

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Clonage, expression et caractérisation de déacétylases
de *Streptomyces coelicolor* M145.**

Julie Séguin

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

Jury d'évaluation :

Directeur de recherche	François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur interne	Réjean Beaudet, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Yves Hurtubise, Agro Terra Biotech

© Droits réservés de Julie Séguin, 2006

CITATION

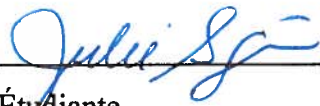
La facilité est le plus beau don de la nature, à la condition qu'on n'en use jamais.

Chamfort (1741-1794)

RÉSUMÉ

La chitine est le deuxième biopolymère le plus répandu sur Terre et se retrouve dans la paroi cellulaire des champignons, la carapace des insectes et des crustacés. Une fois déacétylée, elle devient du chitosane, un polymère plus soluble, non toxique et biodégradable, utilisé dans plusieurs domaines dont le biomédical, la médecine vétérinaire, l'agriculture, les cosmétiques, le traitement des eaux et le textile. Le but éventuel du projet est de remplacer le traitement actuel de déacétylation de la chitine par une méthode plus propre, contrôlable, soit l'utilisation d'enzymes, les déacétylases de chitine.

Chez la bactérie *Streptomyces coelicolor*, 10 déacétylases présomptives ont été répertoriées en comparant la séquence de l'acétyl xylane estérase (AxeA) de *Streptomyces lividans*, une enzyme ayant une activité de déacétylation et possédant le domaine NodB (identificateur de déacétylases), au génome de celle-ci. Neuf de ces gènes correspondants ont été clonés chez le vecteur d'expression *Streptomyces lividans* et trois déacétylases présomptives ont été exprimées, purifiées et caractérisées, soit les protéines SC H35.12c, SC M10.24c et SC D95.17c. L'enzyme SC H35.12c a démontré une activité de déacétylation plus importante que les deux autres, comparable à celle de l'AxeA testée simultanément. Elle a été purifiée par colonne échangeuse d'ions et tamis moléculaire, et a été apte à déacétyler le substrat DP6 (hexa-*N*-acétylchitohexaose). Les conditions optimales obtenues sont les suivantes : pH 9, 40°C dans le tampon Tris-HCl. La réaction semble être très lente étant donné qu'elle s'est prolongée sur une durée de 48h. Les deux autres enzymes ont aussi démontré une activité de déacétylation, qui s'est avérée cependant très faible. Il serait intéressant d'effectuer des études de DNA shuffling ou de mutagenèse dirigée sur ces nouvelles déacétylases de chitine pour en améliorer l'efficacité et éventuellement développer un nouveau procédé industriel de déacétylation de la chitine impliquant ces enzymes en remplacement du traitement actuel.


Étudiante


Directeur de recherche


Codirecteur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, M. François Shareck, de m'avoir généreusement accueillie dans son laboratoire pour la réalisation de ma maîtrise. Il m'a donné de nombreux conseils tout au long de mon projet et m'a permis de développer mon sens de la débrouillardise. J'aimerais aussi remercier mon codirecteur de recherche, M. Claude Dupont, pour ses encouragements et son implication dans mon projet. Il a su me pousser et démontrer un grand intérêt dans mon travail de laboratoire.

Un grand merci à Liette Biron, elle m'a initiée aux techniques de laboratoire et j'ai pu profiter de son immense expérience. Elle a été d'une aide précieuse, m'a donné de nombreux petits conseils et a su me donner confiance en moi. J'aimerais aussi remercier Roger Dubuc pour sa grande compétence et pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses « petites questions »... Merci à Raymonde Jetté pour sa grande serviabilité, son sourire et sa bonne humeur qui ont su rendre l'atmosphère du laboratoire si agréable.

J'aimerais remercier François-Xavier Lussier. Il m'a aidée à plusieurs occasions et j'ai bien aimé le cotoyer au laboratoire. Merci aussi à Amélie Côté; son dynamisme, sa gaîté et son sourire ont fait d'elle une collègue très appréciée. J'aimerais remercier les stagiaires Mélissa Morin et Valérie Lavoie qui ont débuté le projet durant leur stage.

J'aimerais aussi remercier les membres du comité exécutif de l'AGEIAF, Hélène Castonguay, François D'amour, Julie Lahaie et Anne-Pascale Richardson, avec lesquels j'ai passé de très bons moments durant mon mandat d'un an en tant que responsable des activités socioculturelles. Ce fût un plaisir de travailler avec vous!

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, plus particulièrement mes parents qui ont fait beaucoup de sacrifices pour me permettre d'étudier dans un collège, de faire du sport et de la musique, pour que je puisse m'épanouir. Merci à mon père, Claude, pour son amour inconditionnel et ses encouragements tout au long de mes études, et à ma mère, Sylvie, pour m'avoir aidée dans mes leçons à la petite école, pour m'avoir inscrite aux « Petits Débrouillards », ce qui a accru mon intérêt envers les sciences, et pour son soutien tout au long de mes études. Merci Ma et Pa, sans vous je ne serais pas rendue où je suis, je vous adore. Et enfin, un grand merci à Fred, pour son amour, sa grande patience et ses nombreux encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

CITATION.....	ii
RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES LÉGENDES DE FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 CHITOSANE.....	5
1.1.1 Valorisation des déchets générés par les pêcheries.....	5
1.1.2 Chitine et chitosane.....	5
1.1.3 Déacétylation de la chitine en chitosane	7
1.1.4 Déacétylation de la chitine par approche enzymatique.....	7
1.1.4.1 Carbohydate estérase	7
1.1.4.2 Déacétylases de chitine	8
1.2 RECHERCHE DE DÉACÉTYLASES CHEZ <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> .	9
1.2.1 Actinomycètes.....	9
1.2.2 <i>Streptomyces coelicolor</i>	10
1.2.3 Génome de <i>Streptomyces coelicolor</i>	11
1.2.4 Séquençage du génome de <i>Streptomyces coelicolor</i>	12
1.2.5 Identification de 10 déacétylases présumptives chez <i>Streptomyces coelicolor</i>	12
1.2.6 Informations concernant les 10 déacétylases	12
1.2.7 Analyse des séquences en acides aminés et alignement de ces dernières.....	14
1.2.8 Environnement des gènes	20
1.2.8.1 SC H35.12c	20
1.2.8.2 SC M10.24c	23
1.2.8.3 SC D95A.17c	23
1.3 EXPRESSION DE PROTÉINES.....	24
1.3.1 Système d'expression.....	24
1.3.2 Le système d'expression <i>Streptomyces lividans</i>	24
1.3.3 Vecteurs d'expression.....	25
1.3.4 Les vecteurs pIAF550MCSL et C109MCS	25
1.4 IDENTIFICATION DE PROTÉINES.....	26
1.4.1 Spectrométrie de masse.....	26
1.4.2 Immunobuvardage	27
1.5 PURIFICATION DE PROTÉINES	28
1.5.1 Colonnes échangeuses d'ions	28
1.5.2 Tamis moléculaire.....	29
1.5.3 Chromatographie par affinité.....	30
1.6 CARACTÉRISATION DE PROTÉINES	31

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE	33
2.1 LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS	34
2.2 SOUCHES BACTÉRIENNES	38
2.3 VECTEURS	38
2.4 LISTE DES MILIEUX DE CULTURE.....	42
2.4.1 Milieux utilisés pour la croissance de <i>Streptomyces</i>	42
2.4.1.1 Méthode de sélection	42
2.4.1.2 Milieu TSB.....	42
2.4.1.3 Milieu Bennett	42
2.4.1.4 Milieu R5 liquide	43
2.4.1.5 Milieu R5 solide.....	43
2.4.1.6 Milieu Stewart.....	44
2.4.1.7 Milieu minimal M14	44
2.4.2 Milieux utilisés pour la croissance d' <i>Escherichia coli</i>	44
2.4.2.1 Méthode de sélection	44
2.4.2.2 Milieu Simmons citrate.....	45
2.4.2.3 Milieu 2XTY.....	45
2.5 LISTE DES PROTOCOLES	46
2.5.1 Méthodes utilisées pour le clonage des gènes.....	46
2.5.1.1 Extraction d'ADN chromosomique	46
2.5.1.2 PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)	47
2.5.1.3 PCR sur colonie	47
2.5.1.4 Migration d'ADN en gel d'agarose	49
2.5.1.5 Purification d'ADN provenant d'un gel d'agarose	49
2.5.1.6 Digestion d'ADN	50
2.5.1.7 Ligation d'ADN	50
2.5.1.8 Préparation de protoplastes de <i>Streptomyces lividans</i> 10-164	51
2.5.1.9 Transformation de protoplastes de streptomycètes	52
2.5.2 Méthodes utilisées pour la confirmation du clonage	53
2.5.2.1 Isolement de plasmides chez les streptomycètes	53
2.5.2.2 Préparation de cellules compétentes d' <i>Escherichia coli</i> DH11S.....	54
2.5.2.3 Transformation d' <i>Escherichia coli</i> par choc thermique	55
2.5.2.4 Isolement de plasmides chez <i>Escherichia coli</i> (Méthode FlexiPrep™)	55
2.5.2.5 Lyophilisation de souches de streptomycètes	57
2.5.3 Méthodes utilisées pour exprimer et identifier les protéines	58
2.5.3.1 Préparation de cultures liquides de streptomycètes	58
2.5.3.2 Sonification de cellules de streptomycètes	58
2.5.3.3 Lyse des cellules à la presse de French.....	59
2.5.3.4 Précipitation de protéines à l'acétone	59
2.5.3.5 Migration de protéines en gel SDS-PAGE	60
2.5.3.6 Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose (Western Blot)	61
2.5.3.7 Immunodétection de type ECL	62
2.5.3.8 Digestion de protéines à la trypsine et purification par colonne Zip Tip...63	
2.5.3.9 Dosage de protéines (Méthode de Bradford)	64
2.5.4 Méthodes utilisées pour la purification des protéines.....	65
2.5.4.1 Concentration des protéines sur membrane Amicon	65
2.5.4.2 Purification par colonne Hitrap.....	65

