ 10 carbones). Ces substrats sont, à l'inverse des triglycérides à courtes chaînes carbonées, peu solubles en solutions aqueuses (Jaeger et Reetz 1998; Sharma *et al.* 2001; Fickers *et al.* 2008).

Une autre particularité des lipases est que ces enzymes possèdent davantage d'acides aminés hydrophobes dans leur séquence peptidique, notamment un nombre plus élevé de leucine, isoleucine, et valine situées près de la sérine du site actif (Fojan *et al.* 2000). Cette constatation va de paire avec la préférence pour les acides gras à longues chaînes carbonées, qui sont beaucoup plus hydrophobes. En effet, cette caractéristique de ces triglycérides fait en sorte qu'afin d'être clivés par l'enzyme, cette dernière doit être en mesure d'interagir avec son substrat. Cette interaction se fait ainsi par le biais des acides aminés hydrophobes.

Dans le même ordre d'idée, la majorité des lipases possède une région hydrophobe qui agit tel un volet recouvrant le site actif (Jaeger *et al.* 1994; Jaeger et Reetz 1998; Fojan *et al.* 2000; Fickers *et al.* 2008). Par conséquent, en solution aqueuse, les lipases se retrouvent en conformation inactive puisque la sérine du site actif est recouverte de cette région. Par contre, suite à l'ajout du substrat dans la solution, les triglycérides insolubles interagissent avec ce volet, modifiant ainsi la conformation de l'enzyme qui prend alors une forme active. Ce phénomène est appelé l'activation interfaciale et est absent chez les enzymes de types estérases. Cette activation à l'interface eau-lipide est également responsable de la cinétique de l'enzyme. En conséquence, la cinétique des lipases ne suit

pas le modèle Michaëlis-Menten puisque ce dernier n'est valide que pour les substrats solubles. Ainsi, il est possible de vérifier la nature d'une enzyme lipolytique en notant l'activité de la lipase en fonction de la concentration du substrat. En faible concentration du substrat, les lipases présentent peu d'activité. Au contraire, lorsque la concentration micellaire critique du substrat est atteinte, l'enzyme présente une augmentation drastique de l'activité puisque celle-ci est maximale à l'interface entre solution aqueuse et substrat insoluble (Figure 2.5) (Jaeger *et al.* 1994; Fojan *et al.* 2000; Fickers *et al.* 2008).

Aussi, au niveau de l'activité, il a souvent été observé que les estérases présentaient un pH optimal légèrement plus acide que les lipases (Fojan *et al.* 2000). Quelques différences au sein des séquences peptidiques ont également été observés et seront discutés dans la section sur les motifs conservés.

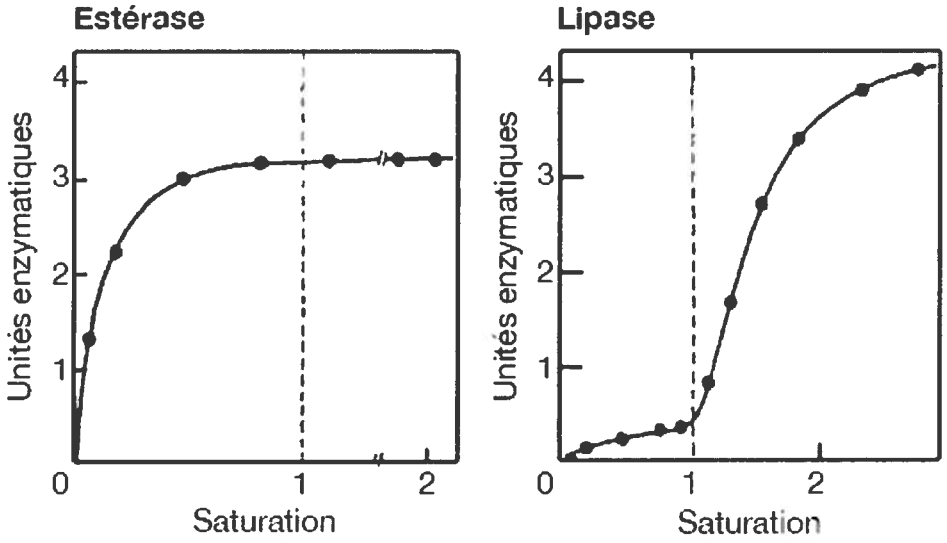


Figure 2.5 : Image tirée de Fickers *et al* (2008) démontrant le phénomène d'activation interfaciale des lipases par l'hydrolyse de la triacétine (C2 :0).

2.3.3 Motifs conservés

Afin d'être en mesure de reconnaître les enzymes lipolytiques, il est nécessaire d'effectuer des études comparatives de plusieurs séquences peptidiques. Certaines enzymes ne présentent que très peu d'homologie avec d'autres membres de la même classe. Toutefois, malgré cette grande diversité, ces recherches ont permis de faire ressortir certaines régions conservées (Jaeger *et al.* 1994). Le tableau 2.II résume plusieurs de ces courtes séquences, qui sont souvent impliquées dans l'activité catalytique.

Le motif le mieux conservé chez les enzymes lipolytiques est très certainement le pentapeptide GxSxG dans lequel la sérine correspond au site actif de la protéine. Le x représente n'importe quel acide aminé. Au sein de la séquence peptidique des carboxylestérases, le deuxième acide aminé est souvent une alanine. Également, chez plusieurs estérases, le premier acide aminé est un acide glutamique. Le pentapeptide devient alors GESAG. Une mutation ponctuelle de la sérine pourrait permettre de vérifier rapidement s'il s'agit bien du site actif de l'enzyme (Pleiss *et al.* 2000). Quoique la majorité des enzymes lipolytiques présentent ce motif, d'autres lipases divergent légèrement. Ainsi, la première glycine du pentapeptide est parfois remplacée par un autre résidu. Par exemple, le pentapeptide contenant le résidu nucléophile chez les lipases de *Bacillus* sp. est généralement AxSxG. Aussi, certaines lipases de *S. cerevisiae* et une de *C. antartica* possèdent le motif TxSxG (Fojan *et al.* 2000; Pleiss *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2001). D'autre part, en 1991, un consensus complètement différent a été mis en évidence et une nouvelle famille de lipase a été découverte (Hilton et Buckley 1991). En effet, alors que le pentapeptide GxSxG se trouve généralement près du centre de la séquence peptidique, un nouveau motif a été identifié dans le site N-terminal de l'enzyme. Celui-ci exhibait le consensus GDS(YL). Dès lors, plusieurs autres enzymes lipolytiques possédant le nucléophile entre l'acide aminé 10 et 16 de la protéine mature ont été identifiées (Upton et Buckley 1995; Tesch *et al.* 1996; Vujaklija *et al.* 2002; Côté et Shareck 2008).

Parfois, afin de distinguer une estérase d'une lipase, il est possible de faire d'autres observations au sein de la séquence peptidique. Si ces deux types d'enzymes

possèdent le motif GxSxG en commun, elles possèdent toutefois quelques différences dans la composition en acides aminés qui entoure ce site actif. Au sein de la banque de données ProSite, il a été établi que les estérases présentaient souvent une séquence ressemblant à celle-ci : F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G. Quant aux lipases, les acides aminés en amont du pentapeptide sont plus susceptibles de suivre le schéma suivant : [LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-x-G-[GSTAC] (Fojan *et al.* 2000). Plusieurs enzymes lipolytiques suivent effectivement ce modèle (Li *et al.* 1995; ServinGonzalez *et al.* 1997; Sinchaikul *et al.* 2001; Kleeberg *et al.* 2005).

La sérine du site catalytique n'est pas la seule région possédant un motif conservé au sein des enzymes lipolytiques. Le trou de l'oxyanion, qui permet la formation de liaisons hydrogène afin de stabiliser les intermédiaires réactionnels, possède également quelques caractéristiques spécifiques qui le rend possible à cibler dans une séquence peptidique (Fickers *et al.* 2008). L'équipe de recherche de Jurgen Pleiss (2000) s'est penchée sur la question et a établi que les enzymes lipolytiques se classaient selon deux types de signatures. D'abord, une glycine est toujours conservée dans cette région. Le premier groupe possède le motif Gx et le deuxième, le motif GGGx. Ces courtes séquences se trouvent dans la portion N-terminale de l'enzyme. Dans le premier cas, l'acide aminé suivant le résidu glycine peut être un T (Thr), S (Ser), R (Arg), F (Phe), W (Trp), L (Leu) ou M (Met) alors que dans le deuxième cas, il s'agit plus souvent d'un F (Phe), L (Leu), Y (Tyr) ou parfois M (Met) ou W (Trp). Le groupe de recherche a conclu que les enzymes possédant le motif Gx hydrolysaient de façon préférentielle les triglycérides à longues chaînes carbonées alors que celles qui possédaient le motif GGGx clivaient les acides gras à courtes chaînes. L'estérase Est25 identifiée lors du criblage d'une banque métagénomique possède effectivement le motif GGGx (Kim *et al.* 2006). Dans plusieurs cas également, se trouve une histidine conservée en amont de la glycine, à ne pas confondre avec l'histidine de la triade catalytique (Pleiss *et al.* 2000; Hardeman et Sjoling 2007). Toutefois, d'autres acides aminés, notamment, les résidus Arg (R), Pro (P), Asn (N), Met (M), Phe (F) et Tyr (Y) ont déjà été observés en amont de la glycine (Bell *et al.* 2002). D'autres études ont démontré que le trou de l'oxyanion se situait généralement entre 70 à 100 acides aminés en amont de la sérine du site actif (Kwoun Kim *et al.* 2004).

Tableau 2.II : Liste de quelques motifs conservés chez les enzymes lipolytiques.

Types de séquences	Motifs *	Description	Références
Trou de l'oxyanion	Gx	Glycine conservée dans le trou de l'oxyanion	(Soliman *et al.* 2007; Fickers *et al.* 2008)
	GGGx	Glycine conservée dans le trou de l'oxyanion	(Soliman *et al.* 2007; Fickers *et al.* 2008)
	HG	Histidine conservée en amont de la glycine	(Sullivan *et al.* 1999)
	[PNTSVL]-[VIF]-[VIFL]-[VIFLM]-[VLCAISQ]-H-G	Acides aminés hydrophobes en amont d'une séquence HG conservée au sein du trou de l'oxyanion	(Bell *et al.* 2002)
Sites catalytique (Ser-Asp/Glu-His)	Gx**S**xG	Pentapeptide conservé chez toutes les enzymes lipolytiques	ProSite
	Ax**S**xG	Pentapeptide des lipases de *Bacillus* sp.	(Soliman *et al.* 2007)
	Gx**S**AG	Pentapeptide chez les carboxylestérases; x = E chez plusieurs estérases	
	Tx**S**xG	Pentapeptide chez une lipase de *C. antartica*	(Pleiss *et al.* 2000)
	GD**S**(L)	Site catalytique en N-terminal chez la famille II	(Akoh *et al.* 2004)
	F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-**S**-[STAG]-G	Acides aminés retrouvés en amont du pentapeptide GxSxG chez les estérases	ProSite
	[LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-**S**-x-G-[GSTAC]	Acides aminés retrouvés en amont du pentapeptide GxSxG chez les lipases	ProSite
	[LIVMF]-X(2)-[LIVMF]-H-G-G-[SAG]-[FY]-x(3)-[STDN]-x(2)-[ST]-H	Acides aminés entourant l'histidine de la triade catalytique	ProSite, (Henne *et al.* 2000)
Site de liaison Ca^{2+}	GGxGxDxUx	Répétitions de séquences pour liaison du calcium	(Meier *et al.* 2007)

Également, certaines lipases possèdent des sites de liaison aux ions Ca^{2+}. Dans ce cas, un motif riche en glycine se trouve au sein de la séquence, non loin du peptide signal. Cette séquence, parfois répétée, suit le motif GGxGxDx(U)x (Tableau 2.II) où U représente un acide aminé hydrophobe. Ce motif a été retrouvé chez quelques enzymes lipolytiques (Meier *et al.* 2007; Kuwahara *et al.* 2008). Enfin, plusieurs autres résidus, tels que ceux faisant partie du volet couvrant le site actif, les ponts disulfures ainsi que d'autres résidus sont également importants pour déterminer la spécificité de l'enzyme, la flexibilité ou encore la stabilité de cette dernière (Nakano *et al.* 1998; Pleiss *et al.* 1998; Oh *et al.* 2001; Schmitt *et al.* 2002; Brocca *et al.* 2003; Montanucci *et al.* 2008). Toutefois, ces résidus ne sont pas strictement conservés au sein des lipases et par conséquent, il est plus difficile de les identifier.

2.3.4 Classification des lipases

Toutes les enzymes sont classées selon le type de réaction catalysée. Il existe au total 6 classes d'enzymes : les oxydoréductases (classe 1), les transférases (classe 2), les hydrolases (classe 3), les lyases (classe 4), les isomérases (classe 5) et les ligases (classe 6). Les lipases (triacylglycérol lipases) font partie de la classe EC 3.1.1.3. La sous-classe 1 inclue les enzymes agissant sur des liens esters et la seconde sous-classe 1, sur des liens carboxyl esters.

Par la suite, les lipases peuvent être classées selon différentes propriétés, permettant de les séparer en familles. La classification selon les propriétés biochimiques n'est pas toujours adéquate étant donné le nombre grandissant d'enzymes ajoutées aux banques de données chaque année. Il est donc plus avantageux de développer un système de classification en fonction de la séquence peptidique. Peu d'ouvrages scientifiques ont établi un système de classification des lipases car il demande qu'un grand nombre d'enzymes soient comparées entre elles afin d'établir des liens les unissant. En 1994, l'équipe de Karl-Erich Jaeger, travaillant essentiellement sur les lipases de *Pseudomonas* sp. a classé les enzymes lipolytiques en 4 groupes. Le 1er groupe, divisé lui-même en 2 sous-groupes, contenait les lipases de *Pseudomonas* sp. Le 1er sous-groupe incluait 2 enzymes de 270 à 285 acides aminés alors que le 2e sous-groupe incluait des enzymes de poids moléculaire légèrement plus élevé (~ 33 kDa). Le 2e groupe comprenait les lipases

de *Bacillus* sp. Quant à lui, le 3e groupe était composé, tel le premier groupe, d'enzymes de *Pseudomonas* sp. Toutefois, ces enzymes présentaient peu d'homologie à celles du groupe 1 et possédaient un poids moléculaire beaucoup plus élevé (~ 50 kDa). Enfin, le 4e groupe était composé de lipases de *Staphylococcus* sp (Jaeger *et al.* 1994). En comparant ces enzymes, elles ont ainsi été classées essentiellement selon la similarité entre les séquences peptidiques, selon l'espèce produisant ces enzymes et selon leur poids moléculaire.

Quelques années plus tard, en 1999, le même groupe de recherche a comparé les séquences de nombreuses lipases afin d'élargir le système de classification (Arpigny et Jaeger 1999). Les lipases ont alors été divisées en 8 familles. Ce système de classification est décrit dans le Tableau 2.III. D'abord, ces 8 familles sont comprises dans la super-famille des enzymes prenant la conformation α/β décrite précédemment. La famille I suit le système de classification décrit en 1994. Il comprend 6 sous-groupes. Les sous-groupes I.1 et I.2 sont les mêmes que décrits dans le précédent paragraphe. Également, les lipases de ces 2 groupes se distinguent du fait qu'elles suivent la voie de sécrétion de type II et qu'elles nécessitent des chaperonnes moléculaires afin d'être sécrétées correctement (Jaeger *et al.* 1999). Le sous-groupe I.3 est équivalent au groupe 3 décrit ci haut, comprenant les lipases de *Pseudomonas* sp. de haut poids moléculaire (50-65 kDa). Également, ces lipases suivent la voie de sécrétion de type I (Angkawidjaja et Kanaya 2006). Le sous-groupe I.4 comprend les lipases de *Bacillus* sp. de faible poids moléculaire avec le motif Ax<u>S</u>xG conservé. Le sous-groupe I.5 contient des lipases provenant également de bactéries Gram positives telles que *Geobacillus* sp. mais aussi certaines lipases de *Staphylococcus* sp. de haut poids moléculaire. Le dernier sous-groupe de cette famille inclut des lipases de *Streptomyces* et *Propionobacterium acnes*. La famille II comprend toutes les enzymes lipolytiques présentant le motif GD<u>S</u>(L) en N-terminal. Quant à la famille III, elle comprend des lipases de *Streptomyces exfoliatus* (M11) présentant peu d'homologie avec les lipases de la famille I.6. De plus, la famille IV est aussi appelée « famille des HSL » et comprend les enzymes homologues à l'hormone sensitive lipase des mammifères, qui présente souvent un motif Gx<u>S</u>AG et la séquence HGGG au sein du trou de l'oxyanion (Jaeger *et al.* 1999). La famille V est particulière du fait que les enzymes lipolytiques de cette famille présentent de

l'homologie avec des hydrolases autres que les lipases. Enfin, les familles VI et VII sont composées essentiellement d'enzymes de types estérases et la famille VIII est composée d'enzymes qui présentent le pentapeptide GxSxG mais ne présentent pas la triade catalytique Ser-Asp-His (Tableau 2.III) (Arpigny et Jaeger 1999).

Depuis la publication de Arpigny et Jaeger (1999), plusieurs scientifiques se sont basés sur ce système afin de classer les enzymes lipolytiques étudiées. De nouvelles lipases ont donc été ajoutées aux différentes familles. Quelques exemples incluent la classification dans la famille I.5 de deux nouvelles lipases thermophiles de *Geobacillus thermocatenulatus* (Carrasco-Lopez *et al.* 2009). Une autre enzyme de *Bacillus* sp. BP-6 a été classée dans la famille I.4 (Ruiz *et al.* 2003). Également, une estérase d'*Helicobacter pylori* a été classée dans la famille V (Ruiz *et al.* 2007). De plus, cette même famille s'est vue ajoutée une enzyme thermophile en provenance d'une banque métagénomique (Tirawongsaroj *et al.* 2008). Les recherches en métagénomique ont également permis l'ajout à la liste d'une estérase présentant le motif SXXL dans la famille VIII des enzymes lipolytiques (Elend *et al.* 2006). De nouvelles lipases de la famille II contenant le motif en N-terminal GDS(L) ont également été caractérisées (Vujaklija *et al.* 2002; Côté et Shareck 2008). Enfin, les lipases de *Pseudomonas* sp. font encore aujourd'hui l'objet de plusieurs recherches et de nouvelles enzymes ont ainsi été ajoutées à la liste d'enzymes appartenant aux familles I.2 et I.3 (Litthauer *et al.* 2002; Angkawidjaja et Kanaya 2006; Kuwahara *et al.* 2008).

Toutefois, il se pourrait que ce système de classification devienne insuffisant afin de classer les nouvelles enzymes trouvées chaque année. En effet, avec le développement des techniques permettant l'étude de micro-organismes non cultivables, il n'est pas rare d'identifier des séquences qui ne semblent appartenir à aucune famille connue (Kwoun Kim *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008). À titre d'exemple, en 2004, une équipe de recherche a identifié de nouvelles lipases en amplifiant des régions conservées de ces enzymes. En conséquence, plusieurs de ces enzymes lipolytiques ont été identifiées, mais plus de la moitié d'entre elles ne s'apparentaient à aucune des 8 familles connues (Kwoun Kim *et al.* 2004). Plus récemment, en 2008, de l'ADN provenant des sédiments de la zone intertidale de régions côtières en Korée a permis l'isolement de gènes nouveaux codant pour des enzymes lipolytiques (Kim *et al.* 2008). Des études

phylogénétiques ont été effectuées afin de comparer l'enzyme avec des représentants de chacune des familles mais les résultats ont démontré qu'il s'agissait plutôt d'une lipase appartenant à une nouvelle famille. Avec le temps, de nouvelles familles seront identifiées et les connaissances sur les enzymes lipolytiques prendront de l'essor à mesure que de nouvelles lipases seront identifiées et caractérisées.

Tableau 2.III : Système de classification des familles d'enzymes lipolytiques établi par Arpigny et Jaeger, 1999

Familles	Sous-familles	Particularités
I	1	Lipases nécessitant une chaperonne; sécrétion de type II; poids moléculaire 30-32 kDa
	2	Lipases nécessitant une chaperonne; sécrétion de type II; poids moléculaire 33 kDa
	3	Lipases de *Pseudomonas* sp.; sécrétion de type I; poids moléculaire 50-65 kDa
	4	Lipases de *Bacillus* sp.; pentapeptide AxSxG; poids moléculaire 20 kDa
	5	Lipases de *Geobacillus* sp. et *Staphylococcus* sp.; poids moléculaire 40-65 kDa (bactéries Gram-positives)
	6	Lipases de *Streptomyces* sp. et *Propionobacterium* sp.
II (GDSL)		Lipases de type GDSL; site actif en N-terminal; 5 régions conservées (I à V)
III		Homologie élevée entre 2 lipases de *Streptomyces* sp. et *Moraxella* sp.
IV (HSL)		Famille des HSL (*Hormone sensitive lipase*); pentapeptide GDSAG pour le site actif et HGGG en amont
V		Présence de triade catalytique et repliement α/β; similarités avec déhalogénases, haloperoxidases et epoxide hydrolases
VI		Estérases; poids moléculaire 23-26 kDa
VII		Estérases; poids moléculaire ~ 55 kDa
VIII		Pentapeptide conservé GxSxG mais absence de triade catalytique Ser-Asp-His; motif particulier SxxL en N-terminal

2.3.5 Effet de différents composés sur l'activité et la stabilité

Lorsque de nouvelles enzymes lipolytiques sont identifiées, elles doivent être caractérisées afin de déterminer leur température optimale, leur substrat préférentiel (courtes ou longues chaînes carbonées) et leur pH optimal. Également, plusieurs composés sont testés afin de vérifier si leur présence stimule ou inhibe l'activité enzymatique. Parmi ces composés, il y a différents cations, des inhibiteurs connus tels que le DTT et le PMSF, des solvants et des détergents. Ces expérimentations sont utiles afin de fournir de précieuses informations sur la structure et l'activité des enzymes, pouvant ainsi par la suite établir leur potentiel en tant que biocatalyseur industriel.

D'ordre général, les enzymes lipolytiques ne requièrent pas de cofacteurs pour le clivage du substrat. Toutefois, un certain nombre de lipases ont démontré la présence de sites de liaison au ions Ca^{2+} ou Zn^{2+} (Kim *et al.* 1997; Nardini *et al.* 2000; Sinchaikul *et al.* 2001; Snellman *et al.* 2002; Chen *et al.* 2007; Salameh et Wiegel 2007; Kuwahara *et al.* 2008; Carrasco-Lopez *et al.* 2009). Ces sites peuvent servir à stabiliser la triade catalytique et par le fait même, peuvent prendre part, dans certains cas, à l'activité enzymatique. Dans le cas où le calcium est présent mais ne démontre aucune stimulation de l'activité, il est pensé qu'il joue un rôle structurel uniquement. Ainsi, certaines publications stipulent que les lipases caractérisées ne présentaient aucune baisse ni augmentation de l'activité en présence de calcium alors que d'autres lipases voient leur activité stimulée en présence de cet ion (Chich *et al.* 1997; Sharma *et al.* 2002; Bora et Kalita 2007). Afin de vérifier si le calcium est essentiel à l'activité enzymatique, il suffit d'incuber l'enzyme en présence de l'agent chélateur EDTA. Dans le cas où la protéine est une métallo-enzyme, cette dernière sera inhibée en présence d'EDTA car elle ne pourra plus lier les ions calcium. Il arrive également que l'activité d'une lipase soit stimulée par la présence de calcium sans toutefois qu'elle soit inhibée par l'EDTA.

D'un autre côté, l'effet du $HgCl_2$ est souvent vérifié. Le chlorure de mercure est utilisé afin d'examiner le rôle des groupements thiols (SH) et ainsi déterminer s'ils sont essentiels à l'activité enzymatique. Plusieurs lipases ont démontré une baisse d'activité après avoir été incubées en présence de ce composé (Chich *et al.* 1997; Choo *et al.* 1998; Abramic *et al.* 1999; Kademi *et al.* 2000; Snellman *et al.* 2002; Ruiz *et al.* 2003). Dans le

même ordre d'idée, le DTT (dithiothréitol) permet de recueillir de l'information sur le rôle des ponts disulfures (S—S) car ces derniers sont réduits par l'action de ce composé. Généralement, les ponts disulfures formés entre 2 résidus cystéine jouent un rôle structurel, permettant à l'enzyme de stabiliser sa conformation tridimensionnelle. Les ponts disulfures apportent par conséquent une certaine rigidité à cette conformation comparativement aux lipases ne possédant pas de telles liaisons (Li *et al.* 1995). Également, certaines études ont démontré que la réduction des liens S—S ou la mutation d'une cystéine empêchant la formation des liaisons pouvaient modifier la structure de l'enzyme, ayant pour conséquence une baisse de la sécrétion de cette dernière (Liebeton *et al.* 2001). Les ponts disulfures peuvent se situer au cœur de la protéine ou encore à la surface. Ainsi, il se peut que l'activité lipolytique ne soit pas inhibée par le DTT, soit parce que les ponts disulfures ne sont pas essentiels à l'activité enzymatique, ou parce que ces derniers ne sont pas accessibles pour la réduction. Dans ce cas, l'ajout d'un agent déstabilisateur, tel que le SDS ou un autre détergent, peut modifier la structure, rendant accessible les liens S—S et menant à l'inhibition de l'activité enzymatique (Jaeger *et al.* 1993; Liebeton *et al.* 2001).

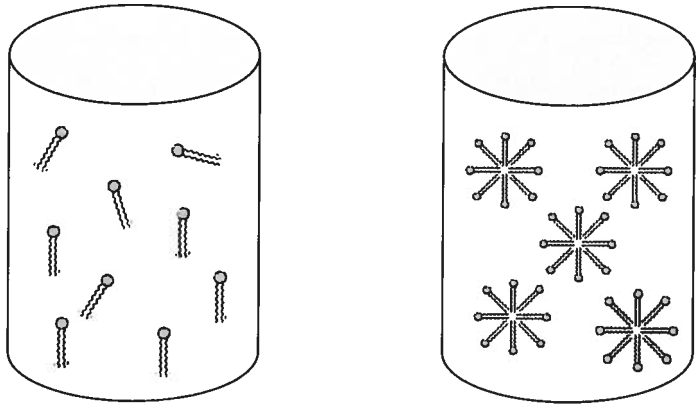
Le PMSF est également un inhibiteur connu des lipases. Son mécanisme d'action se traduit par la formation d'une liaison covalente avec la sérine du site catalytique, inhibant toute activité d'hydrolyse. Ainsi, expérimenter l'effet du PMSF sur l'activité lipolytique permet d'une part d'établir la position du nucléophile dans la séquence peptidique et d'autre part de démontrer la présence ou l'absence d'une région hydrophobe couvrant le site actif, caractéristique des lipases vraies (Salameh et Wiegel 2007). Par conséquent, les enzymes lipolytiques qui sont inhibées suite à une période d'incubation en présence de PMSF sont fréquemment des estérases préférant les substrats à moyennes et courtes chaînes carbonées (Kademi *et al.* 2000; Sinchaikul *et al.* 2001; Ruiz *et al.* 2003). Au contraire, un grand nombre de lipases vraies qui présentent une activation interfaciale et une préférence pour les longues chaînes carbonées ne sont que faiblement inhibées par le PMSF (Abramic *et al.* 1999; Litthauer *et al.* 2002; Snellman *et al.* 2002; Côté et Shareck 2008). Par contre, ces lipases peuvent démontrer un certain niveau d'inhibition attribuable à un équilibre entre la conformation active et inactive de l'enzyme (Bendikiene *et al.* 2005). Ces enzymes ont démontré une inactivation presque complète

dans le cas ou l'inhibiteur a été ajouté pendant la réaction car c'est à cet instant que le volet hydrophobe est déplacé afin de rendre accessible le site catalytique pour le substrat et par le fait même, pour le PMSF (Abramic *et al.* 1999; Salameh et Wiegel 2007).

L'effet des solvants organiques sur l'activité lipolytique est également étudié chez des nombreuses lipases. En effet, puisque plusieurs applications industrielles nécessitent la présence de solvant, il importe que ces enzymes soient stables et actives dans ces conditions (Gotor 2000; Sharma *et al.* 2001). Or, les lipases microbiennes sont reconnues pour leur grande stabilité en présence de solvants (Choo *et al.* 1998; Snellman *et al.* 2002). Ces derniers améliorent la solubilisation des matières grasses à hydrolyser. Également, ils peuvent influencer la liaison du substrat au sein du site actif en favorisant la conformation active de l'enzyme (Choo *et al.* 1998; Maruyama *et al.* 2000; Matsumoto *et al.* 2001).

En dernier lieu sera discuté l'effet des détergents sur l'activité lipolytique. En considérant l'importance accordée aux lipases dans les produits nettoyants, il devient dès lors intéressant d'étudier ces agents tensioactifs sur l'activité. Les détergents possèdent des propriétés semblables aux triglycérides. En effet, une molécule de détergent est composée d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. En faible concentration, les molécules se présentent sous forme de monomères. Par contre, à la concentration micellaire critique, les molécules s'agencent afin de former des micelles (Figure 2.6). Ces caractéristiques sont idéales afin d'étudier l'activation interfaciale des lipases (Mogensen *et al.* 2005). Également, ces ressemblances avec les substrats naturels permettent, dans certains cas, que quelques détergents, tels le Tween 20 ou le Tween 80, soient clivés par des enzymes lipolytiques (Plou *et al.* 1998; Bendikiene *et al.* 2007). La concentration micellaire critique (CMC) est différente pour chaque détergent. Ainsi, les CMC du Tween 80, Triton X-100 et SDS sont respectivement de 0.0013 %, 0.019 % et 0.236 %. Alors que certaines lipases voient leur activité stimulée en présence de détergents (Helisto et Korpela 1998; Rashid *et al.* 2001; dos Prazeres *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007), d'autres enzymes présentent une baisse d'activité (Sinchaikul *et al.* 2001). L'interaction entre les molécules de détergents et les lipases est complexe. Par conséquent, l'effet activateur ou inhibiteur dépend des propriétés du détergent (hydrophobicité, CMC et concentration lors de l'expérimentation), du substrat, de la

structure de l'enzyme et de la présence ou non d'un volet hydrophobe permettant une activation interfaciale (Kato *et al.* 1997; Helisto et Korpela 1998). De façon générale, l'interaction entre la molécule de détergent et l'enzyme se fait par le biais d'interactions hydrophobes. Dans certains cas, les monomères de détergents provoquent un changement de conformation de l'enzyme, lui permettant de prendre la forme active. Dans d'autres cas, des concentrations trop élevées de détergents peuvent modifier la conformation de sorte que la lipase ne puisse interagir avec son substrat (Jaeger *et al.* 1993). Le détergent peut également interagir avec le substrat. Chaque substrat possède une constante d'affinité pour un détergent donné. Certains substrats à longues chaînes carbonées peuvent modifier la CMC de l'agent tensioactif (Mogensen *et al.* 2005).



Monomères de détergent solubles en dessous de la CMC

Arrangement des molécules de détergent à la CMC

Figure 2.6 : Arrangement des molécules d'agents tensioactifs lorsque la concentration micellaire critique est atteinte.

2.4 Intérêt industriel des lipases

2.4.1 Les domaines d'applications

Les lipases représentent le 3e groupe le plus important d'enzymes d'intérêt industriel. La présente section vise à mettre en revue les domaines dans lesquels ces enzymes sont utilisées (Tableau 2.IV). D'abord, les lipases peuvent catalyser des réactions d'hydrolyse afin de dégrader les triglycérides. Toutefois, elles ont également la capacité de catalyser des réactions de synthèse en présence de solvants, notamment par le biais de réactions d'estérification, d'interestérification et de transestérification, ce qui les rend d'autant plus attrayantes pour plusieurs applications industrielles (Jaeger *et al.* 1994; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008).

En premier lieu, les enzymes lipolytiques sont utilisées pour la fabrication de détergents. Tout comme les protéases et amylases, un pourcentage élevé, soit un peu plus de 30 % des lipases sont utilisées dans ce domaine (Sharma *et al.* 2001). De multiples caractéristiques sont requises afin qu'une enzyme soit considérée comme bonne candidate. Entre autres, la lipase doit être stable dans la formulation qui contient souvent des surfactants ainsi que des agents adoucissants et oxydants. Également, les enzymes doivent présenter une bonne thermostabilité et l'habilité à dégrader les acides gras en conditions alcalines (Jaeger et Reetz 1998; Hasan *et al.* 2006). Dans les détergents, les lipases sont utilisées pour leur fonction d'hydrolyse, afin de dégrader les acides gras qui composent les soupes, les sauces, les huiles végétales et animales, le chocolat ou encore les taches de cosmétiques. Les produits détersifs contenant des lipases sont également utilisés pour déboucher la tuyauterie ou nettoyer des verres de contacts (Pandey *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2001).

Les réactions d'hydrolyse sont également recherchées dans d'autres domaines d'application, essentiellement dans le traitement des pâtes et papiers et des effluents ou encore l'industrie du textile/cuir. Premièrement, les constituantes du mélange de pâtes et papiers sont souvent composées de résidus hydrophobes en provenance du bois, qui doivent être éliminés. La dégradation des triglycérides rend les composantes plus solubles et par conséquent, facilite leur élimination. Ces procédés sont tellement efficaces que dans quelques cas, l'efficacité a été établie à 90 % (Jaeger *et al.* 1994;

Sharma *et al.* 2001; Hasan *et al.* 2006). Ensuite, les procédés industriels génèrent des effluents qui doivent être traités avant leur rejet dans l'environnement. Ces effluents contiennent plusieurs substances pouvant être dégradées par des enzymes lipolytiques, telles que des hydrocarbures ou des huiles en provenance d'entreprises de restaurations. De façon générale, la biorestauration est effectuée par un consortium bactérien. Toutefois, un pré-traitement enzymatique permet de faciliter la dégradation des déchets organique par cette biomasse (Pandey *et al.* 1999; Ahuja *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008). Quant à l'industrie du textile, les peaux animales contiennent souvent des matières grasses qui sont généralement éliminées en présence de solvants organiques ou d'un traitement fortement alcalin. L'utilisation d'enzymes lipolytiques constitue une alternative afin de réduire l'utilisation des produits nocifs pour l'environnement. De plus, elle rend les tissus plus souples et permet d'améliorer les étapes subséquentes de teinture du vêtement (Ahuja *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008).

Dans l'industrie alimentaire, les applications sont nombreuses. Les fonctions d'hydrolyse et de synthèse sont toutes les deux exploitées. D'abord, les propriétés des lipides dans l'alimentation peuvent être modifiées par les lipases. Par exemple, dans le beurre de cacao, il est possible de remplacer l'acide palmitique par l'acide stéarique par une réaction de transestérification (Jaeger *et al.* 1994; Jaeger et Reetz 1998; Sharma *et al.* 2001). L'interestérification peut également avoir lieu grâce aux lipases afin de synthétiser des huiles commerciales ou de la margarine (Fickers *et al.* 2008). D'un autre côté, tous les procédés de fermentation effectués par des micro-organismes nécessitent la sécrétion d'enzymes, incluant des lipases. Ces enzymes dégradent les triglycérides afin de former des acides gras volatils qui permettent le développement d'arômes et de saveurs dans les fromages, le vin, les saucissons ou le thé noir (Jaeger *et al.* 1994; Pandey *et al.* 1999; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008).

Tableau 2.IV : Aperçu global des secteurs dans lesquels les enzymes lipolytiques sont utilisées.

Industries	Exemples d'applications
Agro-alimentaire	• Développement de saveurs dans les fromages • Transformation/production d'huiles et matières grasses • Fermentation (saucissons, thé noir, etc.)
Pharmaceutique et biomédical	• Productions d'énantiomères spécifiques • Biomarqueurs/indicateurs pour diagnostiquer certaines maladies • Aide à la digestion • Médicaments pour baisser le taux de cholestérol sanguin
Produits nettoyants	• Détergents pour éliminer les dépôts graisseux sur le linge et dans les tuyaux • Transformation d'acides gras pour la production de savon
Environnement	• Traitement des eaux usées • Production de biopolymères
Pâtes et Papiers	• Améliorer le blanchissement du papier
Cosmétiques	• Synthèse d'émollient pour des crèmes et huiles de bains
Industrie du textile	• Dégraissage de peaux animales • Modification de fibres synthétiques
Automobile	• Transestérification d'huiles végétales pour la production de biocarburants tel que le biodiesel

Tout comme dans l'alimentation, les lipases peuvent permettre le développement de fragrances dans les parfums par des réactions d'estérification et de transestérification (Pandey *et al.* 1999). Également, un certain nombre d'ingrédients présents dans plusieurs produits cosmétiques sont synthétisés par des lipases. Les acides gras synthétisés agissent en tant qu'émollient dans les produits pour le soin de la peau. La synthèse par la voie enzymatique génère des produits de meilleures qualités (Jaeger et Eggert 2002; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008).

Les lipases ont également trouvé plusieurs voies d'application dans le secteur biomédical (Kirk *et al.* 2002; Hasan *et al.* 2006; Fickers *et al.* 2008). En effet, ces enzymes peuvent agir à titre de biomarqueur. Par exemple, plusieurs micro-organismes produisent des enzymes lipolytiques agissant à titre de facteur de pathogénicité. Le dosage de ces enzymes en provenance de pathogènes tels que *Propionobacterium acnes*, *Vibrio cholerae* ou encore *Clostridium botulinum* permet alors d'établir un lien entre le micro-organisme et une maladie ou intoxication. Également, le taux de triglycérides sanguin peut être évalué en effectuant une réaction d'hydrolyse à l'aide de lipases sur un échantillon de sérum. Par la suite, le glycérol libéré est dosé par des méthodes colorimétriques (Pandey *et al.* 1999; Hasan *et al.* 2006). Une autre utilité des lipases en biopharmaceutique est la synthèse de médicaments. Il n'est pas rare que la synthèse chimique de molécules à effet thérapeutique mène à la production d'un mélange racémique, où un seul énantiomère possède l'effet désiré. Or, la grande spécificité des lipases a permis dans certains cas la production de la molécule ciblée (Pandey *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2001; Jaeger et Eggert 2002; Hasan *et al.* 2006).

Enfin, la grande versatilité de ce groupe d'enzymes a soulevé un intérêt particulier parmi les producteurs de biodiesel, ce carburant produit à partir de ressources renouvelables. La production de ce biocarburant se fait par l'intermédiaire de transestérification d'huiles végétales en présence, dans bien des cas, de méthanol ou d'éthanol (Jaeger et Eggert 2002; Ahuja *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006). Le potentiel des lipases dans ce secteur d'application a mené de nombreux chercheurs dans l'étude de la production de biodiesel à l'aide de lipases immobilisées (Park *et al.* 2006; Ognjanovic *et al.* 2008).

2.4.2 L'immobilisation des lipases

L'immobilisation consiste en l'attachement de protéines sur un support solide. Cette pratique est de plus en plus courante dans diverses applications industrielles (Alloue *et al.* 2008). Parmi les facteurs limitants des réactions enzymatiques se trouvent le coût de production des enzymes et leur stabilité dans les conditions de réactions (solvants, températures élevées, pH extrêmes). Également, en solution, les enzymes sont mélangées au produit de la réaction, ce qui engendre des étapes supplémentaires afin de séparer le produit de l'enzyme et qui mène souvent à la perte de cette dernière. Par conséquent, les avantages principaux justifiant l'immobilisation des lipases est l'augmentation résultante de la stabilité et la réutilisation possible de l'enzyme qui est également plus facile à récupérer et à séparer du produit réactionnel (Fernandez-Lafuente *et al.* 1998; Jaeger et Reetz 1998; Sharma *et al.* 2001; Christensen *et al.* 2003; Novick et Rozzwell 2005; Lee *et al.* 2006; Alloue *et al.* 2008).

Une fois immobilisées, les lipases doivent être évaluées au niveau de leur activité (synthèse et hydrolyse d'acides gras), la quantité de protéines fixées à la matrice et leur stabilité. Un bon nombre de résultats de recherches publiés sur l'immobilisation de lipases ont démontré une amélioration globale de la stabilité de l'enzyme, soit en présence de solvants ou encore à des températures élevées (Castro *et al.* 2000; Hotta *et al.* 2002; Dai et Xia 2006; Long *et al.* 2007; Brigida *et al.* 2008; Costas *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). De plus, l'adoption de cette technique peut également modifier les paramètres d'activité de l'enzyme. Plusieurs lipases immobilisées ont démontré une activité spécifique et parfois même, une température optimale d'activité plus élevées. Les lipases peuvent également cliver le substrat de façon régiosélective grâce à l'immobilisation. Aussi, certains composés comme le $HgCl_2$ ont vu leur effet inhibiteur aboli suite à l'immobilisation d'enzymes lipolytiques (Fernandez-Lafuente *et al.* 1998; Jaeger et Reetz 1998; Castro *et al.* 2000; Dai et Xia 2006; Alloue *et al.* 2008).

Il existe plusieurs méthodes permettant l'immobilisation des lipases, parmi lesquelles l'adsorption et l'attachement par covalence sont les plus utilisées. L'adsorption est certainement la méthode la plus simple et la plus économique (Christensen *et al.* 2003). Dans ce cas, l'enzyme se lie à la matrice par le biais d'interactions hydrophobes et

ioniques, de liens hydrogène et de forces de Van der Waals (Alloue *et al.* 2008; Brigida *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2008). Les supports à caractères hydrophobes sont souvent choisis étant donné le nombre relativement élevé de résidus hydrophobes au sein des séquences peptidiques, renforçant les liaisons avec la matrice. Il est pensé que l'interaction entre l'enzyme et le support s'effectue au niveau du volet hydrophobe qui couvre normalement le site actif des lipases. La fixation de l'enzyme sur le support mimerait le phénomène d'activation interfaciale et par conséquent, induirait la conformation active de l'enzyme, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'activité. Cette caractéristique est avantageuse surtout dans le cas où la réaction enzymatique doit être effectuée dans un système en présence de solvants (Fernandez-Lafuente *et al.* 1998; Jaeger et Reetz 1998; Blanco *et al.* 2004; Foresti *et al.* 2005; Nawani *et al.* 2006). L'inconvénient majeur de l'immobilisation par adsorption est le lessivage de l'enzyme, qui est principalement causé par la faiblesse des interactions entre la matrice et la lipase. Pour cette raison, une deuxième méthode d'immobilisation peut être choisie comme alternative afin de pallier à ce problème. Cette méthode implique la formation de liaisons covalentes qui consolident les liens entre la matrice et l'enzyme, qui subit donc moins de désorption avec le temps (Jaeger et Reetz 1998; Christensen *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006). Afin de former une liaison covalente entre un support et une enzyme, plusieurs agents couplant peuvent être utilisés. Pour ce faire, le glutaraldéhyde est souvent utilisé à des concentrations variables. Une fois fixé sur la matrice, les groupements aldéhydes de l'agent peuvent entre autres réagir avec différents groupements fonctionnels de l'enzyme (NH_2, CO_2H, SH, etc.) présents dans les résidus lysine, tyrosine ou histidine, résultant en une liaison covalente (Figure 2.8) (Molin *et al.* 1978; Betancor *et al.* 2006). Par contre, cet agent couplant possède aussi des inconvénients car il peut être toxique pour les enzymes en modifiant la conformation de ces dernières, entraînant la dénaturation et subséquemment la perte ou baisse d'activité (Alloue *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). Afin de réduire la toxicité, il est possible de chauffer le glutaraldéhyde préalablement au traitement de la matrice et à l'immobilisation de l'enzyme (Lee *et al.* 2006).

Une multitude de matrices ont été utilisées afin d'immobiliser les enzymes lipolytiques, que ce soit par adsorption, liaison covalente ou autres méthodes d'immobilisation. Les supports peuvent être de nature organique ou inorganique et

peuvent être d'origines synthétiques (ex. : polystyrène) ou naturelles (ex. : cellulose, alginate) (Talukder *et al.* 2007; Brigida *et al.* 2008). Le coût, la porosité, la toxicité, la résistance aux micro-organismes et à la chaleur sont tous des facteurs à considérer lors du choix du support (Blanco *et al.* 2004; Dai et Xia 2006; Yang *et al.* 2009). D'une part, la quantité de lipases immobilisées est influencée par la taille de ces dernières et le diamètre des pores de la matrice ainsi que l'aire de surface disponible. La porosité influence également l'accès des substrats à longues chaînes carbonées. D'un autre côté, les supports inorganiques (ex. : gels de silice, diatomite) présentent un coût raisonnable comparativement aux supports organiques, ce qui dirige très souvent le choix vers ce type de support (Christensen *et al.* 2003; Alloue *et al.* 2008). La diatomite est une matière d'origine sédimentaire composée essentiellement de squelettes d'algues microscopiques. Les squelettes sont eux-mêmes composés à environ 86 % de silice (SiO_2*nH_2O). Étant donné leur source naturelle, le diamètre des constituantes de cette matrice peut varier grandement, soit entre 0.75 μm à 1500 μm. La diatomite constitue ainsi un support à la fois biologique, léger, rigide, possédant une bonne absorbance et une forte porosité (Lazutkina *et al.* 2006; Bahramian *et al.* 2008). Tous les supports inorganiques doivent par contre subir une étape de fonctionnalisation avant l'immobilisation. En effet, les enzymes (matières organiques) ne peuvent réagir avec la terre de diatomée (matière inorganique). Ainsi, l'activation de ces supports se fait à l'aide d'agents de silanisation (ex. : 3-aminopropyltriméthoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane, etc.) qui ont pour rôle de faire le pont entre la matière inorganique et la matière organique. Ces agents peuvent ajouter des groupements NH_2 qui eux, pourront se lier par adsorption aux groupements présents sur les enzymes (Figure 2.7). Plusieurs enzymes lipolytiques ont également été immobilisées sur des gels de silice (Rao *et al.* 2000; Lee *et al.* 2006; Nawani *et al.* 2006; Park *et al.* 2006). Ces derniers peuvent être vendus commercialement déjà activés par un agent de silanisation. Par la suite, il est possible de les traiter avec la glutaraldéhyde, tel que mentionné précédemment, afin de permettre la liaison covalente entre l'enzyme et la matrice (Figure 2.8).

Le taux d'immobilisation peut être affecté par plusieurs facteurs, incluant le type de support utilisé jusqu'au protocole dans ses moindres détails. En ce qui concerne le type de support, les propriétés physiques, incluant porosité et la surface de contact de ce

dernier influencent l'immobilisation. Au niveau du protocole, le pH, la concentration de l'enzyme, la nature du support, la température, le tampon et la quantité de sels sont tous des facteurs pouvant influencer le rendement (Alloue *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2008). Quoique de façon générale, l'activité et la stabilité des lipases immobilisées soient supérieures à celles des enzymes non immobilisées, il est important de noter que l'activité peut être abolie si l'interaction entre l'enzyme et la matrice se produit près du site actif, empêchant ainsi l'accès au substrat ou provoquant un changement de conformation menant à une inactivation de l'enzyme (Fernandez-Lafuente *et al.* 1998; Novick et Rozzwell 2005; Lee *et al.* 2006; Yang *et al.* 2009). Il est également impossible de prévoir la façon dont l'enzyme se liera à la matrice, obligeant l'optimisation et l'adaptation d'un protocole pour chaque lipase étudiée.

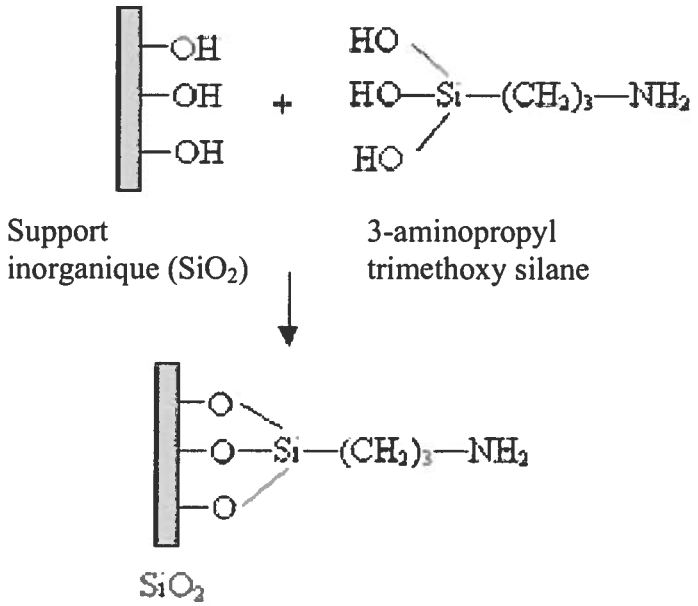


Figure 2.7 : Activation chimique d'un support de silice par un agent de silanisation afin d'ajouter un groupement aminopropyle - $(CH_2)_3 - NH_2$.

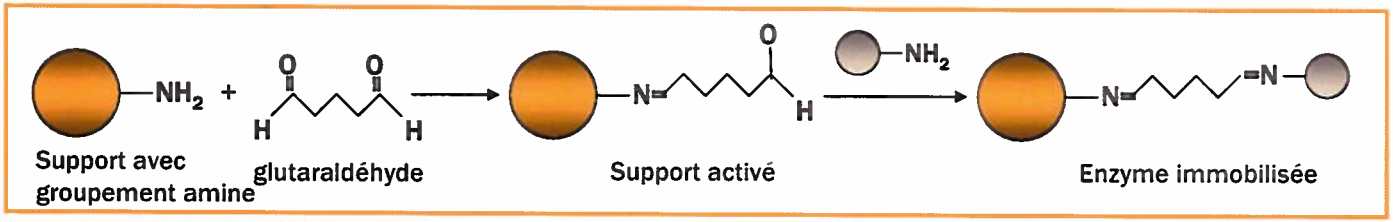


Figure 2.8 : Processus d'immobilisation par liaison covalente avec l'agent couplant glutaraldéhyde.

2.4.3 Les extrémophiles

La thermostabilité est l'un des principaux facteurs qui limitent l'utilisation des enzymes pour les diverses applications industrielles. En effet, plusieurs procédés sont effectués à hautes températures (Demirjian *et al.* 2001; Hasan *et al.* 2006). Les deux principales raisons justifiant ce choix sont l'augmentation de la solubilité et donc, par le fait même, de la disponibilité de multiples substrats, et la diminution du risque de contamination par des micro-organismes au dessus de 60°C (Niehaus *et al.* 1999; Haki et Rakshit 2003; van den Burg 2003). Or, la majorité des enzymes utilisées proviennent de bactéries mésophiles. Par conséquent, quoique certaines enzymes provenant de ces micro-organismes puissent être stables et actives dans des conditions variées, plusieurs d'entre elles sont inaptes à catalyser leur substrat dans des conditions telles que des températures élevées, des pH extrêmes ou encore des concentrations inhabituellement élevées en solvants organiques (Demirjian *et al.* 2001; van den Burg 2003; Ahuja *et al.* 2004; Palomo *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006). Cette nécessité de procéder à des températures élevées a donc mené à la recherche de nouvelles enzymes qui répondraient aux exigences de l'industrie.

Depuis le développement des techniques de métagénomique, des micro-organismes auparavant non cultivables, tels que les extrémophiles, ont pu être étudiés. Les conditions de croissance de ces bactéries incluent de fortes pressions atmosphériques, des températures austères, des pH extrêmes, de faibles concentrations d'oxygène, de fortes concentrations en métaux ou en sels (Niehaus *et al.* 1999; Demirjian *et al.* 2001; van den Burg 2003; Robertson et Steer 2004). Plusieurs de ces études ont démontré que les enzymes produites par ces organismes étaient adaptées aux conditions dans lesquelles l'isolement a été effectué (Niehaus *et al.* 1999; Demirjian *et al.* 2001; Rossi *et al.* 2003). Ces enzymes sont fréquemment résistantes aux protéases, à la dénaturation par les détergents, et sont stables en présence de solvants et lorsque soumises à de hautes températures (Haki et Rakshit 2003). Par conséquent, les bactéries extrémophiles sont devenus une source inestimable d'enzymes d'intérêt industriel. Pour les besoins de l'industrie, les bactéries les plus recherchées sont celles adaptées à des températures

élevées (thermophiles) et à des pH alcalins (alcalinophiles) (Demirjian *et al.* 2001; Haki et Rakshit 2003; Palomo *et al.* 2004).

Les enzymes qui présentent une activité optimale à des températures extrêmes ont subi une évolution leur permettant une plus grande stabilité dans ces conditions. En comparant la structure tridimensionnelle de ces protéines à leur homologue mésophile, quelques différences ont été décelées (Sharma *et al.* 2001). D'abord, les enzymes thermostables possèdent un nombre plus élevé d'interactions ioniques et de liaisons hydrogène à leur surface. De plus, il a été démontré que certains acides aminés labiles peuvent être substitués par des acides aminés moins labiles, ce qui augmenterait la rigidité globale de la protéine. Par exemple, les mutations Gly → Ala et Lys → Arg ne sont pas rares (Demirjian *et al.* 2001; Vieille et Zeikus 2001; Haki et Rakshit 2003; Rossi *et al.* 2003; van den Burg 2003). Enfin, certaines études ont démontré la présence de métaux au sein de la structure 3D, ce qui stabiliserait d'autant plus l'enzyme. En effet, il semble que des ions Zn^{2+} soient présents chez quelques lipases, leurs rôles étant attribué à l'augmentation de la stabilité à hautes températures (Salameh et Wiegel 2007; Carrasco-Lopez *et al.* 2009). Plus d'une centaine d'enzymes provenant de bactéries extrémophiles ont été exprimées chez des hôtes mésophiles. La production et la purification de ces enzymes sont facilitées puisqu'il devient possible d'éliminer les autres protéines sécrétées par l'hôte par inactivation thermique (Vieille et Zeikus 2001).

Quoiqu'un grand nombre d'enzymes adaptées aux conditions extrêmes proviennent d'archaebactéries, plusieurs bactéries sont également de bons producteurs. Plusieurs lipases thermostables ont été retrouvées chez des espèces de *Bacillus* sp ou *Geobacillus* sp. Le Tableau 2.V décrit quelques-unes de ces enzymes thermostables identifiées chez ces micro-organismes. D'autres bactéries thermophiles, du genre *Thermus* ou *Pseudomonas* ont également été étudiées pour leur production d'enzymes lipolytiques thermostables (Kanwar *et al.* 2006; Dominguez *et al.* 2009).

Tableau 2.V : Liste d'estérases et de lipases thermophiles identifiées par des méthodes de métagénomique

		Caractéristiques de la lipase				
Organisme d'origine de la lipase	**Provenance**	**pH**	**T°**	**Stabilité**	**Substrats**	**Référence**
Geobacillus thermoleovorans Toshki	Enrichissement de sol + huile d'olive	8	65°C	40-60°C	C3-C18	(Abdel-Fattah et Gaballa 2008)
Bacillus sp. LBN 4	Source d'eau thermale à Tawang (Inde)	8	65°C	60-70°C	N/D	(Bora et Kalita 2007)
Bacillus sp. H-257	Souche isolée d'un échantillon de sol	8	75°C	N/D	N/D	(Imamura et Kitaura 2000)
Thermosyntropha lipolytica DSM 11003 (LipA et LipB)	Source d'eau thermale du lac Bogoria, Kenya	9.4/9.6	96°C	N/D	C6-C18	(Salameh et Wiegel 2007)
Bacillus thermoleovorans ID-1	Source d'eau thermale en Indonésie	7.5	75°C	40-60°C	C4-C18	(Lee *et al.* 1999)
*Bacillus thermophilus*111	Source d'eau thermale	7	65°C	50-100°C	N/D	(Fukatsu *et al.* 1993)
Bacillus coagulans BTS-3	Enrichissement d'un isolat de déchets de cuisine	8.5	55°C	55-60°C	C8-C16	(Kumar *et al.* 2005)
Bacillus sp. J33	N/D	8	60°C	40-60°C	N/D	(Nawani *et al.* 1998)
Geobacillus sp. *TW1*	Source d'eau thermale en Chine	7 et 8	40°C	40-60°C	N/D	(Li et Zhang 2005)
Geobacillus sp. T1	N/D	9	70°C	65°C	C10-C14	(Leow *et al.* 2007)
Bacillus stearothermophilus P1	Source d'eau thermale en Thaïlande	8.5	55°C	30-65°C		(Sinchaikul *et al.* 2001)
Bacillus sp. A30-1 (ATCC 53841)	Source d'eau thermale dans le parc National de Yellowstone	9,5	60°C	40-75°C	C16-C22	(Wang *et al.* 1995)
*Bacillus cereus*C(7)	noix de coco	8	60°C	30-65°C	N/D	(Dutta et Ray 2009)
Enterococcus faecalis	Sol	8	60°C	N/D	N/D	(Kar *et al.* 1996)

2.5 Expression de protéines hétérologues

2.5.1 Clonage chez l'hôte *Escherichia coli*

Avec le développement des techniques permettant l'isolement de gènes en provenance de micro-organismes non cultivables et extrémophiles, il est devenu important de développer des systèmes d'expression efficaces chez des hôtes mésophiles afin d'y cloner ces gènes et d'y recueillir les protéines d'intérêt. À ce niveau, l'hôte *Escherichia coli* est parmi les hôtes les plus étudiés pour l'expression de protéines hétérologues. Le choix d'un hôte mésophile est également avantageux afin d'exprimer des enzymes hyperthermophiles car un traitement à la chaleur peut être suffisant afin de dénaturer la majorité des protéines sécrétées chez *E. coli*, facilitant ainsi la purification de l'enzyme d'intérêt (van den Burg 2003; Lorenz et Eck 2005; Kim et Lee 2006; Schmeisser *et al.* 2007). Par conséquent, plusieurs protéines traduites par des gènes issus de banques métagénomiques ont été exprimées avec succès chez cet hôte (Rondon *et al.* 2000; Haki et Rakshit 2003; Handelsman 2004; Schmitz *et al.* 2008). Toutefois, l'expression de protéines hétérologues en provenance d'organismes thermophiles n'est pas toujours un succès et plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats. En premier lieu, la régulation de l'expression génétique débute au niveau du promoteur pour la transcription des ARN_m (Barnard *et al.* 2004; Hammer *et al.* 2006; Haugen *et al.* 2008). Ainsi, lors du criblage de librairies d'ADN, les promoteurs natifs des gènes en provenance de micro-organismes non cultivables ne sont pas toujours induits correctement, ce qui influence le nombre de clones positifs identifiés. D'un autre côté, chez *E. coli*, un problème souvent rencontré est la formation de corps d'inclusion, qui se produit lorsque les enzymes se replient incorrectement (Healy *et al.* 1995; van den Burg 2003). Également, la structure tridimensionnelle qui donne une conformation active à l'enzyme peut impliquer des modifications post-traductionnelles, la formation de ponts disulfure ou encore la présence de chaperonnes moléculaires. Certaines protéines peuvent aussi être toxiques chez l'hôte choisi (Vieille et Zeikus 2001; van den Burg 2003; Fan *et al.* 2009). De plus, il a été démontré que l'usage des codons variait entre différentes espèces bactériennes, influençant d'autant plus l'expression de protéines hétérologues. Les codons AGG (Arg), AGA (Arg), CUA (Leu) et AUA (Ile) sont les plus

problématiques chez *E.coli* (Kane 1995; Rogers 1996; Gustafsson *et al.* 2004; Fuglsang 2005; Kim et Lee 2006). La présence en grande quantité de ces codons au sein de gènes hétérologues peut provoquer, lors de la traduction, la perte d'acides aminés ou encore la modification d'un résidu pour un autre, menant à des modifications irréversibles dans la protéine. D'autre part, quelques études ont observé que la fréquence des codons rares n'était pas le seul facteur influençant la traduction des protéines hétérologues; la distribution jouerait également un rôle (Kim et Lee 2006). Afin de pallier à ce problème, il est possible de muter les codons rares ou encore choisir une souche de *E. coli* optimisée pour la production des codons rares (Novy *et al.* 2001; Sharma *et al.* 2001; Gustafsson *et al.* 2004). D'un autre côté, l'utilisation d'hôtes d'expression alternatifs doit être considérée, parmi lesquels les plus courants sont des espèces du genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, et *Streptomyces* (van den Burg 2003; Schwartz 2006; Schmeisser *et al.* 2007). Le choix de l'hôte *S. lividans* sera discuté dans le paragraphe suivant.