2.5.4.3 Purification par colonne Histrap	66
2.5.4.4 Purification par HPLC	66
2.5.4.5 Purification par tamis moléculaire	67
2.5.4.6 Concentration des protéines par Macrosep	68
2.5.5 Méthodes utilisées pour la caractérisation des protéines	69
2.5.5.1 Test enzymatique	69
2.5.5.2 Dosage de l'acide acétique.....	69
3. RÉSULTATS	71
3.1 CLONAGE DES GÈNES DE DÉACÉTYLASES	72
3.2 EXPRESSION ET IDENTIFICATION DES PROTÉINES	73
3.2.1 Identification de la protéine SC H35.12c.....	73
3.2.1.1 Expression de la protéine et migration en gel SDS-PAGE.....	73
3.2.1.2 Digestion tryptique et analyse par spectrométrie de masse de la protéine.	74
3.2.2 Identification de la protéine SC D95A.17c.....	77
3.2.2.1 Expression de la protéine et migration en gel SDS-PAGE.....	77
3.2.2.2 Digestion tryptique et analyse par spectrométrie de masse de la protéine.	77
3.2.2.3 Expression et récupération des protéines intra et extracellulaires	81
3.2.2.4 Migration en gels SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western	81
3.2.3 Identification de la protéine SC M10.24c.....	82
3.2.3.1 Expression et récupération des protéines intracellulaires	82
3.2.3.2 Expression et récupération des protéines intracellulaires avec queue de polyhistidine.....	83
3.2.3.3 Migration en gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western	83
3.3 PURIFICATION DES PROTÉINES.....	84
3.3.1 Purification de la protéine SC H35.12c	84
3.3.1.1 Préparation de la culture de trois jours et concentration du surnageant.....	84
3.3.1.2 Purification par HPLC sur colonne cationique Protein-Pak™ CM 8HR...84	84
3.3.1.3 Purification par tamis moléculaire HiPrep.....	86
3.3.1.4 Confirmation de la protéine H35 purifiée par spectrométrie de masse.....	88
3.3.2 Purification de la protéine SC D95A.17c	90
3.3.2.1 Préparation de la culture 48h et récupération des protéines intracellulaires	90
3.3.2.2 Passage sur colonne Histrap et pool des fractions	90
3.3.2.3 Confirmation de la protéine SC D95A.17c.....	90
3.3.3 Purification de la protéine SC M10.24c.....	92
3.3.3.1 Préparation de la culture 48h et récupération des protéines intracellulaires	92
3.3.3.2 Passage sur colonne Histrap et pool des fractions	92
3.3.3.3 Confirmation de la protéine SC M10.24c	92
3.4 CARACTÉRISATION	95
3.4.1 Protéine SC H35.12c.....	95
3.4.2 Protéine SC D95A.17c.....	98
3.4.3 Protéine SC M10.24c	103

4. DISCUSSION	106
4.1 CLONAGE.....	107
4.2 EXPRESSION ET IDENTIFICATION DES PROTÉINES	107
4.2.1 Protéine SC H35.12c.....	107
4.2.2 Protéine SC D95A.17c.....	108
4.2.3 Protéine SC M10.24c	109
4.3 PURIFICATION DES PROTÉINES.....	109
4.3.1 Protéine SC H35.12c.....	109
4.3.2 Protéine SC D95A.17c.....	111
4.3.3 Protéine SC M10.24c	111
4.4 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES	112
4.4.1 Protéine SC H35.12c.....	112
4.4.2 Protéine SC D95A.17c.....	113
4.4.3 Protéine SC M10.24c.....	115
4.5 PERSPECTIVES	117
CONCLUSION.....	118
BIBLIOGRAPHIE.....	121
ANNEXES	128
ANNEXES 1-9 : SÉQUENCE DES GÈNES	129
ANNEXE 10 : Courbe* de référence pour la préparation de protoplastes	139

LISTE DES LÉGENDES DE FIGURES

Figure 1 : Photo de crustacés (Gouvernement du Canada).....	5
Figure 2 : Déacétylation de la chitine en chitosane	6
Figure 3 : Cycle de vie des streptomycètes.....	10
Figure 4 : Représentation du génome de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3	11
Figure 5 : Alignement des séquences des protéines déacétylases retrouvées chez <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
Figure 6 : Environnement immédiat des gènes SC H35.12c, SC M10.24c et SC D95A.17c dans le génome de <i>Streptomyces coelicolor</i> M145	20
Figure 7 : Séquence en nucléotides et traduction du gène SC H35.12c	21
Figure 8 : Position du peptide signal dans la séquence en acides aminés de la protéine SC H35.12c.....	22
Figure 9 : Résultats de l'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine SC H35.12c par le programme SignalP 3.0 et position du site de clivage du peptide signal identifié.....	22
Figure 10 : Représentation de la proximité des gènes SC D95A.17c et SC D95A.18c....	23
Figure 11 : Réaction d'immunobuvardage faisant appel à la technique d'immunochémi- lunescence	27
Figure 12 : Principes de chacune des méthodes de purification de protéines décrites dans ce travail; a) HPLC utilisant une colonne échangeuse de cations, b) tamis moléculaire et c) colonne Histrap	30
Figure 13 : Réactions chimiques impliquées dans le dosage de l'acide acétique, ainsi que les interactions entre chacune d'elles.....	32
Figure 14 : Carte de restriction du plasmide pIAFC109MCS	39
Figure 15 : Carte de restriction du plasmide pIAF550MCSL.....	40
Figure 16 : Carte de restriction du plasmide pTZ19R	41
Figure 17 : Méthode de filtration de Macrosep Centrifugal Device.....	68
Figure 18 : Migration en gel d'agarose 0,7% des produits de PCR suite à l'amplification des gènes	72
Figure 19 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines extracellulaires.....	73
Figure 20 : Gel SDS-PAGE ayant servi à découper la bande correspondant à la protéine SC H35.12c pour effectuer une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse	74
Figure 21 : Spectres de masse ayant servi à séquencer et à identifier différents peptides appartenant à la protéine SC H35.12c.....	75
Figure 22 : Position dans la séquence de la protéine SC H35.12c des différents peptides séquencés (rouge) suite à la digestion tryptique et à l'analyse par spectrométrie de masse des protéines provenant des trois différentes bandes dans le but d'identifier la protéine SC H35.12c.....	76
Figure 23 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines intracellulaires.....	77
Figure 24 : Gel SDS-PAGE d'où ont été découpées les bandes susceptibles de correspondre à la protéine SC D95A.17c en vue d'une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse.....	78
Figure 25 : Spectres de masses ayant servi à séquencer et à identifier différents peptides appartenant à la protéine SC D95A.17c.....	79

Figure 26 : Position des différents peptides séquencés et identifiés comme appartenant à la protéine SC D95A.17c suite à la digestion tryptique et à l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine correspondant à la bande située à 40kDa.....	80
Figure 27 : Gel SDS-PAGE et résultat de l'immunodétection des protéines produites ...	81
Figure 28 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines 550/10-164 et SC M10.24c.....	82
Figure 29 : Gel SDS-PAGE (A) et résultat de l'immunodétection des protéines.....	83
Figure 30 : Graphique représentant la purification par HPLC de la protéine SC H35.12c (A) et gels SDS-PAGE représentant plusieurs fractions (B)	85
Figure 31 : Graphique représentant la purification finale de la protéine SC H35.12c par tamis moléculaire HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (A) et gels SDS-PAGE (B) correspondant aux protéines extracellulaires de chacune des cultures initiales, au concentré obtenu après trois passages sur HPLC et aux protéines correspondant à chacun des pics obtenus lors du passage sur tamis moléculaire	87
Figure 32 : Gel SDS-PAGE ayant servi à découper la bande correspondant à la protéine SC H35.12c pour effectuer une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse	88
Figure 33 : Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse utilisant la base de données Mascot incluant le pointage Mascot, les peptides identifiés ainsi que leur position dans la séquence de la protéine	89
Figure 34 : Gels SDS-PAGE correspondant aux protéines recueillies pour chaque fraction suite au passage de la protéine SC D95A.17c sur colonne Histrap.....	91
Figure 35 : Gels SDS-PAGE (A) et immunobuvardage (B) correspondant à la migration des protéines recueillies pour chaque fraction suite au premier passage sur colonne Histrap des protéines intracellulaires produites par le clone contenant le gène correspondant à la protéine SC M10.24c	93
Figure 36 : Gels SDS-PAGE correspondant à la migration des protéines recueillies pour chaque fraction suite au deuxième passage sur colonne Histrap des protéines intracellulaires produites par le clone contenant le gène correspondant à la protéine SC M10.24c	94
Figure 37 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9)	96
Figure 38 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 effectuée pendant 24h dans le tampon Tris-HCl à un pH de 9,0 à 30, 40, 50 et 60°C.....	96
Figure 39 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée après différents intervalles de temps dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 dans le tampon Tris-HCl à un pH de 9 à une température de 40°C..	97
Figure 40 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC D95A.17c et le substrat <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9).....	100
Figure 41 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température à pH5 (tampon glutamate) et pH9 (tampon Tris-HCl) suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC D95A.17c sur le <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine	100

- Figure 42** : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée après différents intervalles de temps dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC D95A.17c et le substrat *N*-acétyl-D-glucosamine dans le tampon glutamate à un pH de 5 à une température de 50°C 101
- Figure 43** : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC M10.24c sur le substrat DP6 effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9)..... 104
- Figure 44** : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC M10.24c sur le substrat DP6 à pH9 pendant 24h dans le tampon Tris-HCl 104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales déacétylases de chitine.	8
Tableau II : Informations fournies par la bioinformatique concernant les 10 déacétylases retrouvées chez <i>Streptomyces coelicolor</i> et l'AxeA.....	13
Tableau III : Souches bactériennes utilisées.	38
Tableau IV : Vecteurs utilisés.	38
Tableau V : Température d'hybridation des amorces selon les puits du thermocycleur. .	47
Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour l'amplification de chacun des gènes.	48
Tableau VII : Quantité d'eau et de solution de γ -globuline 57,6mg/mL nécessaire pour obtenir les concentrations voulues.	64
Tableau VIII : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par les enzymes SC H35.12c et AxeA sur le DP6 à une température de 50°C pendant 24h.	95
Tableau IX : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC H35.12c (et AxeA au bas du tableau) sur le DP6 pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.	98
Tableau X : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC D95A.17c sur le <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine à une température de 50°C pendant 24h.	99
Tableau XI : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC D95A.17c sur le <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.	102
Tableau XII : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC M10.24c sur le DP6 à une température de 50°C pendant 24h.	103
Tableau XIII : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC M10.24c sur le DP6 pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ACS	Acétyl-CoA synthétase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
Amp	Ampicilline
ATP	Adénosine triphosphate
AxeA _{tr}	Acétyl xylane estérase tronquée
C	Cytosine
CMC	Carboxyméthylcellulose
CoA	Coenzyme A
CS	Citrate synthase
D.O.	Densité optique
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Éthylènediaminetétraacétate
g	Force gravitationnelle ou gramme
G	Guanine
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
h	Heure
H	Hydrogène
H ₂ O	Eau
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRP	Horseradish peroxydase
IgG	Immunoglobuline de type G
IPTG	Isopropyl- β -D-galactoside
kDa	KiloDalton
L	Litre
L-MDH	L-malate déhydrogénase
M	Molaire

MCS	Site de clonage multiple
min	Minute
mL	Millilitre
N	Normale
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
nm	Nanomètre
°C	Degré Celsius
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEG	Polyéthylène glycol
pI	Point isoélectrique
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluoride
RBB	Remazol brilliant blue
RPM	Révolution par minute
s	Seconde
SDS	Sodium dodécyle sulfate
T	Thymine
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS	Tris-saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TES	Acide N-Tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique
TSB	Tryptic soy broth
<i>tsr</i>	Gène de résistance au thiostrepton
V	Volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
μ g	Microgramme
μ L	Microlitre
μ M	Micromolaire

INTRODUCTION

La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur Terre, après la cellulose. Elle entre dans la composition de la paroi cellulaire des champignons et de la carapace des arthropodes, dont les crustacés. La déacétylation de ce polymère de β -(1-4) *N*-acétyl-D-glucosamine produit du chitosane. Ce dernier peut être utile dans plusieurs domaines dont le biomédical, la médecine vétérinaire, l'agriculture, le traitement des eaux, les cosmétiques et l'industrie du textile.

Il existe un traitement basique permettant de déacétyler la chitine (provenant surtout de carcasses de crustacés) pour en faire du chitosane. Ce procédé est employé depuis environ 100 ans et requiert l'utilisation de NaOH. Cependant, le traitement endommage le polymère qui résulte en un chitosane de longueur et de degré de déacétylation variables. Nous voulons développer des méthodes moins agressives et plus contrôlables en utilisant des enzymes telles que les déacétylases de chitine.

Ces enzymes sont des hydrolases et font partie des carbohydrates estérases, plus précisément de la famille 4. Elles ont été répertoriées chez plusieurs microorganismes jusqu'à présent. Elles possèdent toutes un domaine de fonction commun NodB. Nous nous sommes tournés vers les streptomycètes pour faire la recherche de nouvelles déacétylases. Sachant que ces bactéries saprophytes du sol produisent de nombreux métabolites secondaires, antibiotiques et enzymes pouvant dégrader toutes sortes de molécules retrouvées dans le sol, dont le xylane, la chitine et la cellulose, il est fort probable que parmi ces enzymes se trouvent des déacétylases de chitine.

Les résultats du séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor*, publié en mai 2002 (Bentley *et al.*, 2002), ont grandement aidé la recherche de déacétylases de chitine. En effet, en analysant ce génome pour trouver des domaines de fonction de déacétylation, 10 protéines présomptives possédant ces domaines ont été identifiées, mais leur substrat respectif et les circonstances dans lesquelles elles sont exprimées ne sont pas encore connus.

Dans cette étude, 9 de ces déacétylases présomptives ont été étudiées en clonant leurs gènes correspondants dans le système d'expression *Streptomyces lividans* 10-164 dans le but de les exprimer. Trois d'entre elles ont été produites et identifiées, soit les protéines SC M10.24c, SC D95A.17c et SC H35.12c. Elles ont toutes été purifiées et ont démontré une activité de déacétylase. Plus particulièrement, la protéine SC H35.12c a pu déacétyler le hexa-*N*-acétylchitohexaose de façon comparable à l'acétylxylane estérase de *Streptomyces lividans*, une enzyme déjà connue ayant la capacité de déacétyler ce substrat.

Cette étude a donc permis de découvrir trois nouvelles enzymes déacétylases, soit les protéines SC H35.12c, SC D95A.17c et SC M10.24c. Cela pourrait permettre de développer un procédé industriel impliquant la déacétylation enzymatique de la chitine pour remplacer les traitements chimiques actuellement utilisés. Éventuellement, des études de mutagenèse dirigée sur ces enzymes seraient intéressantes à réaliser pour améliorer l'efficacité de ces dernières à déacétyler la chitine.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 CHITOSANE

1.1.1 Valorisation des déchets générés par les pêcheries

L'industrie de la pêche au Canada est l'une des plus lucratives au monde et génère des profits d'environ 5 milliards de dollars par an. Des tonnes de poissons et fruits de mer sont consommés et exportés chaque année. Cette industrie vise la capture ou l'aquaculture de poissons, mollusques et crustacés (figure 1). Elle génère malheureusement de nombreux résidus tels les carcasses de crustacés qui sont non comestibles et difficilement utilisables, et habituellement immergées dans les océans (Gouvernement du Canada, Environnement Canada). Cependant, une des propriétés de la carapace des crustacés peut aider à la valorisation de ces résidus. En effet, elles sont composées, entre autres, de chitine, un biopolymère, qui une fois déacétylé se transforme en chitosane. Ce dernier possède de nombreuses qualités et peut être utilisé dans plusieurs domaines.