2.5.2 Clonage chez l'hôte *Streptomyces lividans*

Lorsque l'hôte *E. coli* est utilisé, il a été démontré qu'à peine 40 % des gènes hétérologues étaient bien exprimés (Steele et Streit 2005). De plus, 80 % des promoteurs d'actinomycètes ne sont pas reconnus chez cette bactérie, rendant cette dernière moins intéressante pour le clonage de gènes en provenance de biotopes riches en bactéries filamenteuses. Également, beaucoup de micro-organismes thermophiles ont un contenu riche en GC dans leur matériel génétique (Li et Qin 2005; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Par conséquent, *Streptomyces lividans* devient un hôte attrayant qui peut complémenter adéquatement l'usage de la bactérie *E. coli*. Les streptomycètes sont des bactéries Gram-positives possédant un contenu en GC d'environ 71 %. Ces micro-organismes sont également reconnus pour la production de nombreux métabolites secondaires et molécules bioactives (ex. : antibiotiques) (Thompson *et al.* 2002; Fuglsang 2005; Li et Qin 2005; Lorenz et Eck 2005; Schmeisser *et al.* 2007). À l'heure actuelle, plusieurs vecteurs sont compatibles pour la transformation chez *E. coli* et *S. lividans* parallèlement, permettant de rehausser les chances d'identifier de nouvelles enzymes d'intérêt industriel (Rajendhran et Gunasekaran 2008). L'usage des codons peut

également être une source de problèmes, le codon le plus rare chez *S. lividans* étant le codon UUA (Leu). Malgré ce mince obstacle, le succès de l'expression de protéines hétérologues en provenance de bactéries thermophiles a été démontré (Wang *et al.* 2000; Diaz *et al.* 2008). Ainsi, des gènes de *Thermus thermophilus* ont été clonés parallèlement chez *E. coli* et *S. lividans*. La production de l'enzyme s'est avérée meilleure chez l'hôte Gram-positif. Ces résultats sont expliqués entre autres par le contenu riche en GC des bactéries du genre *Thermus* mais également par la reconnaissance du peptide signal de la protéine, allouant sa sécrétion chez *S. lividans* (Diaz *et al.* 2008).

2.6 Problématique, hypothèses et objectifs de la recherche

Il est maintenant incontestable que les enzymes lipolytiques ont leur place dans un grand nombre d'applications industrielles. De plus, afin de répondre aux besoins des procédés, les entreprises recherchent des enzymes thermostables. Il a été démontré à plusieurs reprises que les micro-organismes extrémophiles étaient les meilleurs candidats pour la production de ces enzymes. Quoique plus de 80 nouvelles enzymes lipolytiques aient été identifiées grâce à la métagénomique, peu d'entre elles ont été caractérisées en profondeur afin d'évaluer leur potentiel en biotechnologie (Schmeisser *et al.* 2007). Dans l'optique d'identifier de nouvelles lipases d'intérêt industriel, une approche combinant l'enrichissement bactérien et la métagénomique a été utilisée. Le projet a été conçu en se basant sur la même hypothèse qui a permis l'identification de plusieurs autres enzymes, soit que les propriétés des enzymes identifiées correspondraient aux conditions d'enrichissement. Une dizaine de gènes nouveaux codant pour des enzymes lipolytiques ont ainsi été identifiés. Récemment, l'équipe de recherche du laboratoire de François Shareck a publié la caractérisation d'une des enzymes identifiées lors de ce projet (Meilleur *et al.* 2009). Cette dernière répondait aux critères recherchés; elle était thermophile et thermostable et préférait l'hydrolyse de triglycérides à longues chaînes carbonées en conditions alcalines. Les objectifs du présent rapport concernent l'expression de deux nouvelles lipases en provenance de cette banque métagénomique issue des fermenteurs. Une des deux enzymes a été caractérisée afin de déterminer ses conditions optimales d'hydrolyse et évaluer son potentiel pour diverses applications industrielles.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Vecteurs d'expression et souches bactériennes

3.1.1 Vecteurs et souches de *Escherichia coli*

Le cosmide pIAFS2 développé dans le laboratoire du Pr François Shareck a été utilisé pour la construction de la banque cosmidique. Ce cosmide est un dérivé du cosmide pWEB-TNC (Epicentre Biotechnologies). Les modifications se situent principalement dans l'ajout d'une origine de réplication afin de pouvoir répliquer le cosmide parallèlement chez les hôtes *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* (Tableau 3.I). Toutefois, à prime abord, la construction de la banque génomique a été effectuée dans une souche de *E. coli* (non présentée dans le Tableau 3.I).

Après une série de sous-clonage, certains fragments d'ADN qui devaient être séquencés ont été transférés dans le plasmide pUC18 ou pTZ19U. Ce dernier a par la suite été transformé dans la souche de *E. coli* DH11S. Ces vecteurs contiennent des régions dont la séquence nucléotidique est reconnue par les amorces universelles M13 permettant le séquençage des segments d'ADN clonés. Un séquençage de type Sanger a été effectué par le cenre d'innovation Génome Québec avec la technologie 3730xl DNA Analyser d'Applied Biosystems. Enfin, la souche de *E. coli* BL21/pREP4 transformée avec le plasmide pIAF841 a servi à l'expression des gènes d'intérêt.

3.1.2 Vecteurs et souches de *Streptomyces lividans*

Suite à l'identification des gènes d'intérêt chez l'hôte *E. coli*, la souche de *S. lividans* 10-164 développée par Hurtubise *et al.* (1995) a été manipulée pour l'expression chez cet hôte Gram positif. Les vecteurs d'expression utilisés dans cette souche étaient pIAFC109, pIAF550 et pIAFD95A (Tableau 3.I).

Tableau 3.I : Description des souches de *E. coli* et *S. lividans* ainsi que des vecteurs utilisés.

Souches bactériennes/ vecteurs	Description	Référence
Souches		
E.coli		
DH11S	*mcrA* Δ(mrr-hsd*RMS*-mcr*BC*) Δ(lac-pro*AB*) Δ(rec*1398*) deo*R* rps*L* srl$^-$ thi$^-$ /F' pro*AB*$^+$ lac*I*^{q}ZΔM15	(Lin *et al.* 1992)
BL21/pREP4	B F- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal, dcm*, contient le plasmide pREP4 résistant à la kanamycine et avec le répresseur *lac*I^q	Stratagene
S. lividans		
10-164	Dérivé de *S.lividans* 1326, *msi K*$^-$	(Hurtubise *et al.* 1995)
Plasmides		
E.coli		
pIAF841	Dérivé de pTZ19U, Amp^r, promoteur *lacZ*	(Ebanks *et al.* 2000)
pUC18	Amp^r, *rep* pMB1, promoteur *lac*, région M13	(Yanisch-Perron *et al.* 1985)
pTZ19U	Amp^r, *rep* pMB1, opéron *lac*, région intergénique du phage f1, région M13	(Mead *et al.* 1986)
pIAFS2	Cosmide dérivé de pWEB-TNC, Amp^r, Apra^r, Chl^r, pIAF55, cos, ME	Laboratoire F. Shareck
S.*lividans*		
pIAFC109	Dérivé de pIJ702, Tsr^r, promoteur muté de la *xlnC*, cassette MCS	(Sulzenbacher *et al.* 1997)
pIAF550	Dérivé de pIJ702, Tsr^r, promoteur muté de la *xlnC*, cassette MCS	Laboratoire F. Shareck

3.2 Mise en culture

3.2.1 Milieux nutritifs pour la croissance de *E. coli*

Les différentes souches de *E. coli* ont été cultivées sur gélose ou en culture liquide. Le milieu 2xTY a été utilisé comme bouillon nutritif. Un litre de milieu contient 16 g de Bacto-tryptone, 10g d'extrait de levure et 5 g de NaCl. Lorsque les souches ont été ensemencées sur Pétri, 15 g/L d'agar ont également été ajoutés avant de stériliser le milieu à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C.

Suite à la stérilisation, lorsque le milieu de culture avait atteint une température de 55°C, les antibiotiques ont été ajoutés avant la préparation des géloses en concentrations appropriées (ampicilline 100 μg/mL; kanamycine 25μg/mL; apramycine 50 μg/mL). Les mêmes concentrations ont été ajoutées dans les cultures liquides au moment opportun. Les solutions mères des différents antibiotiques ont été préparées par dissolution dans de l'eau distillée puis filtrées à l'aide d'une membrane avec un porosité de 0.22 μm avant d'être conservées à -20°C.

3.2.2 Milieux nutritifs pour la croissance de *S. lividans*

3.2.2.1 Culture en milieu solide

Le milieu R5 a été préparé afin de permettre la régénération des protoplastes après la transformation (Tableau 3.II). La solution d'éléments traces était composée de 40 mg de $ZnCl_2$, 200 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et 10 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ par litre d'eau distillée. Aucun antibiotique n'a été ajouté dans les géloses R5. Quant à lui, le milieu Bennett a servi à ensemencer les transformants afin d'obtenir du mycélium et des spores (Tableau 3.II). Enfin, au moment de couler les géloses, l'antibiotique thiostreptone a été ajouté à raison de 50 μg/mL. Les solutions mères de cet antibiotique (50 mg/mL) ont été préparées par dissolution dans le solvant dimétylsulfoxyde (DMSO) puis divisées en aliquotes dans des microtubes de 1.5 mL avant d'être conservées à -20°C.

3.2.2.2 Culture en milieu liquide

Des cultures liquides ont permis la croissance du mycélium et l'expression des gènes clonés dans la souche *S. lividans* 10-164. Ainsi, le milieu riche utilisé était composé de poudre de soja tryptique et a permis la croissance bactérienne. L'expression est ensuite poursuivie dans le milieu minimal M14 (Tableau 3.II). Le sels de Mandels ont été préparés en mélangeant 140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ dans 100 mL d'eau distillée. Contrairement aux cultures en milieux solides, la concentration finale de l'antibiotique thiostreptone en milieu liquide était de 5 µg/mL.

Tableau 3.II : Liste et composition des milieux de cultures utilisés pour la croissance de *S. lividans*

Milieux nutritifs	Utilisation	Ingrédients (par litre)	Additifs après stérilisation (par litre)
Milieux solides			
R5	Transformation	103 g de sucrose 0.25 g de K_2SO_4 10.12 g de $MgCl_2$ 10 g de glucose 100 mg de Casamino Acids 2 mL d'éléments traces 5 g d'extrait de levure 5.73 g de tampon TES 22 g d'agar	10 mL de KH_2PO_4 0.5 % 4 mL de $CaCl_2$ 5 M 15 mL L-proline 20 % 5 mL de NaOH 1N (filtré)
Bennett	Maintien des souches	1g d'extrait de levure 1g d'extrait de bœuf 2g de NZ-amine A 10g de maltose 22g d'agar	Aucun
Milieux liquides			
TSB (*Tryptic soy broth*)	Croissance du mycélium	27.5 g de TSB	Aucun
M14	Expression des protéines	1.4 g de $(NH_4)_2SO_4$ 5 g de K_2HPO_4 1 g de KH_2PO_4 2 mL de Tween 80 1 mL de sels de Mandels	6 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 % 10 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3 % 40 mL de xylose 25 %

3.3 Techniques de clonage et de biologie moléculaire

3.3.1 Synthèse d'oligonucléotides

Les amorces utilisées pour des fins de séquençage ou d'amplification d'un fragment d'ADN spécifique sont décrites dans le Tableau 3.III. La synthèse a été réalisée par le fournisseur Sigma-Genosys. Les amorces lyophilisées ont été suspendues dans de l'eau distillée stérile. Par la suite, le dosage par spectrophotométrie a permis d'établir la concentration en micromolaire par la formule suivante :

$$[\mu M] = \frac{Abs \cdot FD \cdot 33\,000}{PM\ amorce}$$

où Abs correspond à l'absorbance à 260 nm, FD au facteur de dilution et PM au poids moléculaire de l'amorce.

Tableau 3.III : Liste des amorces ayant servies au séquençage et à l'amplification des gènes d'intérêt. Les sites de restriction sont soulignés.

Nom des amorces	Séquence (5' → 3')	Poids moléculaire (Da)
Amplification AF6		
AF6IntFor	AAACCATCGGGTGGCGGCT	5 848
AF6IntRev	AAACTGCGTGATCCCGGT	5 809
AF6Sph	AAAGCATGCCCATGAAAATTAATCG	7 664
AF6Sac	AAAGAGCTCGCTATTTTCCAGGTG	7 363
Amplification AF1		
AF1IntFor	AAAATTGGCTGGGAGATCG	5 911
AF1IntRev	AAACATTTGGCGTTCGGCAC	6 113
AF1Int2For	AAAGCATCTTCGCCTTGATCG	6 378
AF1Int2Rev	AAATGCAGACCGGCCTGGACC	6 420
AF1Hind	TTTAAGCTTGGGACAGAGACGACACATGAAAAACCAACGACGC CGAT	14 497
AF1-Mut-SacFor	TTCGACGACGATGTCGAGCTGAGCGCCGAGGAA	10 218
AF1-Mut-SacRev	TTCCTCGGCGCTCAGCTCGACATCGTCGTCGAA	10 035
AF1Sac	AAAGAGCTCTACTCCGTCGGCTCCTCGT	8 496

3.3.2 Amplification des gènes d'intérêt

La trousse de la compagnie Roche contenant l'ADN polymérase de *Pyrococcus woesei* a été utilisée lors des différentes réactions de polymérase en chaîne (PCR) avec quelques modifications. Le volume réactionnel de 50 µL contenait du tampon avec $MgSO_4$ ainsi que du $MgSO_4$ additionnel, tous deux fournis dans la trousse en solutions concentrées. Les concentrations finales respectives de ces deux produits en réaction étaient de 1X et 0.4X. De plus, les dinucléotides triphosphate (dNTPs) ont été ajoutés en concentration finale de 800 µM. D'autres composés ont également été ajoutés dans le volume réactionnel : 8 µL de propionamide 25 %, 0.5 µL de Tween 20 5 %, 3 µL des amorces 10 µM et environ 1 µg de la matrice permettant d'amplifier le fragment désiré. En dernier lieu, la polymérase *Pwo* a été ajoutée à raison de 2.5 U par réaction.

L'amplification par PCR a suivi le programme suivant : une dénaturation initiale à 94°C pour une durée de 3 minutes, suivie de 30 cycles avec dénaturation pour une durée de 45 secondes à 94°C, hybridation pour la même période de temps et une élongation à 72°C pendant 1 minute. La température d'hybridation variait entre 55 et 65°C selon la longueur des amorces. Enfin, l'amplification s'est terminée par une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes.

3.3.3 Électrophorèse en gel d'agarose

Les produits de l'amplification ou d'une digestion plasmidique ont été analysés à l'aide de gels d'agarose 0.7% (p/v). L'agarose a été dissout dans du tampon Tris-Borate-EDTA 1X (TBE). Cette solution a été préparée à partir d'une solution mère de TBE 10X contenant, par litre, 108 g de Tris Base, 55 g d'acide borique et 40 mL d'EDTA 0.5 M. Afin de visualiser les fragments d'ADN aux rayons ultraviolets, du bromure d'éthidium a également été ajouté afin d'obtenir une concentration finale dans le gel de 0.5 µg/mL.

Les échantillons à analyser ont été dissous dans un tampon de chargement contenant 0.25 % (p/v) de bleu de bromophénol et de xylène cyanol ainsi que 15 % (p/v) de Ficoll 400. Également, l'échelle de poids moléculaire 1 Kb PLUS (InVitrogen) a permis l'estimation de la longueur des fragments. Une quantité égale à 0.5 µg de l'échelle Kb^+ a été appliquée sur les gels.

Au moment de la migration, le gel a été déposé dans une cuve prévue à cet effet contenant le même tampon 1X et les échantillons ont été déposés dans les puits du côté de la cathode. Par la suite, un voltage de 90 V a été appliqué pour une durée d'environ 1h avant la visualisation du gel aux rayons UV.

3.3.4 Extraction d'un fragment d'ADN d'un gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été extraits du gel d'agarose à l'aide de la trousse GFX provenant du fournisseur GE Healthcare. L'excision des fragments a été effectuée à l'aide d'un scalpel et ces derniers ont été transférés dans des microtubes de 1.5 mL. L'extraction de l'ADN du gel a été effectuée selon les directives de la compagnie. L'ADN a été récupéré lors de l'étape d'élution où un volume entre 20 et 50 µL d'un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 a provoqué le détachement de l'ADN de la colonne. L'ADN purifié a ensuite été conservé à -20°C.

3.3.5 Digestion de l'ADN

Les enzymes de restriction utilisées (SphI, SacI, BamHI et HindIII) pour la digestion de l'ADN ont été achetées chez la compagnie NEB (*New England Biolabs*). Les expérimentations ont été effectuées dans un volume final de 20 µL, dans des microtubes de 1.5 mL. Pour chaque enzyme, une concentration finale de 1X du tampon approprié (NEB 1 à 4) a été ajoutée dans le microtube. Puis, entre 50 et 500 ng des plasmides ou produits d'amplification ont été déposés dans les microtubes. Les enzymes de restriction ont été ajoutées avant le début de la réaction à raison de 5 à 10 U par enzyme. Lorsque des digestions doubles devaient être effectuées, la fiche des tampons a été consultée afin de choisir un tampon commun dans lequel les deux enzymes de restriction auraient une activité maximale. Les digestions ont eu lieu à 37°C pendant 2h30. Enfin, lorsque nécessaire, l'enzyme RNase A (1 µL d'une solution à 1 mg/mL) a également été ajoutée et les enzymes ont été inactivées aux températures appropriées.

3.3.6 Techniques de clonage chez l'hôte *Escherichia coli*

3.3.6.1 Ligation et transformation

Les fragments d'ADN digérés ont été ligués avec les différents vecteurs grâce à l'enzyme T4 DNA ligase (NEB). Encore une fois, la réaction a été réalisée dans un microtube de 1.5 mL avec un volume final de 20 µL. Le tampon 10X livré avec l'enzyme contenait 10 mM d'adénosine triphosphate (ATP), molécule essentielle à la réaction. Les conditions requises pour la ligation étaient les suivantes : le tampon en concentration finale de 1X, l'insert et le vecteur (en proportion 2 :1) et 1 µL de la ligase. Le tube contenant le mélange réactionnel a ensuite été incubé à la température de la pièce pour un minimum de 4 heures.

La transformation des produits de ligation dans les différentes souches de *E. coli* a débuté par l'ajout, en conditions stériles, de 100 µL de cellules compétentes au microtube de ligation. Après avoir délicatement mélangé, le microtube a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Le transfert de l'ADN dans la bactérie a ensuite été effectué grâce à un choc thermique de 2 minutes à 42°C, période après laquelle le microtube a immédiatement été incubé de nouveau sur glace pour la même période de temps. Suivant cette étape, 400 µL de milieu 2xTY (section 3.2.1) ont été ajoutés puis le microtube a été incubé à 37°C durant 45 minutes. Subséquemment, le mélange a été étalé à l'aide de billes de verre stériles sur le milieu solide 2xTY contenant les antibiotiques conformément aux résistances conférées par les plasmides. Les Pétri ont ensuite été incubés 16 heures à 37°C.

Dans le cas où les fragments d'ADN ont été ligués dans les plasmides pUC18 et pTZ19U pour des fins de séquençage, le produit de la transformation a été étalé sur une gélose 2xTY contenant également de l'isopropyl-beta-thio-galactoside (IPTG) et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) en concentrations finales respectives de 40 µM et 40 µg/mL. Ces deux additifs ont permis la sélection des clones positifs (blancs) par rapport aux négatifs (bleus).

3.3.6.2 Expression des protéines d'intérêt

Afin d'exprimer les gènes clonés dans le plasmide pIAF841, les transformants obtenus dans la souche de *E. coli* BL21/pREP4 ont été ensemencés à 37°C pour une période de 16h dans le milieu riche 2xTY. Les antibiotiques appropriés ont été ajoutés en concentrations adéquates.

3.3.6.3 Isolement des cosmides/plasmides transformés chez *E. coli*

Les cosmides et les plasmides transformés chez l'hôte *E. coli* ont été isolés à l'aide de la trousse QIAprep de Qiagen. Le culot bactérien de 1.5 mL d'une culture de 16h a été prélevé pour l'isolement de plasmide/cosmide. Le protocole a été suivi tel que mentionné dans le guide fourni par le détaillant. Au moment de l'élution, 50 µL du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 ont été appliqués sur la colonne. Les éluats ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.3.7 Techniques de clonage chez l'hôte *S. lividans*

3.3.7.1 Ligation et transformation

La ligation des fragments d'ADN avec les vecteurs d'expression a été effectuée de la même façon que décrite précédemment dans la section 3.3.6.1. Quant à la transformation, la totalité du produit de la ligation a été transformé dans les protoplastes de la souche de *S. lividans* 10-164 (Mémoire de François-Xavier Lussier, 2006). Préalablement à l'expérimentation, une solution de polyéthylène glycol 1500 en concentration de 25 % a été préparée. La solution mère vendue à une concentration de 50 % a été diluée dans du tampon T. Par tranche de 100 mL, ce tampon préparé stérilement contient 25 mL de sucrose 10.3 %, 0.2 mL de la solution d'éléments traces (section 3.2.2.1) et 1 mL de K_2SO_4 2.5 %. Il contient également du $CaCl_2$ et du Tris-acide maléique pH 8 en concentrations finales respectives de 100 et 50 mM.

Lors de l'expérimentation, 50 µL de protoplastes et 200 µL de la solution de polyéthylène glycol 25 % ont été ajoutés au produit de la ligation dans un microtube de 1.5 mL. Après avoir mélangé doucement le tout et incubé 1 minute et 30 secondes,

différentes quantités du mélange (entre 10 et 50 µL) ont été étalées à l'aide de billes de verre stériles sur des géloses contenant le milieu R5 sans antibiotique (section 3.2.2.1). Les Pétri ont été incubés 16h à 34°C. Suite à cette première période d'incubation, l'antibiotique thiostreptone a été ajouté à raison de 500 µg par Pétri dilué dans un volume de 1.5 mL d'eau stérile afin de faciliter l'étalement sans billes de verre. Les géloses ont ensuite été incubées à la température de la pièce pour une période de 30 minutes avant d'être à nouveau placées dans un incubateur à 34°C jusqu'à la croissance de transformants (généralement 48h).

3.3.7.2 Expression des protéines d'intérêt

Dans un premier temps, les transformants désirés ont été transférés sur des géloses contenant le milieu Bennett pour une période d'environ 5 jours à 34°C. Suite à la croissance du mycélium, ce dernier a été inoculé stérilement à l'aide d'un manche de Koch dans le milieu liquide TSB en présence de 5 µg/mL de thiostreptone. Après 48h d'incubation à 34°C avec une agitation de 240 rpm, une aliquote de culture a été examinée au microscope afin de confirmer la pureté de la culture.

Dans un deuxième temps, une quantité correspondant à 8-10 % du volume à ensemencer en milieu M14 a été prélevée de la pré-culture en milieu TSB. Avant la mise en culture du mycélium, les additifs ($CaCl_2$, $MgSO_4$ et xylose) cités dans le Tableau 3.II ont été ajoutés avec l'antibiotique thiostreptone, tel que mentionné précédemment. Les cultures de *S. lividans* ont été incubées pour une période de 72h à 34°C puis le surnageant a été conservé afin d'analyser les protéines extracellulaires.

3.3.7.3 Isolement des plasmides transformés chez *S. lividans*

Les plasmides ont été isolés suite à la pré-culture de 48h en milieu TSB. Une quantité de 1.5 mL a été prélevée dans un microtube puis ce dernier a été centrifugé 1 minute à 13 000 rpm. Le surnageant a été éliminé puis le culot (entre 70 et 100 mg de mycélium) a été lavé avec 500 µL de la solution I (Tableau 3.IV). Ensuite, le culot a été suspendu dans 400 µL de lysozyme 2 mg/mL préparé dans la solution I. La digestion a eu lieu 1h dans un bain-marie à 37°C. Par la suite, 250 µL de solution II ont été ajoutés et

le microtube a immédiatement été agité 10 secondes au vortex avant d'être déposé dans un second bain dont la température indiquait 70°C. La température du bain a diminué graduellement jusqu'à atteindre 30°C. À ce moment, le microtube a été retiré puis 100 µL de la solution III ont été ajoutés et le tube a été agité 10 secondes au vortex avant d'être centrifugé 5 minutes à 13 000 rpm. La phase supérieure claire a été transférée dans un nouveau microtube dans lequel ont été ajoutés 700 µL d'isopropanol et 70 µL d'acétate de sodium 3 M. Le contenu a été mélangé par inversion et incubé à température pièce pendant 5 minutes. Le culot recueilli après une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale a été séché à température pièce avant d'être suspendu dans un volume de 50 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 et EDTA 1 mM) et de 5 µL d'acétate de sodium 3 M. Le mélange a été agité 1 minute puis 25 µL de phénol neutre ont été ajoutés. Le microtube a été agité au vortex 5 secondes avant d'être centrifugé 5 minutes. Une fois de plus, le surnageant clair a été transféré dans un nouveau microtube dans lequel de l'isopropanol a été ajouté en proportion 1 :1. Le tout a été incubé 5 minutes à température pièce puis le microtube a été centrifugé une dernière fois 5 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été retiré et le culot correspondant au plasmide purifié a été séché et enfin suspendu dans 50 µL d'eau distillée stérile. Les plasmides isolés ont été conservés à une température de -20°C.

Tableau 3.IV : Liste et composition des solutions utilisées lors de l'isolement des plasmides transformés dans la souche *S. lividans* 10-164.

Solutions	Composition	Notes
Solution I	Pour 100 mL 10.3 g de sucrose 2.5 mL de Tris 1 M pH 8 5 mL de EDTA 0.5 M pH 8 Compléter avec de l'eau distillée	Stériliser la solution à l'autoclave
Solution II	Pour 5 mL 150 µL de NaOH 10 N 1 mL de SDS 10 % Compléter avec de l'eau distillée	Préparer la journée même
Solution III	Pour 5 mL 5 g de phénol 5 mL de chloroforme 5 mg d'hydroxyquinoline Compléter avec de l'eau distillée	Conserver cette solution à la noirceur

3.4 Techniques de protéomique

3.4.1 Dosage de protéines

Les protéines des surnageants recueillis ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976). Le réactif de Bradford provenait de la compagnie Bio-Rad. Les essais ont été effectués dans des cuvettes avec un volume réactionnel de 1 mL. Une courbe standard a d'abord été effectuée en utilisant l'albumine sérique bovine. Les concentrations de BSA ont varié entre 0 et 10 µg/mL. Au moment de l'expérimentation, une quantité égale à 800 µL de chaque dilution a été déposée dans les cuvettes puis 200 µL du réactif de Bradford ont été ajoutés. Le contenu des cuvettes a été bien mélangé à l'aide d'une pipette. Par la suite, la réaction a eu lieu pendant 10 minutes à température pièce et finalement, la densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

3.4.2 Concentration des protéines

Les protéines ont été concentrées en ajoutant un volume d'acétone correspondant à 2 fois le volume de surnageant à concentrer. Le microtube a ensuite été incubé à -20°C pendant 16 heures. Une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes a permis de récupérer les protéines précipitées en éliminant le surnageant et en laissant sécher le culot.

3.4.3 Préparation des échantillons

Les culots de protéines ont été suspendus dans un tampon d'échantillon 3X contenant, par tranche de 10 mL, 3.6 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.6 g de SDS, 3 mL de glycérol, 0.03 g de bleu de bromophénol et de l'eau distillée. L'agent dénaturant β-mercaptoéthanol a été ajouté en concentration de 5 % lorsque nécessaire. Les échantillons ont par la suite été bouillis 10 minutes avant d'être chargés dans les puits des gels SDS-PAGE.

3.4.4 Gels de polyacrylamide et migration des protéines

Les gels SDS-PAGE ont été préparés selon (Laemmli 1970). La solution de polyacrylamide 30 % a été fournie par la compagnie Bio-Rad. Lorsque le gel SDS-PAGE était prêt pour la migration, ce dernier a été déposé dans une cuve à électrophorèse contenant le tampon de migration 1X préparé à partir d'une solution mère 5X. Cette dernière contenait 15 g de Tris Base, 72 g de glycine et 5 g de SDS par litre d'eau distillée. Une quantité égale à 20 µL des échantillons (préparés tels qu'indiqué dans la section 3.4.3) a été déposée dans les puits. Les protéines chargées négativement ont été séparées grâce à un champ électrique leur permettant de migrer vers le pôle positif. Les protéines ont migrées sous un voltage constant de 200 V pour une période de 45 minutes.

Dans chaque gel, le marqueur de poids moléculaire Broad Range de la compagnie Bio-Rad a été ajouté. Les protéines standards étaient la myosine (200 kDa), la β-galactosidase (116.3 kDa), l'albumine sérique bovine (66.2 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique (31 kDa), l'inhibiteur de la trypsine (21.5 kDa), le lysozyme (14.4 kDa) et l'aprotinine (6.5 kDa).

3.4.5 Techniques de coloration des protéines

3.4.5.1 Bleu de Coomassie

Lorsque les protéines devaient être visualisées par une coloration au bleu de Coomassie, le gel a été incubé 30 minutes à température pièce sous agitation dans la solution de coloration. Cette dernière était composée de 1.25 g de bleu de Coomassie R250, 227 mL d'eau distillée, 227 mL de méthanol et 46 mL d'acide acétique. Le gel a ensuite été lavé dans la solution de décoloration (40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique dilués dans de l'eau distillée) afin de révéler les protéines du gel.