Figure 1 : Photo de crustacés (Gouvernement du Canada).

1.1.2 Chitine et chitosane

La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur Terre suivant la cellulose. Elle se retrouve généralement dans la composition de la paroi cellulaire des champignons et de la carapace des crustacés (Tsigos *et al.*, 2000; Tokuyasu *et al.*, 1999; Tokuyasu *et al.*, 2000; Borzacchiello *et al.*, 2001) tels que la crevette, le crabe et le homard. C'est un homopolymère linéaire de *N*-acétyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) relié par des liens β -(1-4) (Tsigos *et al.*, 2000; Tokuyasu *et al.*, 2000; Kafetzopoulos *et al.*, 1993). En raison de sa grande cristallinité, ce polymère est insoluble dans les solutions aqueuses

et dans les solvants organiques (Tsigos *et al.*, 2000). La chitine peut être extraite des carapaces de crustacés en broyant celles-ci pour en faire de la poudre, en procédant ensuite à une déminéralisation par un traitement acide au HCl, et enfin en faisant une déprotéination par un traitement alcalin au NaOH (Percot *et al.*, 2003).

Lorsque déacétylée, la chitine se transforme en chitosane (Zhao et Chang, 2004; Baran *et al.*, 2004) (figure 2). La présence de groupements amines libres sur le chitosane augmente la solubilité et la réactivité du polymère en comparaison avec la chitine (Zhao et Chang, 2004). Ce polymère est biodégradable, non-toxique et a une activité biologique intéressante (Baran *et al.*, 2004). Récemment, un intérêt particulier a été démontré pour l'utilisation du chitosane dans le domaine biomédical pour aider à la cicatrisation des blessures, servir de vecteur de médicaments, entrer dans la composition d'implants, participer à la fabrication de tissus biologiques (Zhao et Chang, 2004) et agir en tant que peau artificielle pour aider à la régénération de la peau des grands brûlés (Damour *et al.*, 1994). Ce polymère peut aussi avoir des applications dans le domaine vétérinaire. Ce sont sensiblement les mêmes que celles retrouvées chez l'humain (Senel et McClure, 2004). Il est aussi bénéfique pour le domaine de l'agriculture en stimulant l'activité microbiologique du sol et en aidant ainsi la croissance des plantes (Mulawarman *et al.*, 2001). Sa capacité à absorber les métaux lui confère la possibilité d'être utilisé dans le traitement des eaux polluées (Onsoyen et Skaugrud, 1990; Wu *et al.*, 2000). Il est aussi employé dans le domaine des cosmétiques pour la confection de produits pour le corps et dans le domaine du papier et des textiles (Jaworska *et al.*, 2003). Enfin, grâce à sa propriété d'antifeutrant, le chitosane est utilisé dans la fabrication de la laine (Roberts et Wood, 2001).

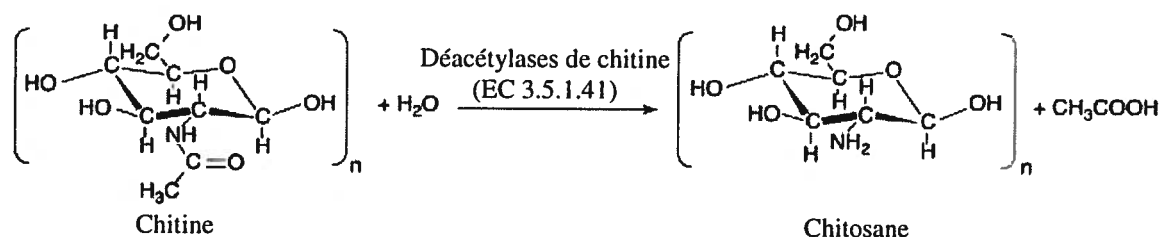


Figure 2 : Déacétylation de la chitine en chitosane (modifié de Tsigos *et al.*, 2000).

1.1.3 Déacétylation de la chitine en chitosane

Le moyen actuel utilisé pour déacétyler la chitine pour en produire du chitosane sous forme de polymère est un traitement alcalin au NaOH à de hautes températures (Jaworska *et al.*, 2003). Cependant, cette méthode est risquée pour l'environnement et difficile à contrôler. En effet, les produits obtenus par ce traitement sont très hétérogènes (Tsigos *et al.*, 2000). Pour ensuite convertir ce polymère en oligomère de chitosane, il existe un traitement par hydrolyse acide du polymère et un procédé chémoenzymatique, utilisant du lysozyme et des dérivés du tri-*N*-acétylchitotriose (Tsigos *et al.*, 2000). Cependant, les oligomères produits par ces deux méthodes sont de longueur et de degré de déacétylation variés. Comme toutes ces réactions sont plutôt grossières et n'offrent pas de résultats constants, il serait intéressant de se tourner vers une réaction plus spécifique, et à la fois écologique, telle que l'approche enzymatique.

1.1.4 Déacétylation de la chitine par approche enzymatique

1.1.4.1 Carbohydate estérase

Une enzyme est une protéine procédant à la catalyse d'une réaction biochimique à des températures habituellement physiologiques et parfois même beaucoup plus élevées. Le réactant de cette réaction est appelé substrat. Une enzyme peut posséder des domaines spécifiques d'attachement au substrat ou se lier directement à ce dernier. Il existe plusieurs catégories d'enzymes étant actives sur les carbohydates. Parmi ces dernières se trouvent les différentes classes suivantes : les glycosidases et transglycosidases, les glycosyltransférases, les lyases de polysaccharides et les estérases de carbohydates. La classe des estérases de carbohydates catalyse la dé-O ou la dé-N acétylation de saccharides. Elle est divisée en 14 familles. La famille 4 ou CE4 (Carbohydate Esterase Family 4) regroupe trois classes d'enzymes ayant différentes activités; les estérases d'acétylxylane (EC 3.1.1.72), les déacétylases de chitine (EC 3.5.1.41) et les déacétylases de chitooligosaccharides (EC 3.5.1.-) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

1.1.4.2 Déacétylases de chitine

Les déacétylases de chitine ont une fonction hydrolase, car elles procèdent à l'hydrolyse du groupement acétamide de la molécule de chitine pour former du chitosane et de l'acétate (se référer à la figure 2). Les principales déacétylases, et les mieux documentées, proviennent des organismes suivants : *Mucor rouxii* (Araki et Ito, 1975; Martinou *et al.*, 1993; Kafetzopoulos *et al.*, 1993), *Aspergillus nidulans* (Alfonso *et al.*, 1995), *Absidia coerulea* (Gao *et al.*, 1995) et *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos et Bouriotis, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996). Chacun de ces microorganismes possède donc une déacétylase, et dans le cas de *C. lindemuthianum*, il en possède deux. Les déacétylases provenant de ces organismes ont une masse moléculaire variant entre 24 et 150kDa, un pH optimum se situant entre 4,5 et 11,5, et une température optimale de 50°C. Les principales caractéristiques de ces enzymes sont répertoriées dans le tableau I (modifié de Tsigos *et al.*, 2000). Un fait intéressant est qu'elles ne sont pas capables de déacétyler des oligomères de chitine avec un niveau de polymérisation en-deçà de 2; elles sont toutefois de plus en plus efficaces à mesure que le degré de polymérisation augmente sur le polymère.

Tableau I : Principales déacétylases de chitine.

	Microorganisme de provenance				
	<i>Mucor rouxii</i>	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (DMS 63144)
Localisation	Périplasma	Périplasma	Sécrétée	Sécrétée	Sécrétée
Masse moléculaire (kDa)	75	75	27	24	150
Point isoélectrique	3	ND	2,75	ND	3-5
pH optimum	4,5	5,0	7,0	11,5	8,5
Température optimale (°C)	50	50	50	50	50
Inhibée par l'acétate	Oui	Oui	Non	Non	Non
Degré minimal de polymérisation	3	3	2	2	2

ND : Non disponible.

Une activité de déacétylase de chitine a aussi été observée chez plusieurs autres microorganismes, notamment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mishra *et al.*, 1997; Martinou *et al.*, 2001), *Schizosaccharomyces pombe* (Matsuo *et al.*, 2005), *Streptomyces lividans* (Caufrier *et al.*, 2003), *Uromyces viciae-fabae* (Deising et Siegrist, 1995), *Metarhizium anisopliae* (Nahar *et al.*, 2004), *Gongronella butleri* (Maw *et al.*, 2002) et *Clostridium aminovalericum* (Simunek *et al.*, 2004). De plus, on en a aussi répertoriée chez plusieurs zygomycètes dont *Syncephalastrum racemosum*, *Mucor circinelloides*, et différentes espèces du genre *Cunninghamella* (*ramosa* URM 1918, *bertholletia* IFM 46114, *echinulata* URM 2136 et *elegans* IFM 40505) (Amorim *et al.*, 2005).

Dans ces différentes études, l'expression de la déacétylase a été confirmée par plusieurs méthodes, dont la dégradation d'Edman, l'observation d'activité déacétylase, l'immunobuvardage. Pour ce qui est de la purification, on relate l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions (cationique et anionique) dans la plupart des études.

1.2 RECHERCHE DE DÉACÉTYLASES CHEZ *STREPTOMYCES COELICOLOR*

1.2.1 Actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries ayant des caractéristiques ressemblant aux mycètes. En effet, elles poussent sous forme de colonies d'hyphes ramifiés. Leur moyen de se multiplier s'effectue par sporulation à l'extrémité des hyphes. La grande majorité des actinomycètes vivent dans le sol, plus particulièrement dans les déchets organiques s'y trouvant. On dénombre 40 genres parmi les actinomycètes dont *Mycobacterium* et *Streptomyces* (Campbell et Mathieu, 1995).

1.2.2 *Streptomyces coelicolor*

Les streptomycètes (du grec *streptos*, courbé, tordu et *myces*, champignon) sont des bactéries à Gram positif non motiles du sol faisant partie des actinomycètes, plus précisément de l'ordre des actinomycétales, du sous-ordre des *streptomycineae* et de la famille des *streptomycetaceae*. Le genre *Streptomyces* est immense et compte environ 500 espèces (Prescott *et al.*, 2003). Le cycle de vie des streptomycètes est illustré à la figure 3. Ce sont des bactéries très importantes dans l'environnement étant donné qu'elles participent à de nombreux procédés métaboliques ainsi qu'à plusieurs biotransformations. Par exemple, elles effectuent la dégradation de lignocellulose et de chitine, ce qui en font des joueurs de taille dans le cycle du carbone. Ces bactéries jouent un rôle primordial en médecine étant donné qu'elles produisent de nombreux antibiotiques. Plus des deux tiers des antibiotiques actuellement utilisés proviennent de ces microorganismes (Bentley *et al.*, 2002). Parmi les actinomycètes, *Streptomyces coelicolor* est le représentant le mieux connu au niveau génétique (Hopwood, 1999).

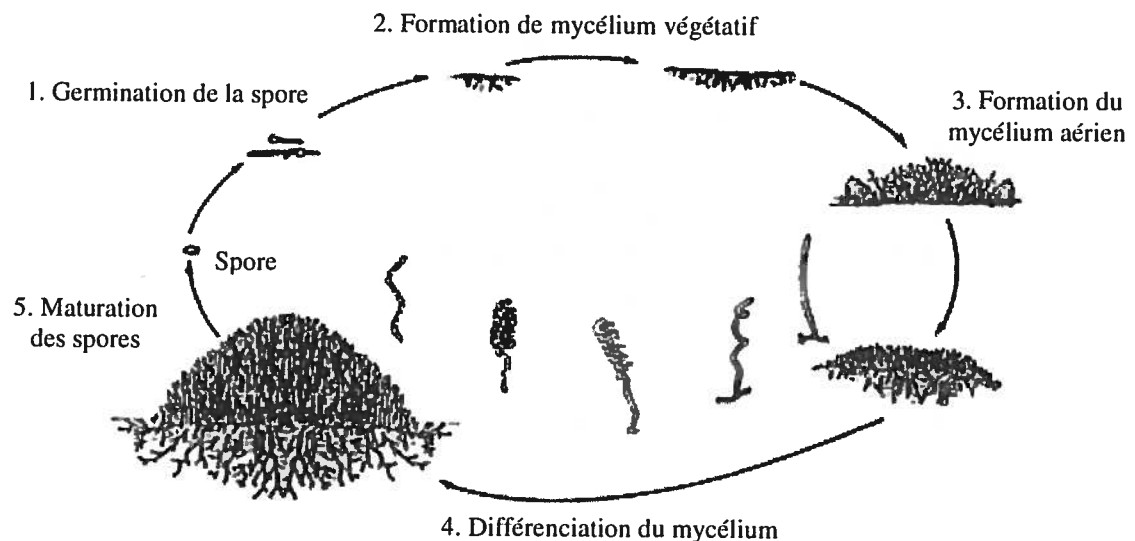


Figure 3 : Cycle de vie des streptomycètes. (modifié du site Internet <http://microbewiki.kenyon.edu/mediawiki-1.6.6/index.php/Streptomyces>)

1.2.3 Génome de *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor possède un génome très volumineux comprenant 8 667 507 paires de bases, très riche en composition G-C (72,12%). Il comprend 7 825 gènes, incluant les pseudogènes. Il est organisé en un unique chromosome linéaire ayant en son centre une origine de réplication (*oriC*), et à ses extrémités, des régions terminales inversées (TIR). La réplication du génome se fait de façon bidirectionnelle à partir de l'origine de réplication. Jusqu'à présent, c'est l'un des plus grands génomes bactériens à avoir été séquencé complètement. Selon la distribution des gènes dans le génome, il semblerait qu'il y ait un noyau central représentant l'équivalent de la moitié du chromosome ainsi qu'une paire de « bras » chromosomiques de chaque côté. Dans le noyau sont concentrés les gènes essentiels nécessaires à la division cellulaire, à la réplication de l'ADN, à la transcription, à la traduction et à la synthèse des acides aminés. De chaque côté de celui-ci se retrouvent des gènes responsables de fonctions non essentielles comme la synthèse de métabolites secondaires, d'enzymes hydrolytiques, etc. (Bentley *et al.*, 2002).

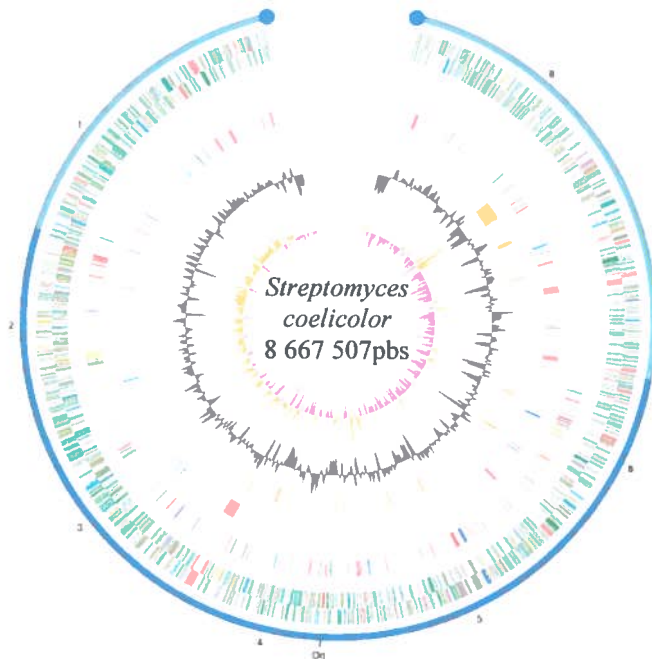


Figure 4 : Représentation du génome de *Streptomyces coelicolor* A3. En violet, noyau central; en bleu ciel, bras chromosomiques. (Tiré de l'article de Bentley *et al.*, 2002)

1.2.4 Séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor*

C'est en 2002 que le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* a été complété. Ceci a été fait à partir d'une banque de 325 cosmides comprenant des fragments du génome d'une longueur moyenne de 37,5Kb et se superposant les uns avec les autres. Leur ordre a été reconstitué et la séquence a été annotée en utilisant l'outil informatique Artemis. Les protéines résultant des différents gènes obtenus ont été classées par familles en effectuant une recherche de ressemblance avec d'autres protéines connues, dans la banque de données retrouvée sur NCBI. La carte génétique du génome de *Streptomyces coelicolor* a donc pu être réalisée (voir figure 4).