3.4.5.2 Nitrate d'argent

Afin de colorer les protéines au nitrate d'argent, le gel a d'abord été immergé dans une solution fixatrice composée de 50 % de méthanol et 5 % d'acide acétique pendant 1h

sous agitation. Par la suite, le gel a été lavé 2 fois pendant 10 minutes avec de l'eau milliQ. Suivant ce lavage, une solution de 0.02 % de thiosulfate de sodium a submergé le gel durant 1 minute. Deux autres lavages d'une minute avec de l'eau milliQ ont suivi avant de tremper le gel dans une solution de nitrate d'argent 0.2 % pendant 20 minutes. Enfin, les protéines du gel ont été révélées grâce à la solution de développement composée de carbonate de sodium 2 % additionnée de 0.1 % de formaldéhyde 37 %. Au moment où les protéines ont été révélées, la réaction a été arrêtée avec une solution d'acide acétique 5 %.

3.4.6 Analyse en spectrométrie de masse

Les protéines soupçonnées de correspondre aux protéines traduites par les gènes clonés ont été colorées au bleu de Coomassie et excisées du gel de polyacrylamide à l'aide d'un scalpel. Suivant les étapes de décoloration, réduction, alkylation, digestion tryptique et extraction des peptides, ces derniers ont été envoyés au service de spectrométrie de masse de l'IAF pour des fins d'analyse. Les peptides étaient d'abord séparés à l'aide d'une colonne de chromatographie C18 et d'un gradient d'eau et d'acétonitrile. L'appareil utilisé était un Q-trap d'Applied Biosystems, un appareil hybride triple quadrupole avec une trappe ionique. Les peptides observés dans le spectre de masse ont été comparés à la séquence connue en acides aminés de la protéine recherchée afin de confirmer ou d'infirmer son identité.

3.5 Détection de l'activité lipolytique

3.5.1 Criblage sur Pétri

Les géloses 2xTY pour les souches de *E. coli* ou Bennett pour celles de *S. lividans* ont été utilisées pour le criblage sur Pétri. Au moment de couler les milieux de culture pour la préparation des géloses, le substrat tributyrine (C4 :0) a été ajouté stérilement en concentration finale de 1 %. Le milieu est ensuite passé au malaxeur pour une période de 30 secondes afin d'émulsifier le substrat de façon homogène dans le milieu de culture. Un halo clair était observé lorsque le substrat était dégradé par les enzymes lipolytiques.

Un deuxième substrat a également servi pour le criblage et le suivi de l'activité lipolytique. Les mêmes milieux de culture ont été additionnés d'huile d'olive (1 %) en combinaison avec de la rhodamine B (0.01 %). Encore une fois, une bonne émulsion a été préparée en malaxant environ 30 secondes avant de couler les géloses. Pour visualiser l'activité, les géloses ont été observées aux rayons UV. Une zone fluorescente apparaissait lorsque l'activité était positive.

3.5.2 Zymogramme sur SDS-PAGE

Il a été possible de suivre l'activité lipolytique à posteriori de la migration des protéines (section 3.4.4) en utilisant deux types de substrats : le 4-méthylumbellyferyl butyrate (MUF-C4) ou des géloses contenant 1 % d'un substrat lipidique (section 3.5.1). Pour ce faire, les échantillons migrés sur SDS-PAGE étaient suspendus dans le tampon de chargement en absence de l'agent dénaturant β-mercaptoéthanol.

Dans le premier cas, le substrat fluorescent MUF-C4 a été pesé afin de préparer une solution mère de 25 mM en dissolvant le composé dans de l'isopropanol. Le gel de polyacrylamide contenant les protéines migrées a d'abord été lavé 30 minutes dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7 contenant 2.5 % de Triton X-100. Ensuite, une aliquote de la solution mère a été ajoutée au même tampon, sans Triton X-100 afin d'obtenir une concentration finale de 100 μM. Le gel a ainsi été submergé dans cette solution contenant le substrat pendant 5 minutes à la noirceur. L'activité est visible aux rayons UV, où il a été possible d'observer une zone fluorescente à l'endroit où la lipase/estérase se trouvait sur le gel. Suite à la visualisation, le gel SDS-PAGE a été coloré par l'une des deux méthodes décrites antérieurement.

Dans le second cas, suivant le lavage du gel avec la solution contenant le Triton X-100, un des milieux de culture contenant le substrat à hydrolyser (section 3.5.1) a été juxtaposé au gel de polyacrylamide. Le montage a été incubé 16h à 34°C de sorte que les protéines puissent diffuser du SDS-PAGE vers la gélose et hydrolyser le substrat. Une zone claire ou fluorescente, selon le substrat, a été observée lorsque l'activité était positive. Contrairement à la méthode avec le substrat fluorescent MUF-C4, ce type de zymogramme n'est pas compatible avec la coloration.

3.6 Purification de protéines

3.6.1 Préparation des cultures pour la purification

L'expression de l'enzyme d'intérêt a eu lieu dans un volume de 500 mL de milieu M14-xylose chez l'hôte *S. lividans* 10-164. Après 72h à 34°C, la culture a été soumise à une première filtration à l'aide d'un papier filtre de marque Whatman de grade no. 3 (porosité de 6 µm) et d'un entonnoir Büchner en porcelaine prévu à cet effet. Cette étape a permis d'éliminer le mycélium. En second lieu, une deuxième filtration, cette fois à l'aide d'une membrane de nylon avec des pores d'une grosseur de 0.22 µm, a été effectuée afin d'éliminer les particules plus fines. Le filtre a été placé dans une unité de filtration reliée, par un tube de caoutchouc, à un système de pression négative.

Le surnageant filtré a été concentré par ultrafiltration (système Amicon). Les membranes filtrantes utilisées (Millipore) étaient composées de cellulose régénérée et retenaient toutes les protéines ayant un poids moléculaire plus élevé que 10 000 Da. Les membranes ont été lavées avec de l'eau milliQ avant d'être placées dans la cellule Amicon. Par la suite, l'ultrafiltration a été effectuée sous une pression d'azote. Le filtrat a été disposé de façon appropriée alors que le surnageant contenant les protéines concentrées a été utilisé lors de la chromatographie.

3.6.2 Chromatographie à interaction hydrophobe

Un système de chromatographie liquide de type FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) a permis la purification de la protéine désirée à 4°C. Une colonne de 5 mL Butyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) a été connectée à l'appareil. La tubulure sortant de la colonne était reliée à un détecteur UV (Waters 484) dont la longueur d'onde a été établie à 280 nm. Une pompe quaternaire reliée à 4 solutions différentes était également branchée à l'appareil.

Toutes les solutions utilisées lors de la chromatographie ont été filtrées à l'aide d'une membrane de nylon 0.22 µm. Précédant le passage de l'échantillon, la colonne a été équilibrée successivement avec 5 volumes d'eau milliQ, 5 volumes du tampon d'élution (50 mM K_2PO_4-KH_2PO_4 pH 7) et 5 volumes du tampon de départ (le même tampon avec 1 M de $(NH_4)_2SO_4$).

Une fois la colonne équilibrée, la salinité de l'échantillon a aussi été ajustée en ajoutant 1 volume de tampon 100 mM K_2PO_4-KH_2PO_4 pH 7 + 2 M $(NH_4)_2SO_4$ à 1 volume de surnageant concentré. Par la suite, l'échantillon a été appliqué sur la colonne à l'aide de la boucle d'injection. Le gradient utilisé afin de séparer les protéines est décrit en détails dans le Tableau 3.V. Le collecteur de fractions relié à l'appareil a été programmé afin de récolter une fraction toutes les 2 minutes.

Tableau 3.V : Gradient d'élution suivi lors de la purification de l'enzyme sur une colonne Butyl Sepharose 4 Fast Flow.

Temps (min)	% Tampon A (50 mM KP pH 7)	% Tampon B (50 mM KP pH 7 + 1 M $(NH_4)_2SO_4$)	% Tampon C (Éthylène glycol 50 %)	Débit (mL/min)
Initial	0	100	0	2
60	100	0	0	2
80	100	0	0	0,5
110	0	0	100	0,5
150	0	0	100	0,5

3.7 Caractérisation physico-chimique des enzymes lipolytiques

La caractérisation de l'enzyme purifiée a été accomplie par des essais en spectrophotométrie avec différents esters de *p*-nitrophényl synthétiques. La longueur des chaînes carbonées des différents substrats lipidiques variait entre 4 et 18 carbones. Le *p*-nitrophénol libéré lors de la réaction enzymatique prenait une couleur jaune dont l'absorbance a été suivie à 405 nm. Le spectrophotomètre Cary WinUV 300 utilisé était connecté à un ordinateur dans lequel un programme informatique a permis l'enregistrement des données obtenues lors d'une cinétique en temps réel. Toutes les cinétiques ont été effectuées en triplicata sur une période de 5 minutes pendant laquelle les D.O. variaient entre 0 et 1.5.

De plus, les réactions ont été effectuées dans un volume réactionnel de 2 mL, dans lequel se trouvait 0.3 mM du substrat à hydrolyser. Une cuvette de référence a également

permis, pour chacune des réactions, de soustraire toute activité reliée à l'hydrolyse spontanée des substrats.

3.7.1 Courbes standards de *para*-nitrophénol

Les courbes standard ont servi à calculer les UI de l'enzyme purifiée (µmoles de *p*-NP libérés par minute) et à comparer les résultats lors de la détermination du pH optimal. Des concentrations connues de *p*-NP variant entre 0 et 100 µM ont été préparées dans les différents tampons utilisés (section 3.7.2). Les pentes obtenues représentaient la relation linéaire entre la quantité de *p*-NP (µmoles) présente dans les cuvettes et la densité optique à 405 nm.

3.7.2 Détermination du pH optimal

Un tampon Tris-HCl a été préparé lorsque le pH variait entre 7 et 9 alors qu'un tampon NaOH-glycine a servi pour la préparation des tampons à pH entre 9 et 11. Tous les tampons ont été préparés à 50 mM avec 0.05 % de $CaCl_2$.

Afin de déterminer le pH optimal, les tests enzymatiques ont été effectués à température pièce contre le *p*-NP décanoate.

3.7.3 Détermination de la température optimale

Les essais ayant permis la détermination de la température optimale ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM avec 0.05 % de $CaCl_2$ à pH 8.5. Les réactions enzymatiques ont eu lieu à des températures variant entre 25 et 70°C. Pour ce faire, les cuvettes contenant le tampon réactionnel ont été placées dans le spectrophotomètre relié à un bain chauffant possédant une pompe afin de faire circuler l'eau chaude dans l'appareil. Un thermomètre a permis de vérifier la température du tampon à l'intérieur des cuvettes. Lorsque la température était stable pendant au moins 5 minutes, la réaction a débuté. Le substrat utilisé était le *p*-NP décanoate (*p*-NP C10).

3.7.4 Détermination du substrat préférentiel

Les substrats utilisés pour cette expérience étaient les suivants : le *p*-NP butyrate (C4), le *p*-NP valérate (C5), le *p*-NP caprylate (C8), le *p*-NP décanoate (C10), le *p*-NP laurate (C12), le *p*-NP myristate (C14), le *p*-NP palmitate (C16) et le *p*-NP stéarate (C18). L'hydrolyse des différents substrats synthétiques a été effectuée dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 avec 0.05 % de $CaCl_2$ à une température de 60°C.

3.7.5 Thermostabilité

L'enzyme purifiée a été diluée dans un tampon potassium-phosphate 50 mM pH 7 puis incubée dans un bloc chauffant pour une période de 30 minutes à des températures variant entre 30 et 90°C. L'activité résiduelle a été vérifiée à 60°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 avec 0.05 % de $CaCl_2$ contre le substrat *p*-NP décanoate.

3.7.6 Effet de différents composés sur l'activité

L'enzyme purifiée a été incubée en présence de 10 mM de $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ et $HgCl_2$. Également, quelques inhibiteurs connus, dont l'acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA), le paraméthyl sulfonyl fluoride (PMSF) et le dithiothréitol (DTT), ont aussi été incubés à des concentrations de 1 et/ou 10 mM en présence de l'enzyme. Les incubations ont eu lieu dans un tampon 25 mM à pH 7 pendant 1h à la température de la pièce. Par la suite, l'activité enzymatique a été déterminée à 60°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 avec 0.05 % de $CaCl_2$ contre le substrat *p*-NP décanoate.

De plus, la stabilité de l'enzyme a été étudiée en présence des solvants suivants : acétonitrile, diméthyl sulfoxide (DMSO), éthanol, méthanol, acétone et isopropanol en concentrations de 10 et 30 %. L'incubation et l'étude de l'activité ont été effectuées tel que mentionné dans le paragraphe précédent.

Enfin, la stabilité et l'activité de l'enzyme ont également été examinées en incubant cette dernière en présence de différents agents tensioactifs (SDS, Triton X-100, Tween 80), oxydants (H_2O_2) et autres composés se retrouvant fréquemment dans les détergents (borate de sodium et carbonate de sodium). L'incubation a eu lieu pendant 1h à la température de la pièce. Les concentrations utilisées se situaient entre 1 et 5 % et

l'incubation ainsi que le calcul de l'activité se sont déroulés tel que cité dans la présente section. Au moment d'effectuer les tests en spectrophotométrie, la quantité résiduelle des agents tensioactifs ne dépassait pas 0.001 %.

3.8 Immobilisation

L'enzyme purifiée a été immobilisée sur deux supports différents : la terre de diatomée, aussi appelée diatomite, ainsi que sur un gel de silice aminopropylé (Fluka). Afin de comparer la charge de protéines liées à ces deux types de support, deux méthodes ont été utilisées : la liaison par adsorption et par liaison covalente.

3.8.1 Immobilisation par adsorption

Premièrement, une quantité égale à 150 mg des deux matrices a été pesée dans un microtube de 2 mL. Par la suite, les supports ont été lavés en agitant 5 minutes dans 1 mL de tampon potassium-phosphate 50 mM pH 7. Le tampon a été éliminé après une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm. Ensuite, l'enzyme purifiée (environ 250 µg) a été appliquée sur le support et le volume a été ajusté à 1 mL avec le tampon cité précédemment. Les tubes ont été agités pendant 1h à température pièce puis centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm. Les protéines du surnageant ont été conservées pour être dosées par la méthode de Bradford (section 3.4.1), permettant ainsi de déterminer la quantité de protéines adsorbées. Également, le taux de désorption a été étudié en lavant 3 fois pendant 5 minutes les supports puis en dosant les protéines du surnageant. La quantité de protéines adsorbée sur 150 mg de support a été extrapolée afin d'établir la quantité pouvant être immobilisée sur 1 g de matrice.

3.8.2 Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été effectuée uniquement pour le support de silice aminopropylé. Ce dernier a été pesé et lavé tel que mentionné dans la section 3.8.1. Contrairement au protocole pour la liaison par adsorption, le support a dû être activé par une incubation en présence de 2 % de glutaraldéhyde pendant 5 minutes en agitant à la température de la pièce. Suite à l'activation de la matrice, le gel de silice

aminopropylé a été lavé 3 fois pendant 5 minutes en changeant de tampon entre chaque lavage afin d'éliminer toute trace de glutaraldéhyde. L'enzyme a par la suite été ajoutée et l'immobilisation a eu lieu tel qu'indiqué dans la précédente section.

4. RÉSULTATS

4.1 Criblage et séquençage des clones positifs

4.1.1 Criblage de la banque cosmidique

L'ADN génomique extrait de la biomasse du bioréacteur alimenté avec de la viande (fermenteur F1) a été utilisé pour la construction d'une banque cosmidique (Hupé 2008). Une partie de celle-ci a été transfectée chez l'hôte *E. coli*. Chaque cosmide contenait un fragment d'ADN d'une taille d'environ 40 kb provenant d'un micro-organisme présent dans le fermenteur. La banque génomique a par la suite été criblée sur des Pétri contenant 1% du substrat tributyrine (C4 :0) afin de détecter toute activité lipolytique reliée à des enzymes de type estérases ou lipases. Au moment du criblage, près d'une dizaine de clones sur les 5000 criblés présentaient une zone d'hydrolyse. Parmi ces clones, deux ont été retenus pour la présente étude. La Figure 4.1 illustre deux géloses sur lesquelles les deux clones étudiés sont présentés. Ces clones ont été nommés lipIAF1-1 et lipIAF1-6.

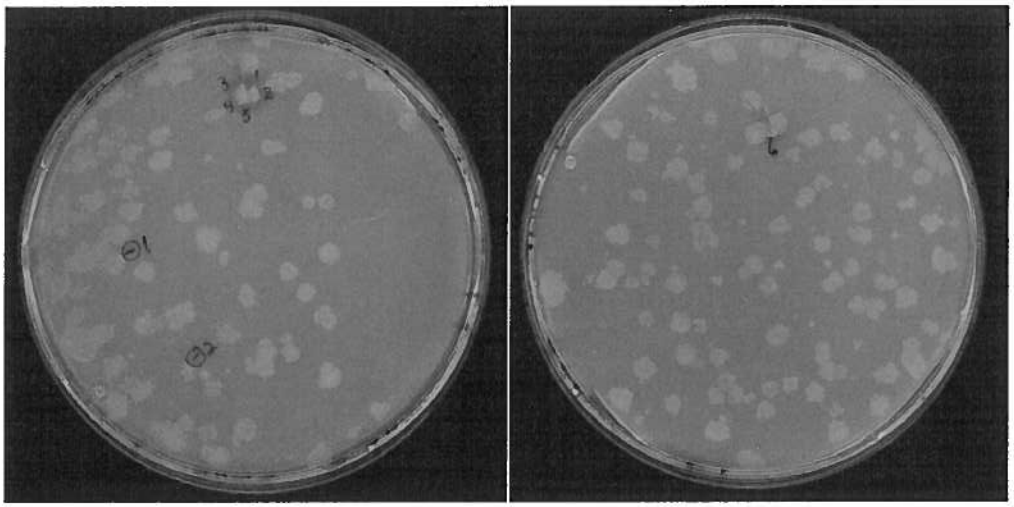


Figure 4.1 : Résultats du criblage des cosmides transfectés chez l'hôte *E. coli*. Les flèches rouges représentent les clones positifs lipIAF1-1 (gauche) et lipIAF1-6 (droite).

4.1.2 Isolement des cosmides et sous-clonage

Les cosmides de deux clones positifs identifiés ont d'abord été isolés de la souche de *E. coli* et digérés avec l'enzyme de restriction SphI afin d'analyser leur patron de digestion respectif. Cette étape était nécessaire afin de s'assurer qu'il s'agissait bel et bien de deux cosmides distincts. Par conséquent, les puits 1 et 2 de la Figure 4.2 représentent le patron de digestion SphI des deux cosmides. Le nombre et la taille des fragments d'ADN observés sont différents, indiquant qu'il s'agit de deux cosmides contenant des inserts différents.

Par la suite, afin de pouvoir identifier les séquences d'ADN des gènes codant pour les deux enzymes lipolytiques, un sous-clonage a été effectué avec une aliquote de la digestion enzymatique afin d'éliminer certains fragments d'ADN des cosmides de 40 kb. Pour ce faire, une ligation a été effectuée avec le produit de la digestion SphI. Ainsi, des fragments d'ADN de différentes longueurs se sont ligués de façon aléatoire avec le vecteur pIAFS2. Le produit de la transformation a de nouveau été criblé sur une gélose contenant 1 % de tributyrine. Après une dizaine de jours à température pièce, des transformants démontrant une zone d'hydrolyse ainsi que des transformants ne présentant aucune zone (servant de témoins négatifs) ont été mis en culture et les cosmides ont de nouveau été isolés et digérés avec l'enzyme SphI. La Figure 4.3 illustre la digestion des cosmides issus du sous-clonage. Les 3 transformants lipIAF1-1 isolés qui présentaient des zones d'hydrolyse sur tributyrine (Figure 4.3; puits 2, 5 et 6) ont tous un fragment d'environ 2600 paires de bases en commun. Ce fragment n'étant pas observé suite à la digestion SphI des transformants négatifs (Figure 4.3; puits 1, 3 et 4), il a été soupçonné que le gène lipolytique se trouve au sein de ce fragment. Ce dernier a donc été extrait du gel d'agarose, puis ligué dans le plasmide pTZ19U, transformé dans la souche *E. coli* DH11S pour des fins de séquençage (section 4.1.3).

Dans le même ordre d'idée, les 2 transformants positifs isolés issus du sous-clonage du cosmide lipIAF1-6 (Figure 4.3; puits 10 et 11) possèdent un fragment d'ADN commun d'environ 1600 paires de bases. Ce fragment a également été excisé, purifié puis cloné dans le vecteur pTZ19U afin de l'envoyer séquencer chez Génome Québec (section 4.1.4).

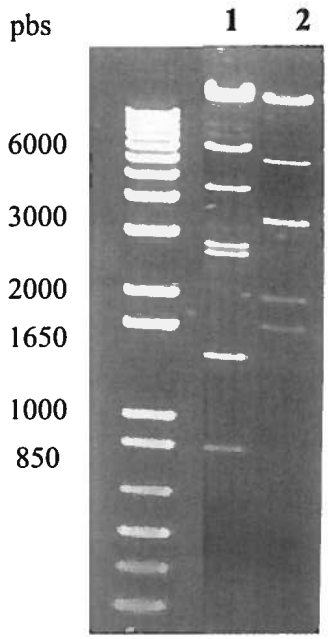


Figure 4.2 : Électrophorèse sur gel d'agarose illustrant les patrons de digestion SphI des cosmides lipIAF1-1 (puits 1) et lipIAF1-6 (puits 2) provenant des deux clones positifs issus de la banque génomique.

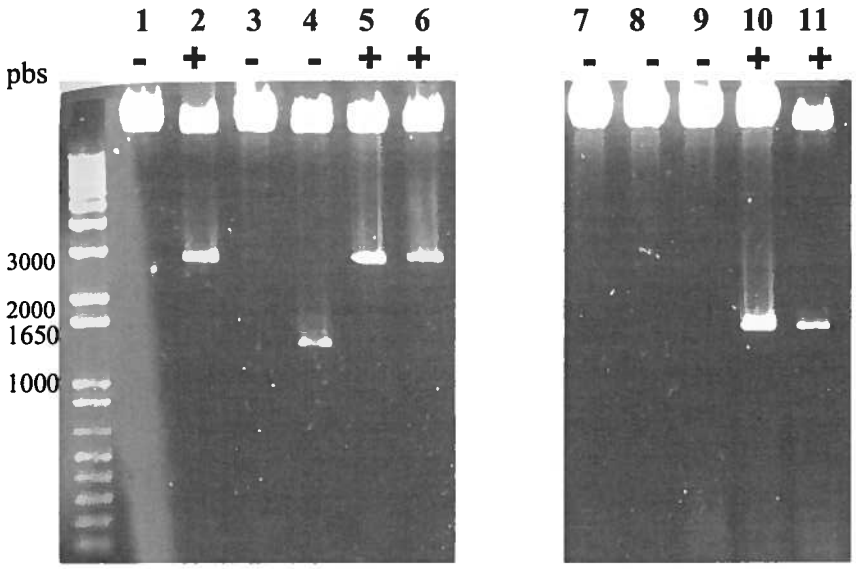


Figure 4.3 : Électrophorèse sur gel d'agarose démontrant les résultats de la digestion SphI des cosmides lipIAF1-1 et lipIAF1-6 issus du sous-clonage des fragments. Les puits 2, 5, 6, 10 et 11 représentent les cosmides positifs issus du sous-clonage des cosmides lipIAF1-1 (gauche) et lipIAF1-6 (droite) respectivement. Il en est de même pour les puits 1, 3, 4, 7, 8 et 9 représentant les cosmides négatifs.

4.1.3 Séquençage du gène de lipase provenant du cosmide lipIAF1-1

Le plasmide pTZ19U contenant l'insert d'environ 2600 paires de bases a d'abord été séquencé à l'aide des amorces universelles M13 ayant des sites de reconnaissances à l'intérieur du vecteur en amont et en aval du fragment d'ADN à séquencer. Les résultats du séquençage ont été analysés à l'aide du programme informatique Chromas 2.13. Dans un premier temps, environ 700 paires de bases ont été identifiées de chaque côté du fragment. Par la suite des amorces internes ont été synthétisées (Tableau 3.III) et ont servi au séquençage du reste du fragment. Une fois l'assemblage du brin d'ADN complété, ce dernier a été analysé à l'aide d'outils bioinformatiques, tels que Clone Manager Suite et les programmes en ligne ORF Finder et NCBI BLAST. L'insert possédait précisément 2612 paires de bases. Le logiciel ORF Finder a permis d'identifier rapidement les gènes dans les différents cadres de lecture. Conjointement avec NCBI BLASTp, il a été possible d'identifier les fonctions potentielles des protéines codées par ces gènes par homologie avec des protéines connues. Ainsi, la Figure 4.4 illustre la séquence nucléotidique d'un gène codant potentiellement pour une enzyme lipolytique. Ce gène possède 1536 paires de bases et la protéine encodée par celui-ci possède 511 acides aminés. Le contenu en GC du gène atteint 69.8 %. Au niveau de la protéine, le programme SignalP 3.0 Server a permis d'estimer la présence possible d'un peptide signal (Probabilité établie à 0.999). Ainsi, le poids moléculaire de la protéine mature a été établi à 52.8 kDa et le peptide signal présomptif est indiqué en caractères gras dans la Figure 4.4. De plus, la séquence de cinq acides aminés GH**S**MG est conforme au motif consensus GX**S**XG retrouvé chez un grand nombre de lipases (Figure 4.4).

4.1.4 Séquençage du gène de lipase provenant du cosmide lipIAF1-6

Le séquençage du fragment provenant du cosmide lipIAF1-6 a été effectué tel que mentionné dans la section 4.1.3. Les résultats du premier séquençage n'ont pas permis le chevauchement du fragment séquencé en 5' et en 3' et par conséquent, des amorces internes ont également été synthétisées (Tableau 3.III). Une fois le séquençage du fragment de 1615 paires de bases complété, un gène de 870 paires de bases avec un

contenu en GC de 67.5 % a été identifié (Figure 4.5). Ce gène code pour une protéine de 289 acides aminés. Le programme SignalP 3.0 Server a encore une fois été utilisé afin de déterminer la présence ou non d'un peptide signal. La probabilité que la protéine soit sécrétée étant très élevée (Score établi à une valeur égale à 1), le peptide signal présomptif a été identifié dans la Figure 4.5 et le poids moléculaire de la protéine mature a été établi à 27.4 kDa à l'aide du programme informatique Clone Manager Suite. Tout comme la protéine LipIAF1-1, cette enzyme possède le motif consensus GXSXG typique des enzymes lipolytiques (Figure 4.5).

```
1     atgaaaaacc aacgacgccg atggccgcgc gctgcgtcca ccgctctctt cacggccgcc gcgctgctgg cgggctgcgg
       m  k  n   q  r  r   r  w  p  r   a  a  s   t  a  l   f  t  a  a   a  l  l   a  g  c
81    cggcagcgac gaccgtccct acgatccgcc ctatcccggg gaggcggcgc gcccgcacga cgagcgcaag ttcatagcgg
      g  g  s  d   d  r  p   y  d  p   p  y  p  g   e  a  a   r  p  h   d  e  r  k   f  i  a
161   tcgagcaaag ccgcggctac acgctggcct tcaagccgct ggccgacacc gatgccttct acggccgcta ccggggcatc
       v  e  q   s  r  g  y   t  l  a   f  k  p   l  a  d  t   d  a  f   y  g  r   y  r  g  i
241   cacggcgaag cggcctatcg catcgaggtg ccgcacgtct ggaacggcat gctggtcatg tacgcccacg gctacgccgg
        h  g  e   a  a  y   r  i  e  v   p  h  v   w  n  g   m  l  v  m   y  a  h   g  y  a
321   cgagggcgag gagctgaccg ttagcttccc gtcgctccgg cagtggctga tcgacaacgg ctatgcctgg gcggcgtcca
      g  e  g  e   e  l  t   v  s  f   p  s  l  r   q  w  l   i  d  n   g  y  a  w   a  a  s
401   gctacagcgc caactactac gacgtgcgcg ccggcatcga ggacaccaac aagctcgcca acgagttcgt gaaactggtg
       s  y  s   a  n  y  y   d  v  r   a  g  i   e  d  t  n   k  l  a   n  e  f   v  k  l  v
481   gccgccggcg gccgcaccgt cagcgcgccc ggcaagatct acatcaccgg ccactcgatg ggcggccacg tggcggccgc
        a  a  g   g  r  t   v  s  a  p   g  k  i   y  i  t   g  h  s  m   g  g  h   v  a  a
561   ggcggtcgag gaggaaacct acgcctcggc ggtgaacaag gtgcgctacc acggcgcggt gccgatgtgc gccgccaccg
      a  a  v  e   e  e  t   y  a  s   a  v  n  k   v  r  y   h  g  a   v  p  m  c   a  a  t
641   gcgacgtgta tcagttcgag tacctgatga acgtcacctt cgccgcccag cacctggccg cgcagagcga cgaatcgctg
       g  d  v   y  q  f  e   y  l  m   n  v  t   f  a  a  q   h  l  a   a  q  s   d  e  s  l
721   gcgctgaccg cgcgccccgc caccaatttc gacgcggacg ccatcaacgc catcctctgg gacaccgtgc cgaccgcggg
        a  l  t   a  r  p   a  t  n  f   d  a  d   a  i  n   a  i  l  w   d  t  v   p  t  a
801   ccggaccggc gtgccgagcg aagcgggcga aatcctggcc ggcattgtcc gcaacctctc gggcggcccg cggccggcgt
      g  r  t  g   v  p  s   e  a  g   e  i  l  a   g  i  v   r  n  l   s  g  g  p   r  p  a
881   tcgagcaggg cttccgctcc gcctggttcg gcacggtcat gagcaccggc ggccgcgacg gcacggtcga cggcatcctc
       f  e  q   g  f  r  s   a  w  f   g  t  v   m  s  t  g   g  r  d   g  t  v   d  g  i  l
961   gccaaggatc tcaccggcaa catcggcacc gtctatcagt tcgacgacga tgtcgagctc agcgccgagg aacggcagtt
       a  k  d   l  t  g   n  i  g  t   v  y  q   f  d  d   d  v  e  l   s  a  e   e  r  q
1041  caacagcacc atcctccgcg tggccggcga cccgaacgcc aacgcgccgc gccggaacgg cctgcgctgg attccgctgg
      f  n  s  t   i  l  r   v  a  g   d  p  n  a   n  a  p   r  r  n   g  l  r  w   i  p  l
1121  tcaacgccga attccaggtg ccggtggtca ccctgcacgg cctcggcgac ccgttcgtgc cgttcaagca tcagcagatc
       v  n  a   e  f  q  v   p  v  v   t  l  h   g  l  g  d   p  f  v   p  f  k   h  q  q  i
1201  taccgccagc gcgccgagcg caacggcagc catcactggc tggtgcagcg cgccatccgc gcgccgggcc actgcgattt
       y  r  q   r  a  e   r  n  g  s   h  h  w   l  v  q   r  a  i  r   a  p  g   h  c  d
1281  cgcgctcgag gaagaggtgg aggccttcaa ggccatgctg cagtgggaac agcaaggcgt gaaaccggcg ggcgacgacg
      f  a  l  e   e  e  v   e  a  f   k  a  m  l   q  w  e   q  q  g   v  k  p  a   g  d  d
1361  tgctcgatcc ggccacggtg cgcgccgccg actacggctg cgccttcacc cgcacgcccg aggcgcagga agtggactcg
       v  l  d   p  a  t  v   r  a  a   d  y  g   c  a  f  t   r  t  p   e  a  q   e  v  d  s
1441  ttcggcgtgc tgctgaccgc gcggcgggcc gacatccccc cttgtcccgg cgccggcgaa gcgggcgacg gccccgacga
        f  g  v   l  l  t   a  r  r  a   d  i  p   p  c  p   g  a  g  e   a  g  d   g  p  d
1521  ggagccgacg gagtag
      e  e  p  t   e -
```

Figure 4.4 : Séquence nucléotidique du gène codant pour l'enzyme lipolytique provenant du cosmide lipIAF1-1 et séquence en acides aminés de la protéine encodée. La formyl-méthionine du codon initiateur est encerclée, le peptide signal présomptif est en caractères gras et le motif conservé GxSxG contenant la sérine du site actif est encadré.

```
1   atgcccatga aaattaatcg ctacgctatt ggaagcgccg ccctggcggc cggtctgctc atgtcctcgg ccgcgttcgc
     m  p  m   k  i  n   r  y  a  i   g  s  a   a  l  a   a  g  l  l   m  s  s   a  a  f

81  cgtcaatccg ggcggtggcg gcagcggctt cgcctccctg tacaaccgcg ccgaaagcga cggtcgctgc agcgttaccc
    a  v  n  p   g  g  g   g  s  g   f  a  s  l   y  n  r   a  e  s   d  g  r  c   s  v  t

161 gcctgaacgt gggcagctcg accttctaca tcccgcgcga ccccagcaac cccaacgccc gcttcaacgt gctggtgtgg
     r  l  n   v  g  s  s   t  f  y   i  p  r   d  p  s  n   p  n  a   r  f  n   v  l  v  w

241 ggtaatggca ccggcggcaa ctccctcacc tatgcgacgc tgctggagtc ggtcgccagt cactgcatcg cggtagccgc
      g  n  g   t  g  g   n  s  l  t   y  a  t   l  l  e   s  v  a  s   h  c  i   a  v  a

321 ggccaacacc gccaactccg gcaccggcgt ggagatgcag gaggcgtaca acagcctgcg ctcccgctat ggcaacatcc
    a  a  n  t   a  n  s   g  t  g   v  e  m  q   e  a  y   n  s  l   r  s  r  y   g  n  i

401 tcggctccaa ggtgtgcacg gccggccact cgcagggcgg cggcggctcc ttcaacgccg ccaaccgcat cggcgccaac
     l  g  s   k  v  c  t   a [g  h   s  q  g]  g  g  g  s   f  n  a   a  n  r   i  g  a  n

481 tgcgtgatcc cggtgcagcc ggatacccgc ttcaccacgc ggatctacag cccgctggct tcgcatgtgg aagtgatcac
      c  v  i   p  v  q   p  d  t  r   f  t  t   r  i  y   s  p  l  a   s  h  v   e  v  i

561 cctgtggggc cagatcgaca ctctggcgcc cgccagcggc aaccgcagca acgtcgagcg ggcctcgacc atcctgaccc
    t  l  w  g   q  i  d   t  l  a   p  a  s  g   n  r  s   n  v  e   r  a  s  t   i  l  t

641 aggtcgagac ttccggcgaa ggtcactttg ccccggtgag cggccgcggc ggcaagatcg gcacgatgtt ccgcatggcc
     q  v  e   t  s  g  e   g  h  f   a  p  v   s  g  r  g   g  k  i   g  t  m   f  r  m  a

721 aacatcgccc agctgagcaa cgatccggcc acggcccagg agttccgccg ggcgttctgg ggtccgacca cggattacac
      n  i  a   q  l  s   n  d  p  a   t  a  q   e  f  r   r  a  f  w   g  p  t   t  d  y

801 cgcctccacg tcgcatcccg atatcagcga ggtgcgccgc aacgccgccg cccaggcgac caccccgtaa
    t  a  s  t   s  h  p   d  i  s   e  v  r  r   n  a  a   a  q  a   t  t  p  -
```

Figure 4.5 : Séquence nucléotidique du gène codant pour l'enzyme lipolytique provenant du cosmide lipIAF1-6 et séquence en acides aminés de la protéine encodée. La formyl-méthionine du codon initiateur est encerclée, le peptide signal est en caractères gras et le pentapeptide conservé GxSxG est encadré.

4.2 Alignement des protéines avec des lipases connues

4.2.1 Homologie de l'enzyme LipIAF1-1

L'analyse métagénomique est une approche ayant été choisie afin d'identifier de nouvelles enzymes inaccessibles par les méthodes traditionnelles. Par conséquent, une fois la séquence de l'enzyme lipolytique élucidée, le logiciel disponible sur Internet NCBI BLASTp version 2.2.22 a été utilisé afin de comparer la séquence de la protéine nouvelle à celles de protéines connues (banque de données NCBI nr). Les protéines mises en évidence au moment de l'analyse BLASTp étaient majoritairement des protéines conservées dont la fonction semble encore inconnue. Deux de ces protéines présentant une certaine homologie avec la protéine LipIAF1-1 ont été retenues pour l'analyse et sont citées dans le Tableau 4.I. La protéine présentant le plus d'homologie avec l'enzyme lipolytique LipIAF1-1 est une protéine conservée de l'organisme Gram-négatif du genre *Cupriavidus*. L'alignement des séquences protéiques a été effectué à l'aide du logiciel Clone Manager Suite. Les résultats de l'alignement ont démontré que 46 % des acides aminés étaient identiques chez les deux protéines. La deuxième protéine retenue présentait 45 % d'identité avec l'enzyme LipIAF1-1. Il s'agit d'une protéine de la famille des alpha/bêta hydrolase de l'organisme thermophile Gram-positif *Deinococcus geothermalis* (Tableau 4.I). Une dernière protéine présentant de l'homologie avec la protéine d'intérêt semblait intéressante pour des fins de comparaison. En effet, la sixième protéine en ligne présentant de l'homologie avec la lipase présomptive LipIAF1-1 était une enzyme lipolytique provenant également d'une banque métagénomique. Cette dernière présentait 38 % d'homologie avec la protéine AF1 (Tableau 4.I). En alignant les trois protéines homologues avec l'enzyme LipIAF1-1, il a également été possible de confirmer l'emplacement de la sérine du site catalytique (Figure 4.6). L'emplacement hypothétique des résidus Asp (D) et His (H) impliqués dans la réaction catalytique a également été indiqué par homologie de séquence.

4.2.2 Homologie de l'enzyme LipIAF1-6

Alors que la majorité des résultats comparatifs pour l'enzyme lipolytique LipIAF1-1 démontraient de l'homologie avec des protéines conservées aux fonctions

inconnues, les résultats obtenus lors du BLASTp effectué sur l'enzyme LipIAF1-6 étaient plus concluant. En effet, les résultats obtenus lors de la comparaison de la protéine LipIAF1-6 avec celles de la banque de données NCBI nr ont démontré une incidence majoritairement avec des enzymes lipolytiques dont certaines sont bien documentées dans la littérature. Les cinq premières lipases homologues à l'enzyme LipIAF1-6 ont été retenues pour des fins de comparaison et sont nommées dans le Tableau 4.I. Toutefois, l'homologie de chaque protéine individuelle en rapport avec la protéine d'intérêt dépasse à peine 30 % d'identité. Les protéines homologues à la protéine LipIAF1-6 proviennent de micro-organismes diversifiés du genre *Pseudomonas* sp., *Geobacillus* sp., *Thermobifida* sp. ou encore d'une bactérie non cultivée dont l'ADN a été isolé par des méthodes de métagénomique. Grâce à l'homologie de séquences effectuée à l'aide du logiciel Clustal 2.0.11 et des rapports publiés sur certaines des enzymes lipolytiques homologues à la protéine LipIAF1-6, il peut être suggéré que les positions des 3 résidus catalytiques (la sérine, l'aspartate et l'histidine) soient les mêmes (Figure 4.7). Ces trois résidus, soient une sérine, un aspartate et une histidine, sont essentiels au clivage des substrats lipidiques et sont conservés dans les six séquences alignées à la Figure 4.7. Enfin, plusieurs des autres acides aminés identiques dans les différentes séquences sont des acides aminés à caractères hydrophobes (Pro, Gly, Trp, Leu, Ala, Phe, Val).

Tableau 4.I : Liste de quelques enzymes homologues aux enzymes lipolytiques LipIAF1-1 et LipIAF1-6 identifiées lors du criblage de la banque métagénomique. Les logiciels informatiques en ligne NCBI BLASTp (base de données NCBI nr) et SignalP 3.0 Server ont été utilisés respectivement pour l'homologie de séquences et déterminer la présence d'un peptide signal.

Enzymes lipolytiques	Source	Numéro de référence (GenBank)	Peptide signal (p> 0.8)	% Identité	Référence
LipIAF1-6	**Métagénome (Bioréacteur enrichi)**	**N/D**	**oui**	**100**	**Ce travail**
Lipase	Bactérie non cultivée	AAF87662	non	24	(Henne *et al.* 2000)
Lipase, chaîne A	*Pseudomonas mendocina*	2FX5_A	oui	31	(Boston *et al.* 1997)
Lipase	*Pseudomonas stutzeri* A1501	YP_001174476	oui	29	(Yan *et al.* 2008)
Lipase	*Geobacillus* sp. Y412MC10	ZP_03040339	oui	22	Non publié
Triacylglycérol lipase	*Thermobifida fusca* YX	YP_288943.1	oui	21	(Lykidis *et al.* 2007)
LipIAF1-1	**Métagénome (Bioréacteur enrichi)**	**N/D**	**oui**	**100**	**Ce travail**
Protéine présomptive conservée	*Cupriavidus taiwanensis*	YP_002008786	oui	46	(Amadou *et al.* 2008)
Protéine présomptive de la famille des alpha/bêta hydrolases	*Deinococcus geothermalis* DSM 11300	YP_605403.1	oui	45	Non publié
Lipase/estérase	Bactérie non cultivée	AAX37298.1	oui	38	Non publié

```
LipIAF1-1     AGCGGSDDRPYDPPYPGEAARPHDERKFIAVEQSRGYTLAFKPLADTDAFYGRYRGIHGE 60
YP_002008786  ----------QTPPPQAEEKRPQDDRTFTMDAAT-----LPFAALAGAPEADRWWGVQDG 45
YP_605403     ------------------ETRPQDTRTFKPVEP------ATTALAGATLYKGTYAGLHGP 36
AAX37298      ----------------GGPPQPEPEPEWFVDESK-----LPFDPLPGFEDATLAWGVLEG 39
                                   :*.    :                          *:

LipIAF1-1     AAYRIEVPHVWNGMLVMYAHGYAGEGEELTVSFPSLRQWLIDNGYAWAASSYSANYYDVR 120
YP_002008786  AGYRIEVPKNWNGRLVMYAHGYAGTGAALSVTMPSIRRHLLANGYAWAASSYAKNYYDVR 105
YP_605403     ASYLIEVPDNWNGTLVMYAHGYRGTGENLTVDPPAIRPYLIAQGYAWAASSYSANYYDVR 96
AAX37298      AGYRMEVPADWNGRLVMWAHGFRGTGLELTVDNHPLRDFLIPNGYAWAASSYSANDYNVS 99
              *.* :***  *** ***:***: * *  *:*   .:*  *: :*********: * *:*
                                                 ●
LipIAF1-1     AGIEDTNKLANEFVKLVAAGGRTVSAPGKIYITGHSMGGHVAAAAVEEETYASAVNKVRY 180
YP_002008786  AGLEDTNALALAFTRIAAQNGRTLAAPSRLYIVGHSMGGHISAAAVDEENIQAANHKVRY 165
YP_605403     AGVEDTNALALAFGKLTGG---KYPAPSKYLIMGVSMGGHIAGAAVEKETLATEQNKVNY 153
AAX37298      AGVKDTRLLVRKFRRMFGE-------PDLTYITGASMGGHITGVSVEAY-------PRVY 145
              **::**. *.  * :: .        *.   * * *****::..:*:           *

LipIAF1-1     HGAVPMCAATGDVYQFEYLMNVTFAAQHLAAQSDESLALTARPATNFDADAINAILWDTV 240
YP_002008786  HGAVPMCGVLGDTELFNYFGAYQTAAQQQAGYPVTAWPAANWAQIAPAVRAA-------- 217
YP_605403     AASLPLCGVLDETYEFQWLGDYTLVAAQLAGLGARTYPQKDYPAILPDIKAA----LFTD 209
AAX37298      AGAMPICGVMGDFELFDYFLDFNVAAQQLALG--ESYFPVPDPVEYIAVTSQQIKAELEA 203
               .::*:*.. .:   *:::     .* : *     :      .       :

LipIAF1-1     PTAGRTGVPSEAGEILAGIVRNLSGGPRPAFEQGFRS----------AWFGTVMSTGGRD 290
YP_002008786  LFTTYPGQTTAQGDTLKAIVRNLTGGQRPLFDWGFGGPGAQ------GLQDAVWSTFGQD 271
YP_605403     TSGPLWQENAGQGAKLREIARRLTGGDRPVFELGFRSG---------VWQNAVFSTGGSD 260
AAX37298      VPGGWPVALNATGEGFKQLVELQSGGDRPNFDEAWAFWNSVPEFGSGIPGNFLFDLGTGD 263
                          *  :  :..  :** ** *: .:              . : .    *
                                                                ●
LipIAF1-1     GTVDGILAKDLTGNIGTVYQFDDDVELSAEERQFNSTILRVAGDPNANAPRRNGLRWIPL 350
YP_002008786  GSVNGILTQNVVNTTGITFQFDNDPAQSVAEQSFNAGIFRVTGSAEANRARSDGLRWIPR 331
YP_605403     GTVGGILNKNFYGNVGRIYRWTDGPTPTPAEVALNNAILRVEADPNANAARPGGLRWIPR 320
AAX37298      GTLPGRPGVSVDN-TDTVYQLDLDPALSPAEVELNANIVRVAADPFAREAR--GLSNVPP 320
              *:: *    .. .  .  ::   .   :  *  :*  *.** ... *. .*  **  :*
                          ●
LipIAF1-1     VNAEFQVPVVTLHGLGDPFVPFKHQQIYRQRAERNGSHHWLVQRAIRAPGHCDFALEEEV 410
YP_002008786  TNARISVPVVTLHTLGDMYVPFSMEQIYKRRADANGTAQWLVQRAIRGVSHCDFTVAEQA 391
YP_605403     INGEFSVPVLTLHTLGDFYVPFAHEQNYRLAAQKHGSADHLVQRAIRAAGHCEFDGAEVV 380
AAX37298      ISGDISMPVLSLHNLGDMFVPFHNEIVYANEVAAHGASDLLVQRAIRGVGHCDFTPTELV 380
               .. :.:**::** *** :***  :  *   .  :*: . *******. .**:*   * .

LipIAF1-1     EAFKAMLQWEQQGVKPAGDDVLDPATVRAADYGCAFTRTPEAQEVDSFGVLLTARRADIP 470
YP_002008786  RAFDDMVNWEQNGVKPAGDEVLDAATVASPAYGCKFTDNTLVSGDESP--TTAALRPSVA 449
YP_605403     EALNDLVQWEKTGVKPAGDDVLNPATVADPNYGCRFTR---------------VTRPGVA 425
AAX37298      TAFVDLVGWVEFGVKPAGDVVTDPAAVAAPDYGCRFTDFATG------------THLLPA 428
               *:  :: * : ******* * :.*:*  . *** **                  :   .

LipIAF1-1     PCPGAGEAGDGPDEEPTE 488
YP_002008786  QAFPCTPG---------- 457
YP_605403     ACPPTP------------ 431
AAX37298      PCP--------------- 431
               .
```

Figure 4.6 : Alignement des séquences en acides aminés entre l'enzyme LipIAF1-1 et les trois protéines homologues à l'aide du logiciel Clustal 2.0.11. L'emplacement des résidus catalytiques potentiels (Ser, Asp, His) est indiqué par un point noir. La légende pour les symboles est la suivante : « * » : a.a. conservés au sein de toutes les séquences; « : » : les a.a. modifiés font partie du même groupe; « . » : a.a. semi-conservés.

```
LipIAF1-6     ------------------------------------------------VNPGGGGSGF 10
2FX5_A        -------------------------------------------------APLPDTPGAPF 11
YP_001174476  -------------------------------------------------APLPDTPGAPF 11
AAF87662      MCSSVREREGETMQASQSLLSLFTIAACSTALMGCLEAADQGGLDEELELGSAEQEAGTF 60
ZP_03040339   ----------------------------------------------IIIHSNIPELADG 13
YP_288943.1   ----------------------------------ATALVTAVSLAAPAHAANPYERGPNP 26

LipIAF1-6     ASLYNRAESDGRCSV---TRLNVGSSTFYIPRDPSNPNARFNVLVWGNGTGGNSLTYATL 67
2FX5_A        PAVANFDRSGPYTVS---SQSEGPSCRIYRPRDLGQGGVRHPVILWGNGTGAGPSTYAGL 68
YP_001174476  PSVSSFDNDGPYAVT---SQSEGPNCRVYRPRTLGQGGVRHPIILWGNGTGTGPTTYSGL 68
AAF87662      PPVSDFAATGPFSTT---SGSLGLSCTVYRPSNLGQGGVTHPVILWGNGTGSSPSTYAGL 117
ZP_03040339   SIEQRYAQKGSYHVKVEEVKRMSGEALFRIYYPAFQEDESYPIISWGNGTDATPDRYDEL 73
YP_288943.1   TDALLEARSGPFSVSEERASRFGADGFGGGTIYYPRENNTYGAVAISPGYTGTQASVAWL 86
              .        .              .          . .  .  :  . *          *
                                                                          ●
LipIAF1-6     LESVASHCIAVAAANTANSGT--GVEMQEAYNSLRSRYGNILG--------SKVCTAGHS 117
2FX5_A        LSHWASHGFVVAAAETSNAGT--GREMLACLDYLVRENDTPYGTYSGKLNTGRVGTSGHS 126
YP_001174476  LTHWASHGFVVAAAETSNAGT--GREMLACLDYLVQESNRTYGTYVGVLNTGRVGTSGHS 126
AAF87662      LRHLASHGFIVAAADTSNAGN--GSEMISCLNSLVSANGSVLSPFYQKVDTARVGASGHS 175
ZP_03040339   LTHLASWGFIVIDSYSKTTGT--GKEIVEAIDYLKNENEQANSLFYQKIQMEHIGVAGHS 131
YP_288943.1   GERIASHGFVVITIDTNTTLDQPDSRARQLNAALDYMINDASSAVRSRIDSSRLAVMGHS 146
                  **  : *    : .:    . .       *        .         :: . ***
                                                                        ●
LipIAF1-6     QGGGGSFNAA-NRIGANCVIPVQPDTR------FTTRIYSPLASHVEVITLWGQIDTLAP 170
2FX5_A        QGGGGSIMAG-QDTRVRTTAPIQPYT-----LGLGHDSASQRRQQGPMFLMSGGGDTIAF 180
YP_001174476  QGGGGSIMAG-QDDRVKATAPIQPYT-----IGLGHDSSSQRNQRGPMFLMSGGADTIAI 180
AAF87662      QGGAGTIMAG-RDSRVTATAPLQPYIG-FIPFGGLFLDSSIRQQRGPMFLVSGSSDTIAV 233
ZP_03040339   QGATGVINAHTNYKSGSLIKTVVSIALPDLKHCDPEDVYDTARITVPFLIMGGTRDFIIS 191
YP_288943.1   MGGGGTLRLASQRPDLKAAIPLTPWH----------LNKNWSSVRVPTLIIGADLDTIAP 196
               *. * :    .        .: .              .        : : .  * :
                                          ●
LipIAF1-6     ASGNRSNVER-ASTILTQV--ETSGEGHFAPVSGRGGKIGTMFRMANIAQLSNDPATAQE 227
2FX5_A        PYLNAQPVYRRANVPVFWG--ERRYVSHFEPVGSGGAYRGPSTAWFRFQLMDDQDARATF 238
YP_001174476  PYLNAQPVFTRANVPIFWG--ERRYVSHFEPVGNGGEYRGPSTAWFRYQLMDDQSARSTF 238
AAF87662      PTINQLPVYNGVNQPVWWA--TRSGASHFEPVGSAAPSAARSPRGSALAS---------- 281
ZP_03040339   PVSTNQLALHNTHASTPVMMGMAKGAAHTAIEGNGGNHRGYLTAWMRYRLFDDQEAMKAF 251
YP_288943.1   VLTHARPFYNSLPTSISKAYLELDGATHFAPNIPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYTQFL 256
                                          *

LipIAF1-6     FRRAFWGPTTDYTASTSHPDISEVRRNAAAQATTP 262
2FX5_A        YGAQCSLCTSLLWSVERRGL--------------- 258
YP_001174476  YGRLCRLCTSLLWSVERKGIE-------------- 259
AAF87662      ------------------------------------
ZP_03040339   HGDSSEMMHNANWVDVEQANMDDHTFVNP------ 280
YP_288943.1   CPGPRDGLFGEVEEYRSTCPF-------------- 277
```

Figure 4.7 : Alignement des séquences en acides aminés entre l'enzyme lipolytique LipIAF1-6 et les 5 protéines homologues effectué à l'aide du logiciel Clustal 2.0.11. Les résidus de la triade catalytique (Ser, Asp, His) sont indiqués par un point noir. La légende est la même que celle indiquée dans la Figure 4.6.

4.3 Clonage des gènes codant pour des enzymes lipolytiques

4.3.1 Clonage et expression chez *E. coli*

Les sites de restriction présents dans la cassette de clonage du vecteur pIAF841 sont HindIII (AAGCTT), SphI (GCATGC), EcoRI (GAATTC) et SacI (GAGCTC). Or, les sites SphI et SacI n'ont pu être insérés en amont et en aval du gène codant pour l'enzyme LipIAF1-1 puisque le site SphI est présent en position 287 et le site SacI en position 1015 (Figure 4.4). Par conséquent, préalablement au clonage du gène, le site SacI a été muté par une méthode de PCR par chevauchement à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 3.III). Par la suite, les amorces pour l'amplification du gène ont été synthétisées en insérant les sites de restriction HindIII (en 5') et SacI (en 3'). Quant au gène codant pour la protéine LipIAF1-6, il ne contient aucun des 4 sites de restriction cités et lors de la synthèse des oligonucléotides en vue de l'amplification du gène, les sites SphI et SacI ont été insérés en 5' et en 3' respectivement.

Une fois le clonage effectué dans la souche de *E. coli* BL21/pREP4 et les transformants obtenus, l'expression des protéines a été réalisée par une culture de 16 h à 37°C dans le milieu 2xTY. Par la suite, une aliquote des surnageants concentrés à l'acétone (16 x plus concentré pour LipIAF1-1 et 5 x plus concentré pour LipIAF1-6) a été migrée sur un gel SDS-PAGE. Suivant la migration, le gel contenant le surnageant de la culture AF1 a été soumis à un zymogramme en présence de 100 µM de MUF-butyrate. Le puits 5 de la Figure 4.8 A révèle une zone fluorescente au poids moléculaire attendu de la protéine LipIAF1-1, soit aux alentours de 55 kDa. Cette bande fluorescente est absente dans le puits 4 où ont migré les protéines provenant du surnageant de la culture servant de contrôle négatif. Toutefois, malgré l'observation d'une activité lipolytique lors du zymogramme, aucune protéine de 52.8 kDa surexprimée n'a été observée suite à la coloration au bleu de Coomassie (Figure 4.8 A, puits 3).

Le zymogramme pour la culture provenant du clone lipIAF1-6 a été fait différemment. Deux gels SDS-PAGE identiques ont été migrés en parallèle. Après la migration, un des deux gels a été juxtaposé à une gélose contenant 1 % d'huile d'olive et 0.01% de rhodamine B alors que le deuxième gel a été coloré au bleu de Coomassie. La souche utilisée comme contrôle ne produit pas de protéines extracellulaires capables

d'hydrolyser ce substrat. La Figure 4.8 B démontre une activité positive sur huile d'olive, à l'endroit où le poids moléculaire de la protéine LipIAF1-6 est attendu. Également, le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie révèle une bande protéique à une hauteur d'environ 27 kDa, correspondant au poids attendu. La quantité de la protéine LipIAF1-6 est visiblement supérieure aux autres protéines sécrétées (Figure 4.8 B).

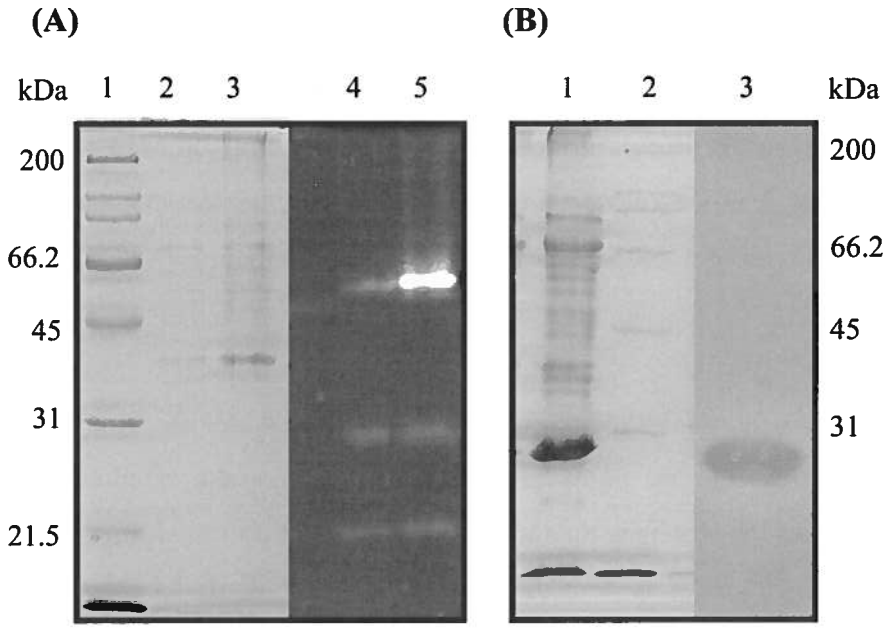


Figure 4.8 : Détection par zymogramme de l'activité lipolytique des protéines sécrétées chez *E. coli* par les clones lipIAF1-1 et lipIAF1-6 suivie de l'analyse des protéines sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (A) Puits (1) : marqueur de poids moléculaire, (2) : témoin négatif, (3) protéines extracellulaires du clone lipIAF1-1, (4 et 5) zymogramme des cultures témoins et LipIAF1-1 avec le substrat fluorescent MUF-C4. (B) Puits (1) : protéines extracellulaires du clone lipIAF1-6, (2) marqueur de poids moléculaire et (3) zymogramme effectué par diffusion des protéines sur une gélose contenant de l'huile d'olive.

4.3.2 Clonage et expression chez *S. lividans*

Les mêmes produits d'amplification décrits dans la section 4.3.1 ont été utilisés afin de liguer les gènes lipIAF1-1 et lipIAF1-6 dans le plasmide pIAFC109 puis transformés chez l'hôte *S. lividans* 10-164. Les plasmides ont été isolés et digérés avec les enzymes de restriction appropriées afin de vérifier la présence de l'insert. Par la suite, l'expression a eu lieu d'abord pendant 48 h en milieu TSB pour la croissance du mycélium, suivie d'une culture de 72 h en milieu minimal M14 contenant comme source de carbone 1 % de xylose. Les surnageants ont été récoltés, concentrés à l'acétone et migrés sur un gel SDS-PAGE où l'activité lipolytique a été détectée à l'aide d'un zymogramme avec le substrat chromogénique MUF-butyrate tel que mentionné précédemment (Figure 4.9 A et B).

Le substrat fluorogénique MUF-butyrate est très sensible et encore une fois, une zone fluorescente au poids moléculaire attendu a été révélée lors du zymogramme effectué sur les protéines du surnageant provenant du transformant lipIAF1-1 (Figure 4.9 A; puits 3). Toutefois, lors de la coloration au bleu de Coomassie du gel SDS-PAGE, aucune protéine de 52.8 kDa ne s'est démarquée des autres protéines extracellulaires (Figure 4.9 A; puits 1). Le rendement de l'expression de l'enzyme lipolytique LipIAF1-1 était faible pour les deux hôtes choisis et par conséquent, cette enzyme n'a pas été retenue pour la purification et la caractérisation.