1.2.5 Identification de 10 déacétylases présomptives chez *Streptomyces coelicolor*

Afin de trouver des gènes codant pour des déacétylases de chitine dans le génome de *Streptomyces coelicolor*, la séquence du gène de l'acétylxylane estérase (AxeA) de *Streptomyces lividans* a été comparée au génome complet de *S. coelicolor*. En effet, cette enzyme possède le domaine NodB qui est retrouvé chez les déacétylases et qui agit comme identificateur de cette classe d'enzyme. De plus, celle-ci a démontré une activité de déacétylation sur des substrats chitineux tels la chitine-50 et le tetra-*N*-acétylchitotetraose (Caufrier *et al.*, 2003). En comparant la séquence de l'acétylxylane estérase au génome de *S. coelicolor*, cela permet de faciliter la recherche de déacétylases lui ressemblant (et ayant un domaine NodB, caractère d'identification des déacétylases). De cette manière, dix gènes codant pour des déacétylases présomptives ont été identifiés au niveau du génome de *S. coelicolor*.

1.2.6 Informations concernant les 10 déacétylases

La bioinformatique, et le fait que les séquences des gènes de déacétylases soient connues, donnent plusieurs informations intéressantes permettant d'orienter la recherche concernant ces protéines (tableau II). En effet, en connaissant la séquence du gène, il est

possible de faire la synthèse d'oligonucléotides pour permettre d'amplifier celui-ci par réaction de polymérisation en chaîne. Cela permet aussi de prédire la séquence en acides aminés de la protéine attendue ainsi que sa masse moléculaire. De plus, on peut analyser la séquence en acides aminés pour déterminer s'il y a un peptide signal, et par le fait même si la protéine est sécrétée. Cela permet de faciliter la recherche des protéines dans la partie intracellulaire ou extracellulaire selon le cas. Finalement, la séquence en acides aminés permet aussi d'estimer le point isoélectrique de chaque protéine. Cette information est importante pour orienter le choix de la méthode de purification : par exemple, l'utilisation de colonne échangeuse d'ions. En connaissant le point isoélectrique de la protéine, il est possible de travailler à des pH inférieurs ou supérieurs à ce dernier pour que la protéine soit chargée positivement ou négativement.

Les déacétylases présomptives retrouvées chez *Streptomyces coelicolor* font toutes partie de la catégorie d'enzymes de type 3.5.1.41 exceptée SC D95A.17c. Ce sont donc des déacétylases présumées de la grande famille des estérases de carbohydrates. Il est probable qu'elles arrivent à déacétyler des substrats chitineux tels la chitine, le chitosane et les oligomères de chitine de différentes tailles. Pour sa part, selon le domaine de fonction identifié, le substrat spécifique de l'enzyme présomptive SC D95A.17c serait plutôt le *N*-acétyl-D-glucosamine-6-phosphate.

Tableau II : Informations fournies par la bioinformatique concernant les 10 déacétylases retrouvées chez *Streptomyces coelicolor*.

Gènes	Longueur (pb)	Mr protéine (kDa)	Sécrétée	pI
SC C75A (AxeA)	1005	34,105	Oui	8,61
SC M10.24c	603	22,796	Non	6,72
SC H35.12c	834	29,122	Non	5,54
SC E59.21c	876	32,326	Oui	7,01
SC D16A.29c	918	33,142	Oui	4,66
SC 2G38.22	846	29,825	Oui	11,54
SC 6G4.37	873	32,607	Oui	5,38
SC 6G4.38	747	26,944	Oui	7,44
SC C61A.31	687	24,343	Non	8,26
SC D95A.17c	1143	39,557	Non	4,88

1.2.7 Analyse des séquences en acides aminés et alignement de ces dernières

En analysant les séquences en acides aminés de chacune de ces protéines, et en faisant l'alignement de celles-ci, il en ressort plusieurs informations. Nous remarquons une grande ressemblance dans la séquence qui débute autour du 83^e acide aminé du consensus et qui s'étend jusqu'au 334^e acide aminé (se référer à l'alignement des séquences à la figure 5). Cette zone correspond au domaine de fonction des déacétylases incluant le domaine NodB. Certaines sections semblent représenter une forte ressemblance, notamment entre les 120^e et 131^e acides aminés (V LTFDDGPDF), entre les 185^e et 195^e acides aminés (G VG HTFTH) et aussi entre les 232^e et 238^e acides aminés (LFRPPYG).

Il est à noter qu'une récente étude concernant le domaine catalytique de l'AxeA démontre que certains acides aminés semblent avoir une plus grande importance que d'autres et que ces derniers sont très conservés chez d'autres protéines apparentées (Puchart *et al.*, 2006). C'est le cas de trois histidines hautement conservées que nous retrouvons aussi chez les gènes de déacétylases à l'étude au 191^e (retrouvé chez toutes les séquences), au 195^e (chez toutes les protéines sauf SC D95A.17c) et au 298^e acides aminés du consensus (chez toutes les protéines sauf SC 6G4.38, SC C61A.31 et SC D95A.17c, voir figure 5). Il y aussi 3 asparagines très conservées aussi retrouvées chez les protéines à l'étude aux 126^e et 127^e acides aminés (chez toutes les protéines sauf SC D95A.17c) et au 271^e acide aminé (chez toutes les protéines sauf SC 6G4.37, SC 6G4.38, SC C61A.31 et SC D95A.17c). Cette grande homologie de séquence avec l'AxeA, surtout pour des acides aminés impliqués au niveau du site catalytique de l'enzyme, porte à croire que ces protéines pourraient démontrer une activité de déacétylation tout comme celle observée chez l'AxeA.

		1	10	20	30	46
AxeA CAB61737	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB63185	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB44539	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAC13081	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
	(47)	47	60	70	80	92
AxeA CAB61737	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB63185	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(36)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB44539	(47)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAC13081	(11)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(17)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(37)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(8)	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(47)		S V A		L G P A L	G
	(93)	93	100	110	120	138
AxeA CAB61737	(37)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB63185	(12)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(82)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB44539	(93)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAC13081	(56)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(63)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(83)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(54)	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(43)	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(45)	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(93)				V L T F D D G P D P	W T P V L
	(139)	139	150	160	170	184
AxeA CAB61737	(65)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB63185	(34)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(111)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB44539	(122)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAC13081	(78)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(92)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(127)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(86)	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(72)	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(80)	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(139)				A G P L V R R M A	E

Figure 5 : Alignement des séquences des protéines déacétylases retrouvées chez *Streptomyces coelicolor* : ■ , acides aminés identiques; ■ , acides aminés comportant certaines ressemblances (voir correspondance à la fin de la figure).