Quant à l'enzyme lipolytique LipIAF1-6, cette dernière semble bien exprimée tant chez l'hôte *E. coli* (section 4.3.1) que *S. lividans*. En effet, en examinant les protéines sécrétées par la souche transformée avec le gène lipIAF1-6 (Figure 4.9 B; puits 2), une protéine au poids moléculaire d'environ 30 kDa est visiblement surexprimée par rapport aux autres protéines du surnageant. De plus, suite au zymogramme, une zone d'activité est apparue à la même hauteur que la protéine surexprimée, laissant croire qu'il s'agissait de l'enzyme lipolytique recherchée (Figure 4.9 B; puits 3).

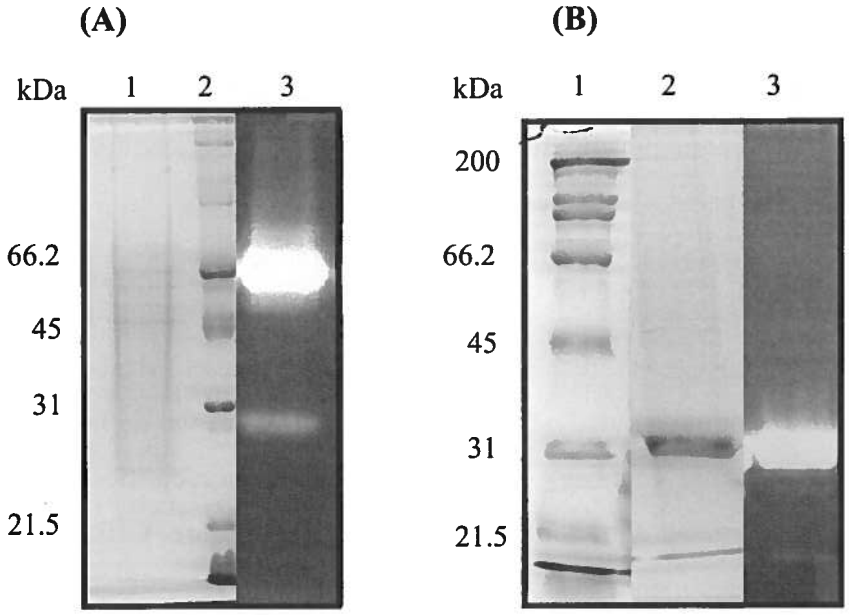
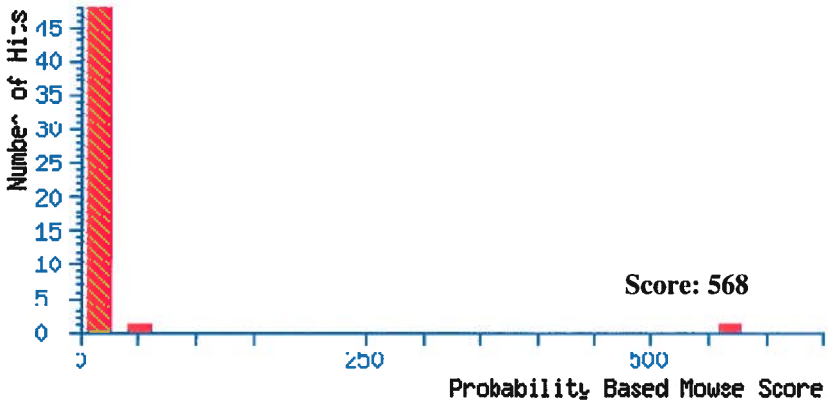


Figure 4.9 : Détection par zymogramme (MUF-C4) de l'activité lipolytique des protéines sécrétées chez *S. lividans* 10-164 par les clones lipIAF1-1 et lipIAF1-6 suivie de l'analyse des protéines sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (A) Puits (1) : protéines sécrétées par le clone lipIAF1-1, (2) : marqueur de poids moléculaire, et (3) : zymogramme. (B) Puits (1) : marqueur de poids moléculaire, (2) : protéines sécrétées par le clone lipIAF1-6 et (3) zymogramme.

4.3.3 Analyse en spectrométrie de masse de l'enzyme LipIAF1-6

Afin d'affirmer avec assurance que la bande protéique surexprimée dans les surnageants de culture provenant des transformants lipIAF1-6 correspondait à celle-ci, la protéine a été excisée du gel SDS-PAGE de la Figure 4.8 afin d'être analysée en spectrométrie de masse. Après la digestion tryptique et l'analyse des peptides, le logiciel Mascot a été utilisé afin de déterminer l'identité de la protéine. Ce logiciel calcule les probabilités que les peptides identifiés appartiennent à diverses protéines connues retrouvées dans la banque de données MSDB. Par contre, la protéine LipIAF1-6 était absente de cette banque puisqu'elle provenait d'une banque génomique construite suite à l'extraction de la biomasse d'organismes nouveaux et inconnus. Puisque la séquence protéique a été déterminée lors du séquençage du gène (section 4.1.4), il a été possible d'ajouter à la banque de données la séquence de cette protéine. Ainsi, la Figure 4.10 A illustre les résultats de la recherche à l'aide du logiciel Mascot, qui indiquent la probabilité que la protéine analysée corresponde à la séquence de la protéine LipIAF1-6 ajoutée à la banque de données. Également, les peptides identifiés lors de l'analyse en spectrométrie de masse sont teintés en gris dans la Figure 4.10 B. Les différentes séquences protéiques identifiées couvrent l'ensemble de la protéine. Différents indices retenus lors de cette analyse ont également permis d'estimer la position du site de clivage du peptide signal. D'une part, le logiciel SignalP 3.0 Server prévoyait le clivage après le 27e acide aminé (Référence à la Figure 4.5). D'autre part, le peptide en N-terminal VNPGGGGSGFASLYNR a été identifié. Le premier acide aminé de ce peptide, soit la valine, n'est pas précédé d'une arginine ou d'une lysine. Or, la digestion tryptique s'effectue toujours en aval d'un de ces deux acides aminés, ce qui mène à la conclusion qu'une autre enzyme, telle une peptidase, serait responsable du clivage en amont de la valine.

(A)



(B)

```
1   mpmkinryai gsaalaagll mssaafavnp ggggsgfasl ynraesdgrc
51  svtrlnvgss tfyiprdpsn pnarfnvlvw gngtggnslt yatllesvas
101 hciavaaant ansgtgvemq eaynslrsry gnilgskvct aghsqggggs
151 fnaanrigan cvipvqpdtr fttriyspla shvevitlwg qidtlapasg
201 nrsnverast iltqvetsge ghfapvsgrg gkigtmfrma niaqlsndpa
251 taqefrrafw gpttdytast shpdisevrr naaaqattp
```

Figure 4.10 : Résultats obtenus en spectrométrie de masse lors de l'analyse de la protéine LipIAF1-6. (A) Illustration du Mowse Score, qui correspond au calcul de probabilité permettant d'établir la nature probable de la bande excisée; (B) peptides identifiés en SM couvrant l'ensemble de la protéine LipIAF1-6 (en gris).

4.4 Purification de l'enzyme lipolytique LipIAF1-6

4.4.1 Chromatographie à interaction hydrophobe

Afin de purifier l'enzyme LipIAF1-6 pour la caractérisation biochimique, l'hôte *S. lividans* 10-164 a été choisi. Un volume de 500 mL de milieu minimal M14 a été préparé et ensemencé tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Une fois le mycélium éliminé après 72 h de culture, le surnageant a été concentré 14.4 fois par ultracentrifugation et 31 mg de protéines ont été équilibrés afin d'ajuster le pH initial à 7 et la molarité en sulfate d'ammonium à 1 M avant la purification.

L'enzyme lipolytique a été purifiée grâce à une chromatographie à interaction hydrophobe avec une colonne HiTrap Butyl FF. Le gradient descendant de sulfate d'ammonium a été effectué sur une période de 60 minutes suivi d'un plateau sans sels et d'un deuxième gradient ascendant d'éthylène glycol tel que décrit dans la section 3.6.2. Une quantité égale à 50 µL des fractions a été incubée sur une gélose contenant 1 % de tributyrine. Aucune activité lipolytique n'a été observée dans la fraction suivant le passage de l'échantillon, démontrant que la lipase LipIAF1-6 avait bien adhéré à la colonne hydrophobe alors que la majorité des protéines se sont retrouvées dans cette fraction. L'élution de la protéine désirée a débuté vers la fin du gradient salin et s'est poursuivie lors du gradient d'éthylène glycol. Toutes les fractions positives ont été mises en commun et la pureté de la protéine a été vérifiée sur un gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent (Figure 4.11). Une seule étape de purification a été nécessaire afin de récupérer l'enzyme d'intérêt.

4.4.2 Rendement de purification

Après la mise en commun des fractions purifiées issues de la chromatographie, l'enzyme LipIAF1-6 a été dosée par la méthode de Bradford et l'activité a été mesurée à l'aide du substrat synthétique *para*-nitrophényl décanoate à 21°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % de $CaCl_2$. Ainsi, l'activité lipolytique des protéines du surnageant brut a été comparée à celle de la protéine purifiée et un tableau de purification a été préparé (Tableau 4.II). À l'aide d'une courbe standard, les données obtenues ont été converties afin d'obtenir des unités internationales (UI) exprimées en µmoles de *p*-NP

libéré par minute. En somme, un rendement de 91.7 % a permis la récupération de la quasi-totalité de l'activité enzymatique lors de l'unique étape de purification. La protéine AF6 représentait près de la moitié des protéines du surnageant et par conséquent, l'activité spécifique a presque doublé, passant de 690 UI/mg pour le surnageant brut à 1308 UI/mg pour l'enzyme purifiée. Enfin, le taux de purification a été de 1.9 (Tableau 4.II).

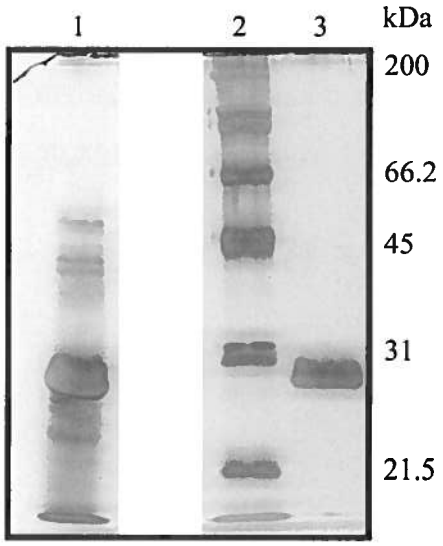


Figure 4.11 : Gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent illustrant une aliquote de surnageant brut (1), le marqueur de poids moléculaire (2) et une aliquote de la protéine LipIAF1-6 purifiée après le passage sur une colonne hydrophobe HiTrap Butyl FF.

Tableau 4.II : Tableau de purification de l'enzyme LipIAF1-6.

Étapes de purification	**Activité totale (UI)[b]**	**Protéines totales (mg)[a]**	**Activité spécifique (UI/mg)[b]**	**Rendement (%)**	**Taux de purification**
Surnageant brut	21390	31	690	100,0	1,0
Protéine purifiée	19620	15	1308,0	91,7	1,9

[a] Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford

[b] L'activité enzymatique a été déterminée à 21°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ avec le substrat *p*-nitrophényl décanoate (*p*-NP C_{10})

4.5 Caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée

4.5.1 Détermination du pH optimal

Afin de déterminer le pH optimal de l'enzyme, des tampons Tris-HCl 50 mM + 0.05 % de $CaCl_2$ ont été préparés à des pH entre 7.2 et 9 alors que des tampons NaOH-glycine ont été préparés pour les pH plus alcalins entre 9 et 11.3. Une aliquote de l'enzyme a été ajoutée au mélange réactionnel et la réaction a été démarrée avec le substrat synthétique *p*-NP décanoate (C_{10}). Puisque l'absorbance du *p*-nitrophénol est plus faible à des pH plus acides, les données ont été corrigées à l'aide de courbes standard calculées aux différents pH. Par la suite, ces données ont été converties en valeurs relatives et une valeur de 100 % a été attribuée au pH présentant une activité maximale. Ainsi, l'activité optimale de l'enzyme se situe à des pH entre 8 et 9.5 où 80 % de l'activité est conservée (Figure 4.12). La marge d'erreur entre les échantillons pour chaque pH ne dépasse pas 10 %. Les expérimentations effectuées par la suite dans les sections suivantes ont toutes été effectuées avec un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$.

4.5.2 Détermination de la température optimale

Le mélange réactionnel a été préparé avec le tampon cité dans la précédente section puis les cuvettes ont été placées adéquatement dans le spectrophotomètre afin que le mélange puisse atteindre la température désirée. Lorsque cette dernière était atteinte, le substrat *p*-NP C_{10} et une aliquote convenablement diluée de l'enzyme purifiée ont été ajoutés avant de démarrer la réaction qui a eu lieu sur une période de 5 minutes. Encore une fois, les courbes obtenues pour chaque température ont été converties en activité relative. La Figure 4.13 démontre une augmentation considérable de l'activité en fonction de la température. L'activité maximale a été atteinte à 60°C avant de redescendre légèrement à 65°C puis à 70°C, température lors de laquelle l'activité obtenue était à peine 10 % plus faible que celle à 60°C (Figure 4.13). À 25°C, la lipase LipIAF1-6 présente 2 fois moins d'activité envers le substrat synthétique *p*-NP C_{10} qu'à 60°C.

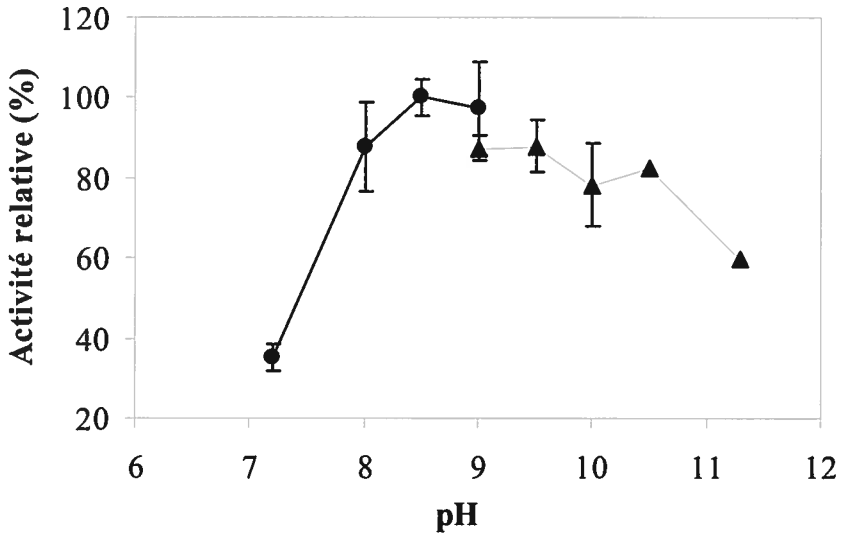


Figure 4.12 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. Les essais enzymatiques ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.2 à 9 (●) et dans un tampon NaOH-glycine 50 mM pH 9 à 11.3 (▲) avec 0.05% de $CaCl_2$ à 21°C envers le substrat *p*-NP décanoate (C_{10}).

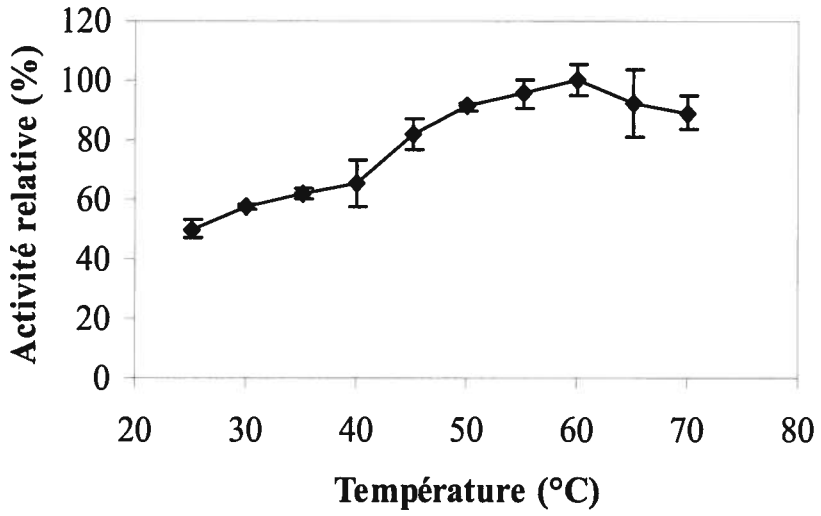


Figure 4.13 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. Les essais enzymatiques ont eu lieu dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ envers le *p*-NP décanoate (C_{10}).

4.5.3 Substrat préférentiel

La détermination du substrat préférentiel a été effectuée dans les conditions optimales de pH et de température de l'enzyme LipIAF1-6 (pH 8.5; 60°C). Certains substrats à courtes chaînes présentaient de l'hydrolyse spontanée et par conséquent, les cuvettes de référence contenant le mélange réactionnel avec le même substrat mais sans enzyme ont permis de pallier à ce problème. Cette fois-ci, les données ont été converties en unités internationales (µmoles de *p*-NP libéré par minute) par mg de protéine purifiée afin d'obtenir une vision plus adéquate de l'activité enzymatique envers les différents substrats lipidiques (Tableau 4.III). L'activité maximale a été observée pour le substrat à courtes chaînes *p*-NP butyrate (C_4) avec une activité de 4287 UI/mg. Aucune activité n'a été observée envers le substrat *p*-NP acétate (C_2), généralement hydrolysé par des estérases (résultats non démontrés). L'activité est restée relativement élevée pour les différents substrats. L'activité la plus faible a été enregistrée pour le *p*-NP stéarate (C_{18}) avec 2145 UI/mg, ce qui représente près de deux fois moins d'activité (Tableau 4.III). Toutefois, la valeur obtenue représente encore un bon taux d'hydrolyse. La marge d'erreur se situait aux alentours des 10 %. Ces résultats démontrent que l'enzyme LipIAF1-6 est bel et bien une lipase, puisqu'elle est en mesure d'hydrolyser des substrats à longues chaînes carbonées.

Tableau 4.III : Spécificité de l'enzyme LipIAF1-6 envers différents esters de *p*-NP.

Substrats synthétiques	**Activité spécifique (UI/mg)**[a]
p-NP butyrate (C_4)	4287
p-NP valérate (C_5)	3548
p-NP caprylate (C_8)	2476
p-NP décanoate (C_{10})	2974
p-NP laurate (C_{12})	2762
p-NP myristate (C_{14})	3326
p-NP palmitate (C_{16})	2422
p-NP stéarate (C_{18})	2145

[a] Activité spécifique exprimée en µmoles de *p*-NP libéré par minute par mg de protéine. Conditions des essais enzymatiques : Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ à 60°C envers les différents esters de *p*-NP.

4.5.4 Détermination de la thermostabilité

La thermostabilité de l'enzyme purifiée a été évaluée en incubant celle-ci pendant 30 minutes à différentes températures dans un tampon Na-P 50 mM pH 7.6. Les résultats ont démontré que l'enzyme était stable à des températures variant entre 40 et 70°C (Figure 4.14). Encore une fois, l'écart-type entre les triplicatas pour chaque température se situait aux alentours de 10 %. En revanche, une incubation à des températures au dessus de 70°C s'est avérée néfaste pour la lipase LipIAF1-6. En effet, après 30 minutes d'incubation à 80°C, l'enzyme a perdu presque 70 % de son activité alors qu'à 90°C, il ne restait à peine que 20 % d'activité enzymatique (Figure 4.14). Il est à noter également que les écarts-types pour ces deux dernières températures se situaient aux alentours de 20 %. Les écarts observés entre les triplicatas résultaient probablement de l'instabilité de l'enzyme LipIAF1-6 à ces températures.

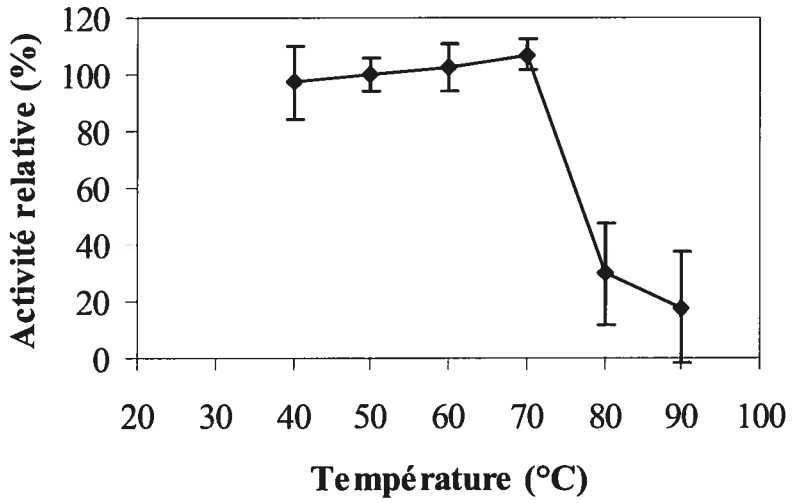


Figure 4.14 : Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6. L'activité résiduelle a été calculée à 60°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ envers le *p*-NP décanoate (C_{10}).

4.5.5 Stabilité en présence de solvants

Différents solvants organiques ont été dilués dans un tampon NaP 50 mM pH 7.6 afin d'obtenir des concentrations finales de 10 et 30 % dans lequel une aliquote de l'enzyme purifiée LipIAF1-6 a été incubée. La période d'incubation à température pièce a été d'une durée de 1 h avant de calculer l'activité résiduelle dans les conditions optimales de l'enzyme citées précédemment (pH 8.5; 60°C; *p*-NP C_{10}). Les résultats sont illustrés dans la Figure 4.15. Tel que mentionné auparavant, la marge d'erreur maximum entre les triplicatas se situait aux alentours des 10 %. Aucun des solvants organiques testés ne semble avoir un effet défavorable sur la stabilité de la lipase LipIAF1-6. En effet, l'activité résiduelle reste toujours au dessus de 80 %. L'enzyme est donc stable dans une grande variété de solvants.

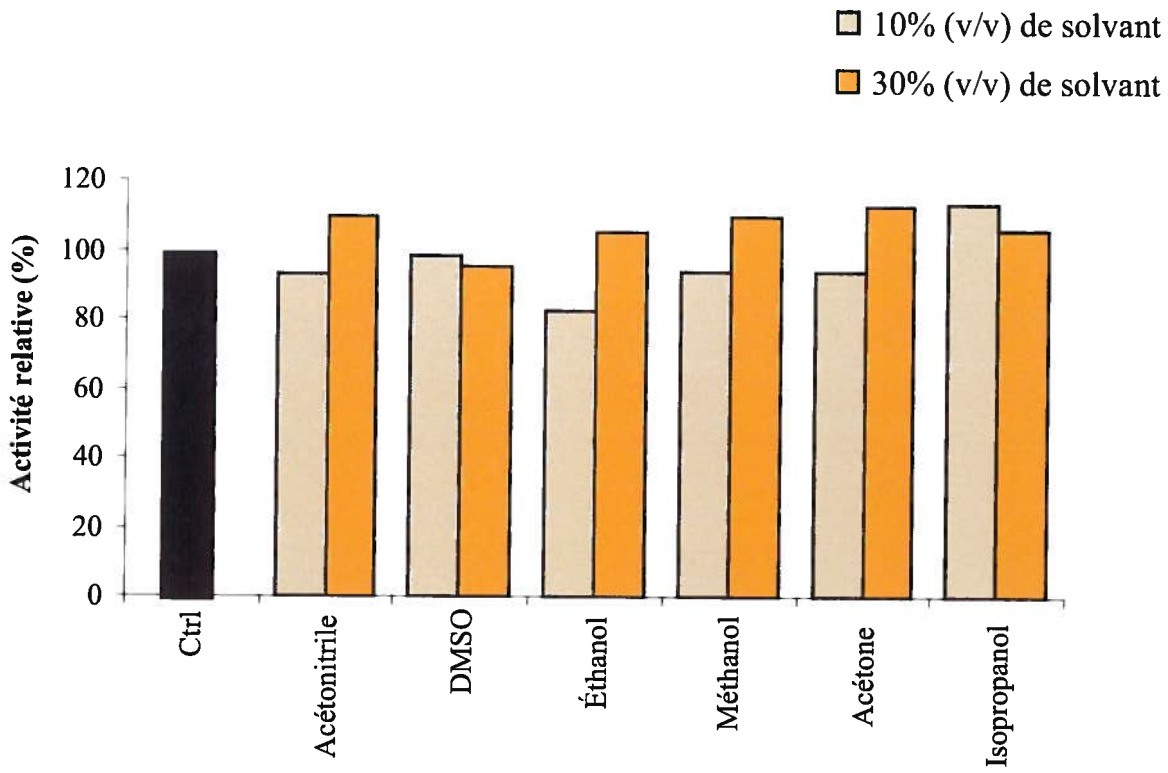


Figure 4.15 : Activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6 après 1h d'incubation à température pièce en présence de 10 et 30 % de différents solvants organiques.

4.5.6 Effet de cations et inhibiteurs

Les résultats concernant l'effet de cations et autres composés sur la stabilité et l'activité de l'enzyme purifiée LipIAF1-6 sont indiqués dans le Tableau 4.IV. En somme, la majorité des ions ne présentent aucun effet permettant d'observer une augmentation significative de l'activité enzymatique. Toutefois, en présence de quelques composés, l'activité lipolytique se voit diminuée. Par exemple, après l'incubation avec 10 mM de $CoCl_2$, l'enzyme a perdu 14 % d'activité lorsque comparée au témoin. Également, une certaine inhibition a été observée suivant l'incubation en présence des agents réducteurs $HgCl_2$ et DTT, qui réagissent avec les groupements thiols des résidus cystéines. En effet, la lipase présente une activité résiduelle de 88 % et 85 % en présence de ces deux agents, respectivement (Tableau 4.IV). Dernièrement, le PMSF, inhibiteur connu des sérines estérases, est le composé qui présente l'effet le plus marqué sur l'activité de la lipase LipIAF1-6. Près de 40 % de l'activité a été perdue après 1h d'incubation en présence de 1 mM de cet agent. L'inhibition est encore plus prononcée en présence de 10 mM de PMSF, où la lipase a perdu environ 70 % d'activité (Tableau 4.IV).

Tableau 4.IV : Effet de différents composés sur l'activité de l'enzyme LipIAF1-6.

Cations et autres composés	Concentration (mM)	Activité relative (%) *
Contrôle		100
Ca^{2+}	10	107
Co^{2+}	10	86
Cu^{2+}	10	96
Mg^{2+}	10	96
Mn^{2+}	10	105
Hg^{2+}	10	88
Zn^{2+}	10	104
EDTA	10	95
DTT	1	98
	10	85
PMSF	1	61
	10	29

* La marge d'erreur ne dépasse pas 10 %

4.5.7 Stabilité en présence d'agents tensioactifs et oxydants

Puisque les lipases peuvent potentiellement être utilisées dans la fabrication de détergents, la stabilité de l'enzyme a été testée dans quelques-uns des agents se retrouvant fréquemment dans les formulations commerciales et industrielles. En présence de 1 % des différents agents, non seulement la lipase LipIAF1-6 n'était pas inhibée, mais son activité était stimulée. Après 1h d'incubation en présence du détergent ionique SDS, l'enzyme LipIAF1-6 présentait 1.8 fois plus d'activité que lorsque incubée sans ce composé (Tableau 4.V). De même, l'activité de l'enzyme après son incubation en présence de Tween 80 et de Triton X-100 a augmenté d'un facteur de 2.1 et 2.9 respectivement. L'agent oxydant H_2O_2 ainsi que les deux autres composés semblent aussi activer l'enzyme, quoiqu'à un degré moindre (Tableau 4.V). En présence de 5 % des mêmes agents, l'activité après incubation en présence de SDS, H_2O_2, borate de sodium et carbonate de sodium a également été bien conservée et était parfois même supérieure à l'échantillon témoin. Par contre, une concentration de Tween 80 et de Triton X-100 égale à 5 % inhibait grandement l'activité enzymatique. Après 1h d'incubation à la température de la pièce, l'activité résiduelle en présence de Triton X-100 était de 13 % par rapport à celle du contrôle alors que l'activité en présence de Tween 80 était de 26 % (Tableau 4.V).

Tableau 4.V : Effet de différents agents tensioactifs et oxydants sur l'activité et la stabilité de la lipase LipIAF1-6 après 1h d'incubation à la température de la pièce.

Agents tensioactifs/oxydants	Concentration (%)	Activité résiduelle (%)[a]
Contrôle		100
SDS	1 (p/v)	181
	5	170
Triton X-100	1(v/v)	289
	2	244
	5	13
Tween 80	1(v/v)	208
	2	200
	5	26
H_2O_2	1(v/v)	115
	5	98
Borate de sodium	1(p/v)	119
	5	106
Carbonate de sodium	1(p/v)	117
	5	119

[a] L'activité résiduelle a été déterminée dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.5 + 0.05 % $CaCl_2$ à 60°C envers le *p*-NP décanoate (C_{10}). Une valeur de 100 % a été accordée au contrôle où l'enzyme a été incubée dans les mêmes conditions mais sans agents.

4.6 Immobilisation de l'enzyme purifiée

4.6.1 Immobilisation par adsorption sur diatomite et gel de silice

Deux matrices différentes ont été choisies lors des expérimentations d'immobilisation de la lipase LipIAF1-6 : le gel de silice contenant déjà un groupement amine (SiO_2-NH_2) et la poudre de diatomée (SiO_2). Une quantité de 173 µg de l'enzyme purifiée LipIAF1-6 a été mise en présence des supports et après 1 h d'agitation, 110 µg des protéines appliquées sur le gel de silice se sont liées par adsorption, ce qui représentent 64 % des protéines totales appliquées (Tableau 4.VI). Au contraire, sur la diatomite, à peine 42 % des protéines (73 µg sur les 173 µg ajoutés au départ) se sont adsorbées (Tableau 4.VI). La charge de protéine étant 1.5 fois plus élevée lorsque l'immobilisation a eu lieu sur le gel de silice, ce support a été choisi afin de poursuivre les expériences d'immobilisation.

4.6.2 Adsorption versus liaison covalente

Deux types d'attachement ont été effectués afin de comparer leur efficacité : l'adsorption et la liaison covalente. L'adsorption a été effectuée simplement en incubant l'enzyme dans un tampon pH 7 pendant 1h en présence de la matrice, tel que mentionné dans la section 4.5.1. Toutefois, afin d'obtenir des liaisons covalentes entre la lipase et la matrice, cette dernière a dû être activée pendant 5 minutes à la température de la pièce préalablement à l'immobilisation. Le composé utilisé pour l'activation du support a été le glutaraldéhyde (GTh) en concentration de 2 %. Après 3 lavages de la matrice, l'enzyme a été ajoutée et incubée pendant 1 h. Les résultats ont démontré qu'une quantité plus élevée de la lipase LipIAF1-6 s'était liée par liaison covalente. En effet, la charge de protéines, calculée tel que décrit précédemment, était de 1246.7 µg/ g de support pour la liaison covalente contre 813.3 µg/ g de support pour la liaison par adsorption (Tableau 4.VII). Également, le taux de désorption de la protéine suite à l'immobilisation a été calculé pour des fins de comparaison. Il s'est avéré qu'après 3 lavages de la matrice contenant l'enzyme immobilisée par adsorption, 19 % des protéines préalablement liées se sont détachées du gel de silice. Au contraire, le taux de désorption a été beaucoup moins important lorsque la lipase a été immobilisée par liaison covalente. En effet, à peine 5 %

des protéines liées par cette méthode se sont détachées du support après 3 lavages consécutifs.

Tableau 4.VI : Comparaison de l'immobilisation par adsorption de la lipase LipIAF1-6 sur deux supports différents : le gel de silice aminopropylé et la poudre de diatomée.

Type de matrice	Quantité de support	Quantité d'enzyme appliquée (µg)[a]	Protéines non adsorbées après 1h (µg)[a]	Charge de protéine (µg/ g de support)
Gel de silice avec groupement amine (SiO_2-NH_2)	150 mg	173 µg	62,63µg	735.8µg/g
Diatomite (SiO_2)	150 mg	173 µg	99,75µg	488.3µg/g

[a] Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford

Tableau 4.VII : Comparaison de l'immobilisation de la lipase LipIAF1-6 par adsorption et liaison covalente sur 150 mg d'un gel de silice aminopropylé.

Type de liaison	Activation du support	Quantité d'enzyme appliquée (µg)	Protéines liées après 1h[a]	Charge de protéine (µg/ g de support)
Adsorption	-	191 µg	122 µg	813.3 µg/g
Liaison covalente	2 % GTh	191 µg	187 µg	1246.7 µg/g

[a] Les protéines liées ont été calculées en soustrayant la quantité de protéines appliquées sur le support avec les protéines totales présentes dans le surnageant après 1h d'immobilisation

4.6.3 Activité de l'enzyme immobilisée

Les expérimentations précédentes ont permis de quantifier les protéines liées par les différentes méthodes d'immobilisation sur le support de silice. Par conséquent, un nombre plus élevé de protéines s'est lié lorsque la liaison covalente était impliquée. Afin de déterminer si l'enzyme immobilisée par les différentes méthodes a conservé son activité lipolytique pour des applications ultérieures, une aliquote des matrices a été prélevée et une réaction enzymatique a été effectuée dans les conditions optimales de l'enzyme par spectrophotométrie (pH 8.5; 60°C; *p*-NP C_{10}). Par extrapolation des résultats, il a été établi que l'enzyme immobilisée par adsorption présentait une activité spécifique de 427 UI/mg de support alors que l'enzyme immobilisée par liaison covalente présentait une activité égale à 235 UI/mg de support. Ce chiffre est presque 2 fois moins élevé que l'activité obtenue pour la lipase immobilisée par adsorption. En conclusion, même si la quantité de protéines liées par covalence est plus importante que par adsorption, l'activité totale est affectée et par conséquent, est moins élevée que l'activité calculée lorsque l'enzyme a été immobilisée par adsorption.

5. DISCUSSION

5.1 Identification de 2 nouveaux gènes codant pour des enzymes lipolytiques

5.1.1 Analyse de séquence et classification de l'enzyme LipIAF1-1

L'objectif principal du projet était d'identifier de nouvelles enzymes d'intérêt industriel en combinant les techniques de métagénomique et d'enrichissement bactérien. Les bactéries sont en effet d'excellents producteurs d'enzymes lipolytiques variées qui répondent aux critères de stabilité recherchés par les entreprises (Sharma *et al.* 2001; Fickers *et al.* 2008). L'isolement de l'ADN directement à partir de la biomasse enrichie a donc permis de contourner l'isolement des souches et par le fait même, d'accéder à des gènes en provenance de micro-organismes non cultivables par les techniques traditionnelles (Handelsman 2004). Lorsque le séquençage du cosmide lipIAF1-1 a été complété, un gène de 1536 paires de base a été identifié. Ce dernier possédait un contenu en GC équivalent à 69.8 %. Ce taux est un indice que l'enzyme provient d'un micro-organisme thermophile puisque le matériel génétique de ces bactéries est souvent riche en guanine et cytosine (Li et Zhang 2005; Rajendhran et Gunasekaran 2008). Par la suite, l'analyse de la séquence peptidique encodée par ce gène peut dès lors permettre d'établir s'il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des hydrolases. En effet, toutes les hydrolases sont constituées d'une triade catalytique constituée d'un nucléophile, un résidu aspartate et une histidine (Heikinheimo *et al.* 1999; Jaeger *et al.* 1999; Nardini *et al.* 2000; Fickers *et al.* 2008). De plus, la sérine, qui agit à titre de nucléophile chez les enzymes lipolytiques, se retrouve dans le pentapeptide hautement conservé Gx<u>S</u>xG (Jaeger *et al.* 1994). Au sein de la séquence de la protéine LipIAF1-1, le pentapeptide GH<u>S</u>MG a effectivement été observé, premier indice qu'il s'agissait d'une sérine hydrolase. Le deuxième indice qui a permis d'établir qu'il s'agissait potentiellement d'une enzyme lipolytique a été la présence du motif I-Y-I-T-G-H-<u>S</u>-M-G-G autour du site catalytique, qui suit le modèle identifié par Fojan et ses collaborateurs pour les lipases vraies : [LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-<u>S</u>-x-G-[GSTAC] (Fojan *et al.* 2000). Par la suite, les analyses ont été approfondies en comparant la séquence de cette nouvelle protéine avec celles de protéines connues grâce au logiciel BlastP. Étonnamment, à

première vue, la majorité des protéines homologues avec LipIAF1-1 étaient de fonctions inconnues. Tel que mentionné dans le Tableau 4.I, l'enzyme LipIAF1-1 présentait 46 % et 45 % d'homologie avec deux protéines présomptives de *Cupriavidus taiwanensis* et *Deinococcus geothermalis*, respectivement. Certaines recherches ont déjà mentionné qu'encore aujourd'hui, 25 à 40 % des gènes codants n'étaient affiliés à aucune fonction connue (Bertin *et al.* 2008). Également, puisque la métagénomique permet d'identifier des gènes nouveaux, il est possible que ces derniers ne présentent aucune homologie avec les lipases déjà identifiées. Parmi les protéines mises en évidence lors du BlastP, une seule enzyme lipolytique connue a présenté de l'homologie avec la protéine LipIAF1-1. Il s'agissait d'une lipase/estérase provenant elle-même d'une bactérie non cultivée (Tableau 4.I). L'alignement des séquences en acides aminés entre l'enzyme LipIAF1-1 et les trois protéines homologues a permis de cibler les résidus aspartate et histidine présomptifs de la triade catalytique (Figure 4.6). Ces derniers se trouvent souvent à une distance d'environ une trentaine d'acides aminés. La glycine du trou de l'oxyanion, qui se situe généralement de 70 à 100 acides aminés en amont de la sérine du site actif, pourrait également correspondre à celle retrouvée en position 81 (Figure 4.6). Cette glycine est conservée au sein des trois séquences et semble suivre le modèle Gx identifié par Jurgen Pleiss (2000), indiquant également une préférence pour les substrats lipidiques à longues chaînes carbonées. Une histidine en amont de la glycine est également conservée (Sullivan *et al.* 1999; Soliman *et al.* 2007; Fickers *et al.* 2008). Alors que certaines lipases de *Pseudomonas* sp. possèdent un site de liaison des ions Ca^{2+} suivant le motif GGxGxDxUx, aucun motif de ce genre n'a été identifié chez la lipase LipIAF1-1 (Meier *et al.* 2007; Kuwahara *et al.* 2008). Toutes les informations décelées à partir de la séquence ont été de bons indices afin de reconnaître qu'il s'agissait d'une enzyme lipolytique. Toutefois, ces indications restent au stade de prédictions et seule une caractérisation biochimique de l'enzyme pourrait établir son activité enzymatique. Quant aux résidus catalytiques (Ser, Asp, His), une mutagenèse dirigée pourrait confirmer leur position. Avant de poursuivre les expérimentations avec le clonage du gène et l'expression des protéines, une dernière analyse séquentielle a été effectuée afin de tenter la classification de cette nouvelle enzyme. Le système de classification d'Arpigny et Jaeger (1999) a été utilisé car il est le seul à avoir proposé une classification en 8 familles

basée sur l'homologie entre les séquences peptidiques et quelques propriétés biologiques (Arpigny et Jaeger 1999). En y allant par élimination, il serait probable que l'enzyme lipolytique LipIAF1-1 entre dans la famille I.5. Récemment, deux enzymes de haut poids moléculaire en provenance de micro-organismes thermophiles ont été classées dans cette famille (Carrasco-Lopez *et al.* 2009). À première vue, ces résultats démontrent qu'il s'agit bien d'une nouvelle protéine identifiée et que sa séquence possède quelques caractéristiques permettant sa classification parmi les lipases.

5.1.2 Analyse de séquence et classification de l'enzyme LipIAF1-6

Parmi les clones issus de la banque métagénomique, un deuxième cosmide a été isolé à partir d'un clone présentant une activité positive sur le substrat tributyrine. Le gène codant pour cette deuxième protéine d'intérêt possédait 870 paires de bases et par conséquent, la protéine présentait, au contraire de l'enzyme LipIAF1-1, un poids moléculaire plus petit, soit de 27.4 kDa. Encore une fois, le contenu en GC du gène était relativement élevé (67.5 %), caractéristique attribuée au génome de micro-organismes thermophiles (Li et Zhang 2005; Rajendhran et Gunasekaran 2008). La protéine encodée par le gène possédait également le motif conservé Gx<u>S</u>xG, typique des enzymes lipolytiques (Jaeger *et al.* 1994). Lors de l'utilisation du logiciel BlastP afin de comparer la séquence protéique aux autres protéines connues, plusieurs des protéines mises en évidence démontraient que l'enzyme LipIAF1-6 était homologue à des enzymes lipolytiques en provenance de différents micro-organismes tels que *Pseudomonas* sp., *Thermobifida* sp. ou *Geobacillus* sp. (Tableau 4.I). Toutefois, le pourcentage d'identité avec les différentes enzymes lipolytiques ne dépassait pas 31 %. Parmi les autres protéines dans la liste (résultats non présentés), certaines présentaient des fonctions inconnues alors que d'autres étaient citées en tant qu'hydrolases, cutinases, aminopeptidase ou autres lipases de *Streptococcus* sp. ou *Streptomyces* sp. Ces résultats démontrent que l'enzyme identifiée est réellement nouvelle et ne provient pas d'une bactérie dont le génome a déjà été séquencé. Les deux motifs identifiés chez les estérases et les lipases par l'équipe de Fojan (2000) ne s'appliquent pas à toutes les enzymes lipolytiques puisqu'ils ne se retrouvent pas chez l'enzyme LipIAF1-6 (Fojan *et al.* 2000).

D'autres estérases et lipases ayant été caractérisées démontrent également des résidus en amont du site catalytique qui ne correspondent pas rigoureusement à l'un de ces deux consensus (Kim *et al.* 2006; Park *et al.* 2007). Également, la structure tridimensionnelle de la lipase 2FX5_A de *Pseudomonas mendocina*, qui présente 31 % d'identité avec la lipase LipIAF1-6, a fait l'objet d'une publication dans laquelle les résidus catalytiques (Ser, Asp, His) ont été identifiés (Sibille *et al.* 2006). L'alignement des séquences en acides aminés permet d'évaluer que l'emplacement des résidus aspartate et histidine se trouve respectivement en position D166 et H195 de la protéine mature LipIAF1-6. La glycine en position 56 est également conservée au sein de toutes les séquences alignées à la Figure 4.7 et sera marquée en tant que site présomptif du trou de l'oxyanion, correspondant au motif Gx retrouvé chez plusieurs lipases. Le résidu en aval est une thréonine, aussi conservée au sein de toutes les séquences alignées. Par contre, l'acide aminé en amont de la glycine n'est pas une histidine mais plutôt une asparagine, un résidu qui a déjà été retrouvé en amont de la glycine du trou de l'oxyanion chez certaines lipases (Pleiss *et al.* 2000; Bell *et al.* 2002). À première vue, avec la séquence seule, la classification de l'enzyme dans l'une des 8 familles identifiées par Arpigny et Jaeger (1999) n'est pas facile. Une caractérisation biologique de l'enzyme pourrait fournir des indices supplémentaires permettant sa classification. D'un autre côté, l'analyse de la séquence peptidique est prometteuse et l'expression ainsi que la caractérisation de l'enzyme permettront de confirmer qu'il s'agit bien d'une lipase.

5.2 Expression et purification de protéines hétérologues

5.2.1 Problématique reliée à l'expression de l'enzyme LipIAF1-1

Les résultats d'expression de l'enzyme LipIAF1-1 n'ont pas été un succès autant chez l'organisme Gram-négatif *E. coli* que la bactérie Gram-positive *S. lividans*. L'expression des protéines chez les deux hôtes a permis la révélation d'une protéine hydrolysant le substrat MUF-butyrate lors du zymogramme (Figures 4.8 et 4.9 A). Ces résultats ont démontré que le clonage était bel et bien fonctionnel et que l'enzyme était également produite par l'hôte. Toutefois, dans les deux cas, aucune protéine ne semblait surexprimée après la coloration au bleu de Coomassie et les étapes u térieures

d'identification et de purification n'ont pu être effectuées. Il est bien connu que l'expression de protéines hétérologues chez des hôtes tels que *E. coli* n'est pas toujours profitable (Steele et Streit 2005). Quelques hypothèses peuvent être envisagées afin d'expliquer ces résultats. Lors du séquençage du cosmide positif lipIAF1-1 de 2612 pb, aucun gène codant pour une chaperonne moléculaire n'a été identifié. Toutefois, le cosmide de départ possédait un insert d'environ 40 kb et il est possible qu'un gène essentiel à l'expression de l'enzyme se trouve au sein de ce dernier. D'un autre côté, la bactérie *E. coli* est reconnue pour la formation de corps d'inclusion lorsque la protéine se replie de façon incorrecte dans la cellule (Healy *et al.* 1995; van den Burg 2003). Certaines enzymes nécessitent des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent être effectuées chez l'hôte choisi. L'usage des codons peut également être problématique pour l'expression de protéines hétérologues chez *E. coli*. Toutefois, cette hypothèse n'est pas retenue pour l'expression du gène lipIAF1-1 puisque les codons les plus problématiques, soient AGG (Arg), AGA (Arg), CUA (Leu) et AUA (Ile) sont absents ou très peu utilisés au sein de la séquence (Kane 1995; Rogers 1996; Gustafsson *et al.* 2004; Fuglsang 2005; Kim et Lee 2006). Enfin, il est connu que 80 % des gènes d'actinomycètes ne sont pas reconnus chez *E. coli*. De plus, les gènes possédant un contenu riche en GC peuvent également représenter des difficultés lors de l'expression chez cet hôte (Rajendhran et Gunasekaran 2008). Ainsi, afin de s'assurer une bonne production enzymatique, un deuxième hôte a été choisi, soit *S. lividans*. Avec son contenu élevé en GC et son habileté à produire des métabolites secondaires, cette bactérie semblait un deuxième choix approprié pour exprimer des gènes en provenance de micro-organismes thermophiles (Thompson *et al.* 2002; Li et Zhang 2005; Lorenz et Eck 2005). Pourtant, lors du zymogramme, l'hydrolyse du MUF-butyrate a semblé meilleure mais aucune protéine n'a pu être détectée après la coloration au bleu de Coomassie. Le codon rare TTA (Leu) est absent et donc l'usage des codons est également une hypothèse à éliminer. Encore une fois, plusieurs raisons pourraient expliquer cette faible expression protéique : la toxicité de l'enzyme pour la cellule, la nécessité de chaperonnes moléculaires ou encore la non reconnaissance du peptide signal. L'explication est encore inconnue et des études approfondies devraient être entreprises afin de pallier à ce problème. Il est à noter que compte tenu qu'à peine 1 % des bactéries ont été étudiées à

ce jour, d'autres facteurs encore inconnus pourraient être impliqués dans l'expression des protéines en provenance de micro-organismes non cultivables.

5.2.2 Expression et purification de l'enzyme LipIAF1-6

Au contraire de la lipase LipIAF1-1, l'enzyme LipIAF1-6 a connu une bonne expression chez les deux hôtes choisis. La lipase représentait près de 50 % des protéines extracellulaires, ce qui a permis l'obtention d'un taux de purification égal à 1.9. De plus, la colonne de chromatographie utilisée (HiTrap Butyl FF) s'est avérée un choix judicieux afin de purifier la lipase en une seule étape. Ceci peut être expliqué par le fait que les enzymes lipolytiques possèdent de façon générale un plus grand nombre d'acides aminés hydrophobes que les autres protéines, ce qui leur permet d'interagir avec les substrats lipidiques (Fojan *et al.* 2000). Plusieurs enzymes lipolytiques possèdent également une région hydrophobe qui agit à titre de volet couvrant le site actif (Jaeger *et al.* 1994; Jaeger et Reetz 1998; Fojan *et al.* 2000; Fickers *et al.* 2008). Ces caractéristiques des lipases avantagent leur liaison avec un ligand hydrophobe tel que le phényl, butyl ou octyl sépharose, qui ressemblent au substrat naturel de ces enzymes (Fernandez-Lafuente *et al.* 1998). Plusieurs enzymes lipolytiques ont été purifiées avec succès par cette méthode (Snellman *et al.* 2002; Salameh et Wiegel 2007; Meilleur *et al.* 2009).

5.3 Caractérisation de la lipase LipIAF1-6

5.3.1 Spectre d'activité

Les expérimentations en spectrophotométrie ont démontré que la lipase LipIAF1-6 présentait une hydrolyse optimale des substrats à pH alcalin (8.5-9) et à des températures élevées (55-65°C). En plus d'être active à des températures élevées, l'enzyme est stable à des températures allant jusqu'à 70°C. De plus, tous les esters de *p*-nitrophényl ont été clivés à un certain degré, avec une préférence pour les courtes et moyennes chaînes carbonées. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus lors de la caractérisation de l'enzyme LipIAF5-2, qui a aussi été isolée par d'autres collaborateurs au cours de ce projet. En effet, cette dernière présentait une activité optimale à pH alcalin (9-11) et à des températures élevées entre 50 et 70°C (Meilleur *et al.* 2009). Ces résultats démontrent

que les conditions d'enrichissement des bioréacteurs (pH variant entre 7 et 8.5 et températures variant entre 50 et 70°C) ont permis avec succès l'isolement de protéines issues d'une biomasse adaptée à ces conditions. En ce qui concerne la classification de la lipase, même avec ces quelques caractéristiques biologiques il semble difficile d'attribuer l'enzyme LipIAF1-6 à une des 8 familles connues. Selon le système de classification de Arpigny et Jaeger (1999), cette enzyme ne pourrait appartenir aux familles I.1 et I.2 car son expression n'a pas nécessité la présence d'une chaperonne moléculaire. Également, elle ne pourrait être classée dans les familles I.3 ou I.5 puisque son poids moléculaire est en dessous de 50 kDa. D'un autre côté, la lipase LipIAF1-6 ne semble pas remplir les critères lui allouant une place au sein des familles I.4, II, IV, VII et VIII car elle ne possède aucun des motifs conservés ou encore les particularités qui distinguent ces familles décrites dans le Tableau 2.III. Quant à la famille III, elle regroupe surtout des lipases dont certaines régions conservées ont en commun des acides aminés qui seraient responsable de leur instabilité à de hautes températures (Cruz *et al.* 1994; Arpigny et Jaeger 1999). Puisque la lipase LipIAF1-6 possède des propriétés thermophiles, elle n'entre pas dans cette catégorie. Enfin, la famille V peut contenir diverses lipases d'organismes mésophiles, psychrophiles ou encore thermophiles. Ce qui distingue les lipases de cette famille est leur ressemblance avec d'autres types d'hydrolases, telles que des déshalogénases, haloperoxidases, etc. (Arpigny et Jaeger 1999). Les quelques séquences conservées identifiées dans la publication d'Arpigny et Jaeger ne se retrouvent pas chez la lipase LipIAF1-6. Toutefois, lors du blastP, quelques protéines homologues s'apparentaient à des hydrolases. Ces informations semblent peu suffisantes afin de classer cette nouvelle lipase issue d'un micro-organisme inconnu.

5.3.2 Effet de différents composés sur la stabilité et l'activité enzymatique

L'effet de différents cations permet entre autres de fournir des indices sur la structure de l'enzyme mais également sur les facteurs essentiels à son activité. Par conséquent, des concentrations de 10 mM de Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} et Zn^{2+} n'ont eu aucun effet inhibiteur sur l'activité enzymatique après 1h d'incubation à température pièce, signifiant que ces derniers ne sont pas essentiels afin de stabiliser ou activer l'enzyme. L'absence de co-facteurs pour la réaction enzymatique est également

confirmée par la conservation de l'activité enzymatique après l'incubation en présence d'EDTA, un chélateur de cations. D'un autre côté, certaines enzymes lipolytiques nécessitent la présence d'ions calcium afin de rester stables et augmenter leur activité, ce qui n'est pas le cas de la lipase LipIAF1-6 (Goldman 1990; Snellman *et al.* 2002). Également, il a été démontré pour quelques lipases que les métaux lourds tels que le Co^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+} affectaient l'activité enzymatique. L'activité lipolytique de ces enzymes était aussi affectée par des températures élevées (Kojima et Shimizu 2003; Kumar *et al.* 2005). À l'opposé, quelques enzymes thermostables ont démontré une résistance à ces métaux lourds (Litthauer *et al.* 2002; Li et Zhang 2005). D'un autre côté, les agents réducteurs tels que le DTT et $HgCl_2$ sont souvent utilisés afin de vérifier si des groupements thiols sont essentiels à l'activité enzymatique. La perte d'activité engendrée par ces composés suite à l'incubation en présence de 10 mM est légère (15 % et 12 % respectivement) et suggère que les liens S—S ne sont pas essentiels à l'activité enzymatique. Ces résultats peuvent également se traduire par la présence de ponts disulfures intramoléculaires qui ne sont pas accessibles aux agents réducteurs (Liebeton *et al.* 2001). Au contraire, certaines enzymes lipolytiques sont partiellement ou complètement inhibées par l'un ou l'autre de ces agents (Chich *et al.* 1997; Choo *et al.* 1998; Nawani *et al.* 1998; Abramic *et al.* 1999; Kademi *et al.* 2000; Snellman *et al.* 2002). Enfin, l'effet du PMSF sur l'activité enzymatique a démontré une perte d'activité marquée après incubation en présence de 1 et 10 mM de l'inhibiteur (Tableau 4.IV). Les résultats de cette expérimentation suggèrent l'absence d'une région hydrophobe couvrant la sérine du site catalytique. Parmi les ouvrages publiés, les enzymes qui présentent une perte d'activité due au PMSF sont fréquemment des estérases, qui préfèrent l'hydrolyse des substrats à courtes et moyennes chaînes carbonées et ne possèdent pas ce volet hydrophobe (Tesch *et al.* 1996; Kademi *et al.* 2000; Ruiz *et al.* 2003). Inversement, les lipases qui hydrolysent les substrats insolubles et possèdent cette région sont beaucoup moins affectées par cet inhibiteur des sérines hydrolases (Snellman *et al.* 2002; Côté et Shareck 2008). Ainsi, l'absence d'un volet hydrophobe pourrait également expliquer la préférence de la lipase LipIAF1-6 pour les courtes et moyennes chaînes carbonées.

En plus d'être stable à des températures élevées et en présence d'un grand nombre de cations, la lipase LipIAF1-6 est stable en présence d'acétonitrile, de DMSO, d'éthanol,

de méthanol, d'acétone et d'isopropanol. Ceci concorde avec plusieurs publications ayant démontré que les enzymes en provenance de micro-organismes thermophiles produisent des enzymes stables à plusieurs niveaux (Niehaus *et al.* 1999). La lipase LipIAF5-2 isolée par Meilleur *et al.* (2009) est également stable et même activée en présence de solvants organiques (résultats non publiés). Cette caractéristique rend cette enzyme intéressante pour différentes biotechnologies qui nécessitent que les réactions aient lieu dans ces conditions (Gupta 1992; Simon *et al.* 1998; Gotor 2000).

Dernièrement, l'effet de différents agents tensioactifs et oxydants a été vérifié afin de démontrer le potentiel de cette enzyme au sein de produits nettoyants. Les détergents permettent une bonne émulsification des graisses et peuvent se retrouver à des concentrations variant entre 10 et 20 % dans les formulations industrielles. Même en présence de 5 % des agents testés, la lipase a conservé son activité et était même stimulée. Le SDS est un agent dénaturant qui peut provoquer des changements de conformation chez les protéines, les rendant ainsi inactives (dos Prazeres *et al.* 2006). La lipase LipIAF1-6 a été stimulée par le SDS, démontrant ainsi encore une fois la grande stabilité et versatilité de la lipase. Par contre, deux des composés utilisés en concentration de 5 % ont démontré un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la lipase LipIAF1-6. Il s'agit des détergents non-ioniques Triton X-100 et Tween 80. La raison de cette inhibition est inconnue car plusieurs facteurs peuvent affecter l'interaction entre un détergent et une protéine. Les lipases peuvent être stimulées (dos Prazeres *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006) ou inhibées (dos Prazeres *et al.* 2006; Soliman *et al.* 2007; Meilleur *et al.* 2009) par la présence de ces détergents en concentrations équivalentes. Dans certains cas, les concentrations d'inhibitions se rapprochaient de la concentration micellaire critique des détergents (Helisto et Korpela 1998).

5.4 Immobilisation de la lipase LipIAF1-6

5.4.1 Comparaison des matrices de diatomite et gel de silice

Les résultats d'immobilisation par adsorption sur les matrices de diatomite et gel de silice aminopropylé ont démontré que dans les mêmes conditions de réaction, une plus grande quantité d'enzyme s'était adsorbée sur le gel de silice. Ces deux matrices, composées de silice (SiO_2), sont peu coûteuses et reconnues pour leur grande stabilité tant au niveau de leur thermorésistance, que de leur capacité à être utilisées en présence de solvants organiques. Les matrices de silice sont également non toxiques et efficaces pour éviter la contamination bactérienne (Christensen *et al.* 2003; Bahramian *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). Quelques différences distinguent toutefois ces deux supports. D'abord, le gel de silice contient un groupement amine fonctionnel absent dans la terre de diatomée (NH_2). Ce groupement ajouté permet de faire le pont entre la matière inorganique (le gel de silice) et la matière organique (la protéine LipIAF1-6) afin de faciliter la formation des différentes liaisons impliquées dans l'immobilisation. L'absence d'un tel groupement sur la diatomite pourrait réduire l'interaction entre la lipase et la matrice, ce qui expliquerait la quantité plus élevée d'enzyme adsorbée sur le gel de silice. D'ailleurs, la terre de diatomée est reconnue pour sa faible capacité d'adsorption (Tsai *et al.* 2006). Pour cette raison, les matrices de silice utilisées dans la littérature sont très souvent soumises à des modifications chimiques préalablement à l'immobilisation des protéines (Novick et Rozzwell 2005; Lee *et al.* 2006; Tsai *et al.* 2006; Yang *et al.* 2009). De plus, selon le commerçant, la grosseur des pores pour le gel de silice aminopropylé varie entre 15 et 35 µm alors que la diatomite, composée du squelette d'algues microscopiques, possède un mélange de particules plus hétérogènes dont la grosseur peut varier entre 0.75 et 1500 µm (Lazutkina *et al.* 2006). La porosité et surface de contact sont également des facteurs pouvant influencer l'immobilisation, ce qui expliquerait d'autant plus les résultats obtenus. Étant donné l'efficacité de l'immobilisation sur le gel de silice, cette matrice a été utilisée pour les expérimentations ultérieures.

5.4.2 Efficacité des méthodes d'immobilisation

Dans la littérature sont citées différentes méthodes d'immobilisation, les deux principales étant l'immobilisation par adsorption et celle par liaison covalente. Ces deux types d'immobilisation se différencient par la force des liens qui unit la protéine à la matrice. L'avantage de l'immobilisation par adsorption tient de la simplicité et la rentabilité du protocole à réaliser. Quant à l'immobilisation par covalence, la matrice doit être activée avec un agent couplant qui permettra la formation des liaisons covalentes avec l'enzyme (Novick et Rozzwell 2005; Alloue *et al.* 2008). Les expérimentations avec la lipase LipIAF1-6 ont démontré que la charge de protéine était effectivement plus élevée lorsque la liaison covalente était impliquée. D'un autre côté, le désavantage principal de la liaison par adsorption est que l'enzyme risque de connaître un niveau de désorption plus élevé étant donné la faiblesse des liaisons reliant l'enzyme à la matrice. Les résultats obtenus lors de l'immobilisation de la lipase LipIAF1-6 concordent avec ces propos. En effet, le taux de désorption était beaucoup moins élevé lorsqu'une liaison covalente était impliquée dans le processus d'immobilisation (Section 4.6.2). L'ensemble des résultats est donc en accord avec les faits cités dans la littérature. Ceci confirme que la formation de liens covalents en utilisant la glutaraldéhyde comme agent couplant est une bonne méthode pour immobiliser la lipase LipIAF1-6.