	(185)	185	190	200	210	220	230
AxeA CAB61737	(97)	GMWVANHSYTHPHMTQLGQ-----AQMDSERTSQQAATAGAGGGTP					
Oli deac CAB63185	(66)	GHVVGNHHTWHPLLTKLIR-----RRRSEEMERTSEVVEQAYGEAP					
Trans-deac CAB72208	(143)	GHEVGLHTFNHPDLRFQSE-----KRDWELSONQLAITGAAQVVRT					
Trans-deac CAB44539	(154)	GNEVGVHTFTHVDLSYQSQ-----ARVTREREQTQLALAGAAGITS					
Oli deac CAC13081	(110)	GHELAVHGHTHDRPWWPSP-----ARDTRELLRAVRVDEVSGRAP					
Oli deac CAB44415	(124)	CHRLCDHTVSHDTAMDKKSEA---YQAKEILDAERMLIEASGGVVRP					
Sec pro CAA20415	(159)	GITLNHHTLSHPYLPGLSY-----EDQKREICGMDVMEKHYGKRP					
Sec pro CAA20416	(118)	GASLQNHHTLDHRSIRGLPH-----AGQRAEICGQQTKRSRFGVRA					
Poly deac CAB92276	(118)	GVEIGSHGLTHVDLTTADD-----TTTAEATAESRALISELAGAPV					
NAG-deac CAB93044	(115)	GDIVGIHFEGFPFISPCRKGAHDEQLLRDPPAEVRKLVDAHGHAK					
Consensus	(185)	G VG HTFTH LT S I EI VIEGAAG P					
	(231)	231	240	250	260	276	
AxeA CAB61737	(138)	KLFRPPYGETNATLRSVEAKYGIETE-----VIWVDVSDQDWNNAS					
Oli deac CAB63185	(107)	RWFRAPYGANRAAFQLGSELMPEP-----LAWTVDTLDDWTTPE					
Trans-deac CAB72208	(184)	SLFRPPYSSADAMDNKSWPVTEYIGGRGYLVVNNNTDSEDWKKPG					
Trans-deac CAB44539	(195)	TLFRAPYSSQTDALDNYSWPVYESLGADGYTSVFIDTDSDDWKRPG					
Oli deac CAC13081	(151)	RWYRPPYGILTSGRWAAARRAGLRP-----VLWTAWGKDWHRDA					
Oli deac CAB44415	(167)	VYYRAPGGATTPYSRKLAAASHGMRP-----LGWNVDTKDFERPQ					
Sec pro CAA20415	(200)	VLFRPPYGNVNRDTLRAAKSCGKYAP-----LWSEEVYVDHWEY					
Sec pro CAA20416	(159)	HLFRPPHGTVDTTTLRAAADCGITA-----LVLWRATLDADGALT					
Poly deac CAB92276	(159)	TGFCYPYGTVDARAADAVRAAGYTY-----AC					
NAG-deac CAB93044	(161)	MTTLATELPGGLDSVRLLEVEHGVIAAVGHTDATYEQTVOAIDAGAT					
Consensus	(231)	LFRPPYG F GI VIW DS DW G					
	(277)	277	290	300	310	322	
AxeA CAB61737	(177)	T--DAIVQAVSRIINGQVILMHDWPAANTLAA-IPRIAQTLGKGLC					
Oli deac CAB63185	(146)	T-GTIVDRVEEGAAPGVVVLSHDAGGDRSQ--SVRALRRYLPPELLD					
Trans-deac CAB72208	(230)	V-DEIIRRAPTKGGKGAIVLMHDSGGDRHQ--TVQALDRFLPDLKK					
Trans-deac CAB44539	(241)	V-SKIVEWATPEDDEGASVLFHDAGGERSQ--TTEALPKYITEKMKKA					
Oli deac CAC13081	(190)	TPASVRATVAALDCGGGTNLLHDTDHASAPG-SWRATLGAIPDIVR					
Oli deac CAB44415	(206)	S-DAIVATVKRELSNGPTILFHDAGGDRTC--TTEALRQVLPWLKE					
Sec pro CAA20415	(240)	R-----EWDQDLHPGDIIVLTHFRGENDWDGTMMDVRRFLDRITA					
Sec pro CAA20416	(199)	Y-----TRGDHRLHPGDIIVAVDPDHPTAAN--LAARTEFLLETIEE					
Poly deac CAB92276	(187)	I-----DPGPLTGPYALPRVHVGQNDTP-VRLLLKTRLHRRRR					
NAG-deac CAB93044	(207)	VATHLFNAMPVVGHRAPGPITALLEDERITVELINDGTHLHPAALQ					
Consensus	(277)	IV L G IVL HD GGDR Q TV AL R LP L					
	(323)	323	330	340	350	360	368
AxeA CAB61737	(220)	SGMISPQTGRAVAPDGGGGGGGGGGGGACTATLSAGQRWGDYRN					
Oli deac CAB63185	(189)	SGVHLTVPRRRII-----					
Trans-deac CAB72208	(273)	KGVEFDNLTEALDAPGAMSP-----VTGAELWKGR					
Trans-deac CAB44539	(284)	KGVTFTTVSGVADQQSHQPQQSQQQGGGLQAAHHRATGATLYEGK					
Oli deac CAC13081	(235)	DCREALAVGPLGEHGGGATGTPGTAAVAGTAGTAGTAASFRSPA					
Oli deac CAB44415	(249)	QGRTFGFPVR-----					
Sec pro CAA20415	(280)	DGYAVARLEDYL-----					
Sec pro CAA20416	(238)	QGLRVNLENYL-----					
Poly deac CAB92276	(224)	RPAAGV-----					
NAG-deac CAB93044	(253)	LAHHHGAARVAFITDMDAAGFGDGHYLLGPLEVEVADGVARLVE					
Consensus	(323)	GY G L A					

Figure 5 : suite.

	(369)	369	380	390	400	414	
AxeA CAB61737	(266)	LNVSVSGASDWTVTMNVPSPAKVLSTWNVNASYPSAQTLTAKSNGS					
Oli deac CAB63185	(202)	-----					
Trans-deac CAB72208	(303)	AWVFLVQASEKLTDLVVGGLAVIGTVIGRFVLMMLLSGVVAHARRVR					
Trans-deac CAB44539	(330)	ALIAAVAVAEWTVPALSVGLVVVGVAVMGRFAMMLVLARRHHRQRN					
Oli deac CAC13081	(281)	PG-----					
Oli deac CAB44415	(259)	-----					
Sec pro CAA20415	(292)	-----					
Sec pro CAA20416	(250)	-----					
Poly deac CAB92276	(230)	-----					
NAG-deac CAB93044	(299)	GGSIAGSTLTLDRAFKRAVTVDRLPVGDVVAAI SANPARLLGLDDR					
Consensus	(369)						
	(415)	415	420	430	440	450	460
AxeA CAB61737	(336)	GGNKGATI QANGNWTWPSVSCTAG-----					
Oli deac CAB63185	(202)	-----					
Trans-deac CAB72208	(395)	RRRFRWGPVTEPVTVLVPAYNEAKCIENTVRSLSVSDHPVEVIVI					
Trans-deac CAB44539	(422)	RRRFSWGPVTPGVSVIPAYNEKECIEATLRSLARSTHPVEIIVV					
Oli deac CAC13081	(283)	-----					
Oli deac CAB44415	(259)	-----					
Sec pro CAA20415	(292)	-----					
Sec pro CAA20416	(250)	-----					
Poly deac CAB92276	(230)	-----					
NAG-deac CAB93044	(382)	-----					
Consensus	(461)						
	(461)	461	470	480	490	506	
AxeA CAB61737	(336)	-----					
Oli deac CAB63185	(202)	-----					
Trans-deac CAB72208	(395)	DDGSSDGRARIVEGLGLPGVRVIRQLNAGKPAALNRGLANARYDIV					
Trans-deac CAB44539	(422)	DDGSTDGRADIAESLGLPGVRVVRQANAGKPAALNNGVRHARYDIV					
Oli deac CAC13081	(283)	-----					
Oli deac CAB44415	(259)	-----					
Sec pro CAA20415	(292)	-----					
Sec pro CAA20416	(250)	-----					
Poly deac CAB92276	(230)	-----					
NAG-deac CAB93044	(382)	-----					
Consensus	(461)						
	(507)	507	520	530	540	552	
AxeA CAB61737	(336)	-----					
Oli deac CAB63185	(202)	-----					
Trans-deac CAB72208	(441)	VMMDGDTVFEPSTVRELVQPFPGDPRVGAVAGNAKVGNKDSLIGAWQ					
Trans-deac CAB44539	(468)	VMMDGDTVFEPDTPVRHLVQPFADPSVGAVAGNAKVGNNRRTLIGAWQ					
Oli deac CAC13081	(283)	-----					
Oli deac CAB44415	(259)	-----					
Sec pro CAA20415	(292)	-----					
Sec pro CAA20416	(250)	-----					
Poly deac CAB92276	(230)	-----					
NAG-deac CAB93044	(382)	-----					
Consensus	(507)						

Figure 5 : suite.

AxeA CAB61737	(553)	553	560	570	580	598	
Oli deac CAB63185	(336)	-----	-----	-----	-----	-----	
Trans-deac CAB72208	(202)	-----	-----	-----	-----	-----	
Trans-deac CAB44539	(487)	HIEYVMGFNLD	RRMYDVLG	CMPTIPG	AVGAFRR	SALEPIGGMSDDT	
Oli deac CAC13081	(514)	HIEYVMGFNLD	RRMYDLLR	CMPTIPG	AIGAFRR	EAVLQAGGMSDDT	
Oli deac CAB44415	(283)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20415	(259)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20416	(292)	-----	-----	-----	-----	-----	
Poly deac CAB92276	(250)	-----	-----	-----	-----	-----	
NAG-deac CAB93044	(230)	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	(553)	-----	-----	-----	-----	-----	
AxeA CAB61737	(599)	599	610	620	630	644	
Oli deac CAB63185	(336)	-----	-----	-----	-----	-----	
Trans-deac CAB72208	(533)	LAEDTDVTMAL	HRAGWRV	VYAENAR	AWTEAPES	VGQLWSQRYRWSY	
Trans-deac CAB44539	(560)	LAEDTDITIAL	HRAGWRV	VYEEHAR	AWTEAPGS	LGQLWSQRYRWSY	
Oli deac CAC13081	(283)	-----	-----	-----	-----	-----	
Oli deac CAB44415	(259)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20415	(292)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20416	(250)	-----	-----	-----	-----	-----	
Poly deac CAB92276	(230)	-----	-----	-----	-----	-----	
NAG-deac CAB93044	(382)	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	(599)	-----	-----	-----	-----	-----	
AxeA CAB61737	(645)	645	650	660	670	680	690
Oli deac CAB63185	(336)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(579)	GTMQAIWKGR	RAVIEK	GPSGRF	GRVGLP	FVSLFMV	LAPLLAPLIDV
Trans-deac CAB44539	(606)	GTMQALWKHR	RSRLTD	KGPSGR	FGRVGM	PLVLFQ	VVTPVFAPLIDV
Oli deac CAC13081	(283)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(259)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(292)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(250)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(230)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(382)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(645)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AxeA CAB61737	(691)	691	700	710	720	736	
Oli deac CAB63185	(336)	-----	-----	-----	-----	-----	
Trans-deac CAB72208	(625)	FLLYGLVFG	PTEKTI	VAVLGV	LAIQAV	CAAYAFRLDREKLTPLISL	
Trans-deac CAB44539	(652)	FTVYSMLF	VDFRA	ALLAWL	AVLGV	QLVCAAYAFRLDREKYRYLLMM	
Oli deac CAC13081	(283)	-----	-----	-----	-----	-----	
Oli deac CAB44415	(259)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20415	(292)	-----	-----	-----	-----	-----	
Sec pro CAA20416	(250)	-----	-----	-----	-----	-----	
Poly deac CAB92276	(230)	-----	-----	-----	-----	-----	
NAG-deac CAB93044	(382)	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	(691)	-----	-----	-----	-----	-----	

Figure 5 : suite.