5.4.3 Activité de l'enzyme immobilisée

Après avoir confirmé l'efficacité de la liaison covalente pour immobiliser la lipase LipIAF1-6, il restait à vérifier si cette dernière pouvait conserver son activité catalytique envers les substrats lipidiques. Une aliquote de matrice a donc été prélevée et l'activité a été évaluée en comparant les deux types d'immobilisation sur le gel de silice. Puisque la charge de protéines était plus importante sur la matrice traitée à la glutaraldéhyde, l'hypothèse était que pour une même quantité de matrice, l'activité serait plus élevée pour l'échantillon de lipase immobilisée par liaison covalente. Pourtant, les résultats ont démontré le contraire. L'activité spécifique de la lipase immobilisée par adsorption était de 427 UI/mg comparativement à 235 UI/mg pour la lipase immobilisée par covalence. Ainsi donc, même si la quantité de protéines est plus élevée sur le support traité avec l'agent couplant, l'activité est diminuée. L'équipe de recherche de Yang (2009) a publié

des résultats semblables. Yang et ses collaborateurs ont expliqué qu'il était possible qu'au moment de la formation des liens covalents, la conformation de l'enzyme ait été modifiée au point de lui donner une conformation inactive (Yang *et al.* 2009). Il est impossible de prédire l'endroit sur l'enzyme où les liaisons covalentes se formeront. Par conséquent, dans le cas où la liaison a lieu près du site catalytique, l'activité enzymatique peut se voir diminuée (Cardias *et al.* 1999). Cette information peut être jumelée au fait que la liaison par adsorption ne provoque généralement pas de changement de conformation des protéines, ce qui lui permet de conserver toute son activité. Ceci expliquerait donc la différence d'activité entre l'enzyme immobilisée par adsorption versus covalence. De plus, l'agent couplant utilisé est reconnu pour sa toxicité. Plusieurs facteurs sont à considérer lors de l'activation du support avec la glutaraldéhyde (Betancor *et al.* 2006 a; Betancor *et al.* 2006 b). Enfin, ces expériences ont tout de même démontré que l'enzyme immobilisée conservait son activité. Toutefois, il semble clair que les techniques d'immobilisation peuvent être travaillées afin de les optimiser.

6. CONCLUSION

Le principal objectif du présent projet était d'identifier des nouvelles lipases thermostables d'intérêt industriel dont l'activité catalytique serait optimale dans des conditions alcalines et à des températures élevées. Afin de maximiser la recherche, les enzymes ont été recherchées au sein d'une banque métagénomique qui a été construite suite à l'extraction d'ADN d'une biomasse enrichie soumise aux conditions recherchées (pH alcalin, température élevée)(Hupé 2008). Quoique la diversité des micro-organismes isolés dans les fermenteurs soit moins riche que celle d'un consortium isolé directement d'un échantillon environnemental, l'enrichissement permet d'extraire du matériel génétique encodant des protéines adaptées aux conditions dans lesquelles la croissance a eu lieu. Ceci permet de cribler un nombre de clones plus raisonnable afin d'identifier les enzymes d'intérêt. Le succès de la méthodologie a été démontré à la fois par différentes équipes scientifiques et par l'identification, dans le présent projet, d'une dizaine de gènes encodant potentiellement des enzymes lipolytiques, incluant lipIAF1-1 et lipIAF1-6. Les deux gènes possédaient un taux élevé des nucléotides cytosine et guanine, révélant qu'ils provenaient de micro-organismes adaptés aux températures élevées imposées au sein des bioréacteurs.

D'une part, le faible niveau d'expression obtenu pour la lipase LipIAF1-1 a attesté de la difficulté à produire des protéines hétérologues et la nécessité de développer des systèmes d'expression efficaces afin de cloner les gènes provenant des micro-organismes non cultivables. Dans le présent cas, le vecteur d'expression ne pouvait être la source du problème étant donné le succès de l'expression de la lipase LipIAF1-6. Parmi les autres aspects à considérer, il y avait le peptide signal, qui aurait pu ne pas être reconnu par l'un ou l'autre des hôtes utilisés. Une panoplie d'autres facteurs aurait pu influencer la sécrétion de l'enzyme. Cette lipase présentait également très peu d'homologie avec d'autres lipases connues et possédait peut-être des exigences particulières afin de permettre une bonne expression. La caractérisation plus appronfondie des nouvelles enzymes identifiées par la métagénomique révéleront peut-être dans l'avenir les secrets de leur expression.

Par contre, d'un autre côté, l'expression de la lipase LipIAF1-6 a été un succès. La caractérisation de la lipase a révélé des conditions optimales d'hydrolyse à pH alcalin et à 60°C. Sa thermostabilité a également été démontrée. Par conséquent, deux enzymes lipolytiques, soient LipIAF5-2 (Meilleur *et al.* 2009) et LipIAF1-6, étudiées dans le cadre de ce projet, certifient que le génome des micro-organismes ayant connu une croissance à pH alcalin et des températures élevés sécrètent des protéines dont l'activité coïncide avec ces conditions.

De plus, la lipase LipIAF1-6 était également stable en présence de plusieurs solvants, cations, agents tensioactifs et oxydants. L'inhibition de l'enzyme par l'inhibiteur de protéases à sérine PMSF a confirmé la présence d'une sérine qui agit à titre de nucléophile dans la triade catalytique. Le profil d'inhibition par le PMSF suggérait également l'absence d'un volet hydrophobe qui recouvre le site actif et qui est présent chez plusieurs lipases. L'immobilisation s'est également avérée possible, et ce, sur différents supports sur lesquels l'enzyme conservait son activité catalytique.

Enfin, la métagénomique couplée à l'enrichissement bactérien sont des méthodes efficaces pour l'identification de nouvelles enzymes lipolytiques. Ces résultats sont d'autant plus intéressants puisqu'ils révèlent un avenir possible pour l'utilisation de la lipase LipIAF1-6, qui semble répondre à plusieurs critères recherchés par des industries pour différentes applications à caractère biotechnologique.

LISTE DES RÉFÉRENCES

Abdel-Fattah, Y. R. et Gaballa, A. A. (2008). Identification and over-expression of a thermostable lipase from Geobacillus thermoleovorans Toshki in *Escherichia coli*. Microbiol Res **163**(1): 13-20.

Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., *et al.* (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. Enzyme Microb Technol **25**(6): 522-529.

Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. et Moreira, A. R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. Crit Rev Biotechnol **24**(2-3): 125-154.

Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., *et al.* (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. Prog Lipid Res **43**(6): 534-52.

Alloue, W. A., Aguedo, M., Destain, J., *et al.* (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. Biotechnol Agron Soc Environ **12**(1): 57-68.

Alloue, W. A., Destain, J., El Medjoub, T., *et al.* (2008). Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. Appl Biochem Biotechnol **150**(1): 51-63.

Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., *et al.* (2008). Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. Gen Res **18**(9): 1472-1483.

Amann, R. I., Ludwig, W. et Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev **59**(1): 143-69.

Angkawidjaja, C. et Kanaya, S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. Cell Mol Life Sci **63**(23): 2804-17.

Arpigny, J. L. et Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem J **343**: 177-183.

Bahramian, B., Ardejani, F. D., Mirkhani, V., *et al.* (2008). Diatomite-supported manganese Schiff base: An efficient catalyst for oxidation of hydrocarbons. Appl Catal A **345**(1): 97-103.

Barnard, A., Wolfe, A. et Busby, S. (2004). Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. Curr Opin Microbiol **7**(2): 102-108.

Bell, P. J. L., Sunna, A., Gibbs, M. D., *et al.* (2002). Prospecting for novel lipase genes using PCR. Microbiol-Sgm **148**: 2283-2291.

Bendikiene, V., Surinenaite, B., Bachmatova, I., *et al.* (2005). The specificity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. Hydrol. Biol **1**: 27-30.

Bendikiene, V., Surinenaite, B. et Juodka, B. (2007). *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase-catalysed lipolysis. The effect of detergents. Biologija **53**(4): 19-23.

Bertin, P. N., Medigue, C. et Normand, P. (2008). Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems. Microbiol **154**(Pt 2): 347-59.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Alonso-Morales, N., *et al.* (2006 a). Glutaraldehyde in Protein Immobilization: A versatile reagent. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells: **22**(5). Totowa, NJ. Second Edition. Humana Press Inc. 57-64.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., *et al.* (2006 b). Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. Enzyme Microb Technol **39**(4): 877-882.

Blanco, R. M., Terreros, P., Fernandez-Perez, M., *et al.* (2004). Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts. J Mol Catal B: Enzym **30**: 83-93.

Blow, N. (2008). Metagenomics: exploring unseen communities. Nat **453**(7195): 687-90.

Bora, L. et Kalita, M. C. (2007). Production and Optimization of Thermostable lipase from a Thermophilic *Bacillus* sp. LBN 4. The Internet J Microbiol **4**(1).

Boston, M., Requadt, C., Danko, S., *et al.* (1997). Structure and function engineered *Pseudomonas mendocina* lipase. Methods Enzymol **284**: 298-317.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-54.

Brigida, A. I., Pinheiro, A. D., Ferreira, A. L., *et al.* (2008). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. Appl Biochem Biotechnol **146**(1-3): 173-87.

Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., *et al.* (2003). Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. Protein Sci **12**(10): 2312-9.

Cardenas, E. et Tiedje, J. M. (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Curr Opin Biotechnol **19**(6): 544-9.

Cardias, H. C. T., Grininger, C. C., Trevisan, H. C., *et al.* (1999). Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. Braz J of Chem Eng **16**(2): 141-148.

Carrasco-Lopez, C., Godoy, C., de las Rivas, B., *et al.* (2009). Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. J Biol Chem **284**(7): 4365-4372.

Castro, H. F., Silva, M. L. C. P. et Silva, G. L. J. P. (2000). Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. Braz J Chem Eng **17**(4-7): 849-857.

Chen, S. X., Qian, L. L. et Shi, B. Z. (2007). Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. Process Biochem **42**(6): 988-994.

Chich, J. F., Marchesseau, K. et Gripon, J. C. (1997). Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purif Character Intern Dairy J **7**(2-3): 169-174.

Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., *et al.* (1998). A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. Appl Environ Microbiol **64**(2): 486-91.

Christensen, M. W., Andersen, L., Husum, T. L., *et al.* (2003). Industrial lipase immobilization. Eur J Lipid Sci Technol **105**(6): 318-321.

Chu, X. M., He, H. Z., Guo, C. Q., *et al.* (2008). Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. Appl Microbiol Biotechnol **80**(4): 615-625.

Costas, L., Bosio, V. E., Pandey, A., *et al.* (2008). Effects of Organic Solvents on Immobilized Lipase in Pectin Microspheres. Appl Biochem Biotechnol **151**(2-3): 578-586.

Côté, A. et Shareck, F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). Enzyme Microb Technol **42**(5): 381-388.

Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., *et al.* (2005). Metagenomic gene discovery: past, present and future. Trends Biotechnol **23**(6): 321-329.

Cowan, D. A., Arslanoglu, A., Burton, S. G., *et al.* (2004). Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst. Biochem Soc Trans **32**: 298-302.

Cruz, H., Perez, C., Wellington, E., *et al.* (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. Gene **144**(1): 141-2.

Dai, D. Z. et Xia, L. M. (2006). Effect of lipase immobilization on resolution of (R, S)-2-octanol in nonaqueous media using modified ultrastable-Y molecular sieve as support. Appl Biochem Biotechnol **134**(1): 39-50.

Daniel, R. (2004). The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products. Curr Opin Biotechnol **15**(3): 199-204.

DeLong, E. F. (2004). Microbial population genomics and ecology: the road ahead. Environ Microbiol **6**(9): 875-878.

Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. et Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. Curr Opin Chem Biol **5**(2): 144-151.

Diaz, M., Ferreras, E., Moreno, R., *et al.* (2008). High-level overproduction of *Thermus* enzymes in Streptomyces lividans. Appl Microbiol Biotechnol **79**(6): 1001-1008.

Dominguez, A., Deive, F. J., Pastrana, L., *et al.* (2009). Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27. Bioprocess Biosyst Eng.

dos Prazeres, J. N., Cruz, J. A. B. et Pastore, G. M. (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. Braz J Microbiol **37**(4): 505-509.

Dutta, S. et Ray, L. (2009). Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus* C(7). Appl Biochem Biotechnol.

Ebanks, R., Dupont, M., Shareck, F., *et al.* (2000). Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. J Ind Microbiol Biotechnol **25**(6): 310-314.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., *et al.* (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. Appl Environ Microbiol **72**(5): 3637-3645.

Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., *et al.* (2001). Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. Appl Environ Microbiol **67**(1): 89-99.

Fan, Z., Yue, C., Tang, Y., *et al.* (2009). Cloning, sequence analysis and expression of bacterial lipase-coding DNA fragments from environment in *Escherichia coli.* Mol Biol Rep **36**(6): 1515-9.

Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., *et al.* (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Chem Phys Lipids **93**(1-2): 185-197.

Fickers, P., Destain, J. et Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. Biotechnol Agron Soc Environ **12**(2): 119-130.

Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., *et al.* (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. Appl Environ Microbiol **73**(21): 7059-7066.

Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., *et al.* (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. Biochimie **82**(11): 1033-1041.

Foresti, M. L., Alimenti, G. A. et Ferreira, M. L. (2005). Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. Enz Microb Technol **36**(2-3): 338-349.

Fuglsang, A. (2005). Intragenic position of UUA codons in streptomycetes. Microbiol-Sgm **151**: 3150-3152.

Fukatsu, M., Arakawa, I., Negishi, Y., *et al.* (1993). Purification and properties of lipase derived from the extreme extremophile, *Thermus thermophilus* 111. Yukagaku **42**(3): 179-183.

Goldman, R. (1990). Dependence on Ca2+ of lipoprotein lipase stability. J Leukoc Biol **48**(2): 193-9.

Gotor, V. (2000). Enzymes in organic solvents: the use of lipases and (R)-oxynitrilase for the preparation of products of biological interest. Molecules **5**(3): 290-292.

Gupta, M. N. (1992). Enzyme function in organic solvents. Eur J Biochem **203**(1-2): 25-32.

Gustafsson, C., Govindarajan, S. et Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. Trends Biotechnol **22**(7): 346-53.

Haki, G. D. et Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour Technol **89**(1): 17-34.

Hammer, K., Mijakovic, I. et Jensen, P. R. (2006). Synthetic promoter libraries--tuning of gene expression. Trends Biotechnol **24**(2): 53-5.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Reviews **68**(4): 669-+.

Hardeman, F. et Sjoling, S. (2007). Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. Fems Microbiol Ecol **59**(2): 524-534.

Hasan, F., Shah, A. A. et Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. Enz Microb Technol **39**(2): 235-251.

Haugen, S. P., Ross, W. et Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. Nat Rev Microbiol **6**(7): 507-19.

Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., *et al.* (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. Appl Microbiol Biotechnol **43**(4): 667-74.

Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., *et al.* (1999). Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. Struct **7**(6): R141-6.

Helisto, P. et Korpela, T. (1998). Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. Enz Microb Technol **23**(1-2): 113-117.

Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., *et al.* (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli.* Appl Environ Microbiol **66**(7): 3113-6.

Hilton, S. et Buckley, J. T. (1991). Studies on the reaction mechanism of a microbial lipase/acyltransferase using chemical modification and site-directed mutagenesis. J Biol Chem **266**(2): 997-1000.

Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., *et al.* (2002). Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. Appl Environ Microbiol **68**(8): 3925-3931.

Hugenholtz, P. et Tyson, G. W. (2008). Microbiology - Metagenomics. Nature **455**(7212): 481-483.

Hupé, J. F. (2008). Enrichissement et recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles. Mémoire de maîtrise, Laval, Institut Armand Frappier. 161 pages.

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., *et al.* (1995). A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol Microbiol **17**(2): 367-77.

Imamura, S. et Kitaura, S. (2000). Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. J Biochem **127**(3): 419-25.

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. et Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Ann Rev Microbiol **53**: 315-+.

Jaeger, K. E. et Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol **13**(4): 390-397.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., *et al.* (1994). Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev **15**(1): 29-63.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., *et al.* (1993). Topological Characterization and Modeling of the 3d Structure of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa.* Febs Lett **332**(1-2): 143-149.

Jaeger, K. E. et Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol **16**(9): 396-403.

Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., *et al.* (2000). Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. Appl Microbiol Biotechnol **54**(2): 173-9.

Kaeberlein, T., Lewis, K. et Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. Science **296**(5570): 1127-9.

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli.* Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.

Kanwar, S. S., Gupta, M., Gupta, R., *et al.* (2006). Properties of hydrogel-entrapped lipase of thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* BTS-2. Indian J Biotechnol **5**: 292-297.

Kar, M. K., Ray, L. et Chattopadhyay, P. (1996). Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. Indian J Exp Biol **34**(6): 535-8.

Kato, M., Ozawa, S. et Hayashi, R. (1997). Effects of high pressure and temperature on micelle formation of sodium deoxycholate and sodium dodecylsulfate. Lipids **32**(11): 1229-30.

Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., *et al.* (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. Structure **5**(2): 173-85.

Kim, S. et Lee, S. B. (2006). Rare codon clusters at 5 '-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli.* Protein Expression Purif **50**(1): 49-57.

Kim, S. H., Park, I. H., Lee, S. C., *et al.* (2008). Discovery of three novel lipase (lipA(1), lipA(2), and lipA(3)) and lipase-specific chaperone (lipB) genes present in *Acinetobacter* sp DYL129. Appl Microbiol Biotechnol **77**(5): 1041-1051.

Kim, Y. J., Choi, G. S., Kim, S. B., *et al.* (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. Protein Expression Purif **45**(2): 315-323.

Kirk, O., Vedel Borchert, T. et Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol **13**: 345-351.

Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., *et al.* (2005). Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. Biomacromolecules **6**(1): 262-270.

Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., *et al.* (2003). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli.* Appl Environ Microbiol **69**(3): 1408-16.

Kojima, Y. et Shimizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. J Biosci Bioeng **96**(3): 219-226.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., *et al.* (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Expr Purif **41**(1): 38-44.

Kuwahara, K., Angkawidjaja, C., Matsumura, H., *et al.* (2008). Importance of the Ca2+-binding sites in the N-catalytic domain of a family I.3 lipase for activity and stability. Protein Engineering Design & Selection **21**(12): 737-744.

Kwoun Kim, H., Jung, Y. J., Choi, W. C., *et al.* (2004). Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. FEMS Microbiol Lett **235**(2): 349-55.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-5.

Lammle, K., Zipper, H., Breuer, M., *et al.* (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. J Biotechnol **127**(4): 575-92.

Langer, M., Gabor, E. M., Liebeton, K., *et al.* (2006). Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. Biotechnol J **1**(7-8): 815-21.

Lazutkina, O. R., Kazak, A. K., Temereva, A. A., *et al.* (2006). Prospects of using diatomite material from the Sverdlovsk region in enamelling production. Glass Ceram **63**(3-4): 97-98.

Lee, D., Koh, Y., Kim, K., *et al.* (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiol Lett **179**(2): 393-400.

Lee, D. H., Park, C. H., Yeo, J. M., *et al.* (2006). Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. J Ind Eng Chem **12**(5): 777-782.

Lee, M. H., Lee, C. H., Oh, T. K., *et al.* (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. Appl Env Microbiol **72**(11): 7406-7409.

Leow, T. C., Rahman, R. N., Basri, M., *et al.* (2007). A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. Extremophiles **11**(3): 527-35.

Li, H. et Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. Protein Expr Purif **42**(1): 153-9.

Li, X. et Qin, L. (2005). Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. Trends Biotechnol **23**(11): 539-43.

Li, X., Tetling, S., Winkler, U. K., *et al.* (1995). Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. Appl Environ Microbiol **61**(7): 2674-80.

Liebeton, K., Zacharias, A. et Jaeger, K. E. (2001). Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. J Bacteriol **183**(2): 597-603.

Lin, J. J., Smith, M., Jessee, J., *et al.* (1992). DH11S: an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. Biotechniques **12**(5): 718-21.

Litthauer, D., Ginster, A. et Skein, E. V. (2002). *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. Enz Microb Technol **30**(2): 209-215.

Long, Z. D., Xu, J. H. et Pan, J. (2007). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase and catalytic resolution of trans-3-(4 '-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester. Chinese J Catal **28**(2): 175-179.

Lorenz, P. et Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. Nat Rev Microbiol **3**(6): 510-6.

Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., *et al.* (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. Curr Opin Biotechnol **13**(6): 572-7.

Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., *et al.* (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. J Bacteriol **189**(6): 2477-86.

Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., *et al.* (2000). Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. J Am Oil Chem Soc **77**(11): 1121-1126.

Matsumoto, M., Kida, K. et Kondo, K. (2001). Enhanced activities of lipase pretreated with organic solvents. J Chem Technol Biotechnol **76**(10): 1070-1073.

Mead, D. A., Szczesna-Skorupa, E. et Kemper, B. (1986). Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Protein Eng **1**(1): 67-74.

Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., *et al.* (2007). A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens.* J Biol Chem **282**(43): 31477-31483.

Meilleur, C., Hupe, J. F., Juteau, P., *et al.* (2009). Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. J Ind Microbiol Biotechnol **36**(6): 853-61.

Mogensen, J. E., Sehgal, P. et Otzen, D. E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. Biochem **44**(5): 1719-30.

Molin, S. O., Nygren, H. et Dolonius, L. (1978). A new method for the study of glutaraldehyde-induced crosslinking properties in proteins with special reference to the reaction with amino groups. J Histochem Cytochem **26**(5): 412-4.

Montanucci, L., Fariselli, P., Martelli, P. L., *et al.* (2008). Predicting protein thermostability changes from sequence upon multiple mutations. Bioinf **24**(13): I190-I195.

Nakano, H., Ide, Y., Tsuda, T., *et al.* (1998). Improvement in the organic solvent stability of *Pseudomonas lipase* by random mutation. Enz Eng Xiv **864**: 431-434.

Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., *et al.* (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. J Biol Chem **275**(40): 31219-25.

Nawani, N., Dosanjh, N. S. et Kaur, J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: Characterization and esterification studies. Biotechnol Lett **20**(10): 997-1000.

Nawani, N., Singh, R. et Kaur, J. (2006). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. Electron J Biotechnol **9**(5): 559-565.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., *et al.* (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Appl Microbiol Biotechnol **51**(6): 711-729.

Novick, S. J. et Rozzwell, J. D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. Methods in Biotechnology: Microbial enzymes and biotransformations. **17** (16). Humana Press Inc. 247-271.

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., *et al.* (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. inNovations, Novagen, Inc.: 1-3.

Ognjanovic, N., Bezbradica, D. et Knezevic, Z. (2008). Optimization of the production of biodiesel by a commercial immobilized lipase in a solvent-free system using a response surface methodology. J Serb Chem Soc **73**(2): 147-156.

Oh, S. W., Gaskin, D. J. H., Young Kwon, D., *et al.* (2001). Properties of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase with amino acid substitutions of Phe94 in the substrate binding domain. Biotechnol Lett **23**(7): 563-568.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., *et al.* (1992). The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng **5**(3): 197-211.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science **276**(5313): 734-40.

Palomo, J. M., Segura, R. L., Mateo, C., *et al.* (2004). Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. Biomacromolecules **5**(1): 249-254.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., *et al.* (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem **29**: 119-131.

Park, E. Y., Sato, M. et Kojima, S. (2006). Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. Enz Microb Technol **39**(4): 889-896.

Park, H. J., Jeon, J. H., Kang, S. G., *et al.* (2007). Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. Protein Expression Purif **52**(2): 340-347.

Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., *et al.* (2000). Lipase engineering database - Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. J Mol Catal B-Enzym **10**(5): 491-508.

Pleiss, J., Fischer, M. et Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. Chem Phys Lipids **93**(1-2): 67-80.

Plou, F. J., Ferrer, M., Nuero, O. M., *et al.* (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnol Tech **12**(3): 183-186.

Rajendhran, J. et Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. Biotechnol Adv **26**(6): 576-590.

Rao, M. N., Kembhavi, A. A. et Pant, A. (2000). Immobilization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus* on silica gel. Biotechnol Lett **22**(19): 1557-1559.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., *et al.* (2001). Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. Appl Environ Microbiol **67**(9): 4064-9.

Robertson, D. E. et Steer, B. A. (2004). Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. Curr Opin Chem Biol **8**(2): 141-149.

Rodrigues, A. S., Cavalcante, G. P., Ferrei, A. L. O., *et al.* (2008). Immobilization of *Candida antarctica* lipase type B by adsorption on activated carbon. Chem Biochem Eng Quarter **22**(1): 125-133.

Rogers, J. (1996). Rare codon usage in *Escherichia coli* and the expression of potentially toxic genes. Parasitol Today **12**(3): 124; author reply 124-5.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., *et al.* (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl Environ Microbiol **66**(6): 2541-2547.

Rossi, M., Ciaramella, M., Cannio, R., *et al.* (2003). Extremophiles 2002. J Bacteriol **185**(13): 3683-3689.

Ruiz, C., Falcocchio, S., Pastor, F. I., *et al.* (2007). *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. Appl Environ Microbiol **73**(8): 2423-31.

Ruiz, C., Javier Pastor, F. I. et Diaz, P. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. Lett Appl Microbiol **37**(4): 354-9.

Salameh, M. A. et Wiegel, J. (2007). Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. Appl Environ Microbiol **73**(23): 7725-31.

Schloss, P. D. et Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. Curr Opin Biotechnol **14**(3): 303-310.

Schloss, P. D. et Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. Genome Biol **6**(8): 229.

Schmeisser, C., Steele, H. et Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. Appl Microbiol Biotechnol **75**(5): 955-962.

Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D., *et al.* (2002). Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. Protein Eng **15**(7): 595-601.

Schmitz, J. E., Daniel, A., Collin, M., *et al.* (2008). Rapid DNA library construction for functional genomic and metagenomic screening. Appl Environ Microbiol **74**(5): 1649-1652.

Schwartz, K. (2006). Recent advances in marine metagenomics. MMG445 Basic Biotechnol J(2): 165-169.

ServinGonzalez, L., Castro, C., Perez, C., *et al.* (1997). bldA-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (lipA) is mediated by the product of a contiguous gene, lipR, encoding a putative transcriptional activator. J Bacteriol **179**(24): 7816-7826.

Sharma, R., Chisti, Y. et Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv **19**(8): 627-662.

Sharma, R., Ranjan, R., Kapardar, R. K., *et al.* (2005). 'Unculturable' bacterial diversity: An untapped resource. Curr Sci **89**(1): 72-77.

Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., *et al.* (2002). Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp RSJ-1. Process Biochem **37**(10): 1075-1084.

Sibille, N., Favier, A., Azuaga, A. I., *et al.* (2006). Comparative NMR study on the impact of point mutations on protein stability of *Pseudomonas mendocina* lipase. Protein Sci **15**(8): 1915-1927.

Simon, L. M., Laszlo, K., Vertesi, A., *et al.* (1998). Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. J Mol Catal B-Enz **4**(1-2): 41-45.

Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., *et al.* (2001). Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. Protein Expr Purif **22**(3): 388-98.

Snellman, E. A., Sullivan, E. R. et Colwell, R. R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. Eur J Biochem **269**(23): 5771-9.

Soliman, N. A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y. R., *et al.* (2007). Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. Process Biochem **42**(7): 1090-1100.

Steele, H. L. et Streit, W. R. (2005). Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. FEMS Microbiol Lett **247**(2): 105-11.

Sullivan, E. R., Leahy, J. G. et Colwell, R. R. (1999). Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a Proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. Gene **230**(2): 277-285.

Sulzenbacher, G., Shareck, F., Morosoli, R., *et al.* (1997). The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic cre, expression, and X-ray structure at 1.75 A resolution. Biochem **36**(51): 16032-9.

Talukder, M. M. R., Tamalampudy, S., Li, C. J., *et al.* (2007). An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. Biochem Eng J **33**(1): 60-65.

Tesch, C., Nikoleit, K., Gnau, V., *et al.* (1996). Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. J Bacteriol **178**(7): 1858-65.

Thompson, C. J., Fink, D. et Nguyen, L. D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. Genome Biol **3**(7): 1-4.

Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpichamchai, P., *et al.* (2008). Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. J Biotechnol **133**(1): 42-49.

Tsai, W. T., Lai, C. W. et Hsien, K. J. (2006). Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. J Colloid Interface Sci **297**(2): 749-54.

Upton, C. et Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? Trends Biochem Sci **20**(5): 178-9.

van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. Curr Opin Microbiol **6**(3): 213-218.

Vieille, C. et Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol Mol Biol Rev **65**(1): 1-43.

Vieites, J. M., Guazzaroni, M. E., Beloqui, A., *et al.* (2009). Metagenomics approaches in systems microbiology. Fems Microbiol Rev **33**(1): 236-255.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., *et al.* (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Appl Environ Microbiol **69**(10): 6235-42.

Vujaklija, D., Schroder, W., Abramic, M., *et al.* (2002). A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. Arch Microbiol **178**(2): 124-30.

Wang, G. Y. S., Graziani, E., Waters, B., *et al.* (2000). Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. Org Lett **2**(16): 2401-2404.

Wang, Y. X., Srivastava, K. C., Shen, G. J., *et al.* (1995). Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated *Thermophilic Bacillus*, Strain A30-1 (Atcc-53841). J Ferm Bioeng **79**(5): 433-438.

Yan, Y. L., Yang, J., Dou, Y. T., *et al.* (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(21): 7564-7569.

Yang, G., Wu, J. P., Xu, G., *et al.* (2009). Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. J Mol Catal B-Enz **57**(1-4): 96-103.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. et Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**(1): 103-19.