	(737)	737	750	760	770	782
AxeA CAB61737	(336)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB63185	(202)	-----	-----	-----	-----	-----
Trans-deac CAB72208	(671)	PLQQILYRQIMYVLLQSWITALTGGRLRWQKLRRSGGVSAPPPGA				
Trans-deac CAB44539	(698)	PLQQLAYRQMMYLVLHSCVTALTGGRLRWQKLKRTGEVGTG				
Oli deac CAC13081	(283)	-----	-----	-----	-----	-----
Oli deac CAB44415	(259)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20415	(292)	-----	-----	-----	-----	-----
Sec pro CAA20416	(250)	-----	-----	-----	-----	-----
Poly deac CAB92276	(230)	-----	-----	-----	-----	-----
NAG-deac CAB93044	(382)	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus	(737)	-----	-----	-----	-----	-----
	(783)	783	790	800		
AxeA CAB61737	(336)	-----	-----	-----		
Oli deac CAB63185	(202)	-----	-----	-----		
Trans-deac CAB72208	(717)	DGVPPQRRSGAMDGRPVG				
Trans-deac CAB44539	(744)	-----	-----	-----		
Oli deac CAC13081	(283)	-----	-----	-----		
Oli deac CAB44415	(259)	-----	-----	-----		
Sec pro CAA20415	(292)	-----	-----	-----		
Sec pro CAA20416	(250)	-----	-----	-----		
Poly deac CAB92276	(230)	-----	-----	-----		
NAG-deac CAB93044	(382)	-----	-----	-----		
Consensus	(783)	-----	-----	-----		

Figure 5 : suite.

Correspondance :

AxeA CAB61737 = SC C75A (AxeA)
 Oli deac CAB63185 = SC M10.24c
 Trans-deac CAB72208 = SC E59.21c
 Trans-deac CAB44539 = SC D16A.29c
 Oli deac CAC13081 = SC 2G38.22
 Oli deac CAB44415 = SC H35.12c
 Sec pro CAA20415 = SC 6G4.37
 Sec pro CAA20416 = SC 6G4.38
 Poly deac CAB92276 = SC C61A.31
 NAG-deac CAB93044 = SC D95A.17c

1.2.8 Environnement des gènes

L'étude de l'environnement des gènes de déacétylases dans le génome pourrait s'avérer utile dans la recherche du substrat véritable de chaque enzyme. En effet, en scrutant les alentours du gène, et en analysant la nature des gènes rapprochés et leur fonction potentielle, cela pourrait donner des indices relatifs au substrat sur lequel chaque enzyme agit (étude faite pour trois des enzymes présumées, voir figure 6). Par exemple, si des gènes codant pour des protéines ayant un rôle à jouer sur certains substrats, ou si le gène de déacétylase semble se trouver au milieu d'un opéron, cela pourrait nous donner une piste pour identifier le substrat et ainsi orienter nos tests en conséquence.

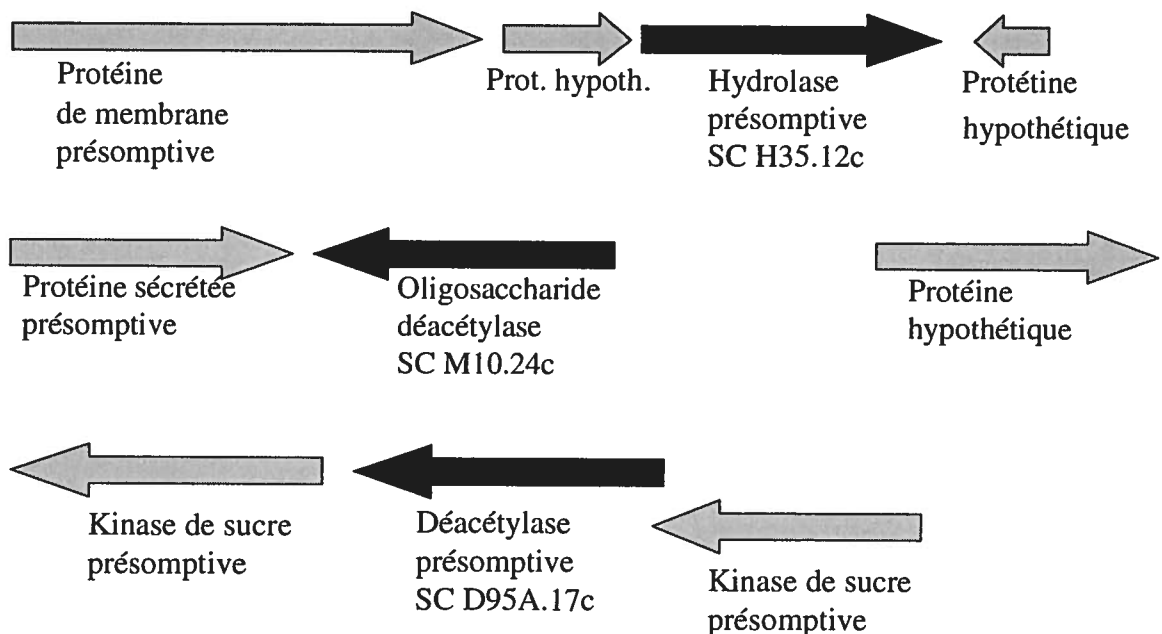


Figure 6 : Environnement immédiat des gènes SC H35.12c, SC M10.24c et SC D95A.17c dans le génome de *Streptomyces coelicolor* M145.

1.2.8.1 SC H35.12c

Le gène SC H35.12c code pour une protéine hydrolase présumptive. L'environnement du gène dans le génome est composé de gènes codant pour des protéines hypothétiques et une grosse protéine de membrane, ce qui ne donne pas d'indice pour la recherche du substrat véritable de cette protéine. Lors du séquençage du génome

de *Streptomyces coelicolor*, le gène SC H35.12c avait été décrit comme codant pour une hydrolase intracellulaire, car selon la séquence en acides aminés, il n'y avait pas de peptide signal identifiable. En analysant la séquence du gène, il se trouve une autre séquence ATG en aval du début du gène de départ qui pourrait coder pour la véritable méthionine de départ dans le même cadre de lecture que le gène original (figure 7). De plus, en aval de cet ATG se trouve un site RBS, séquence aidant à la fixation de l'ARNm au ribosome, promouvant ainsi la traduction de celui-ci en protéine (figure 7).



Figure 7 : Séquence en nucléotides et traduction du gène SC H35.12c.

Les peptides signaux chez les *Streptomyces* ont une longueur moyenne de 35 acides aminés, ce qui est supérieur à la moyenne des bactéries à Gram+ qui est de 31. Ils ont une structure tripartite comportant une région N, incluant des acides aminés chargés positivement, une région H riche en acides aminés hydrophobes et finalement une région C représentant le site de clivage consensus composé de la séquence Ala-Xxx-Ala (Lammertyn et Anné, 1998; Morosoli *et al.*, 1997). En analysant la séquence en acides aminés de la protéine SC H35.12c à partir de la seconde méthionine identifiée, il se trouve un peptide signal ayant les caractéristiques de ceux retrouvés chez le genre

Streptomyces et une longueur de 35 acides aminés (figure 8). Pour confirmer le résultat de l'étude de la séquence en acides aminés de la protéine, une analyse par le logiciel SignalP 3.0 a été réalisée. Les résultats obtenus confirment la présence d'un peptide signal et d'un site de clivage après le 35^e acide aminé (figure 9). La protéine SC H35.12c possède donc un peptide signal et est sécrétée. Son poids moléculaire est de 27,2kDa et suite au clivage du peptide signal, il passe à 23,8kDa.

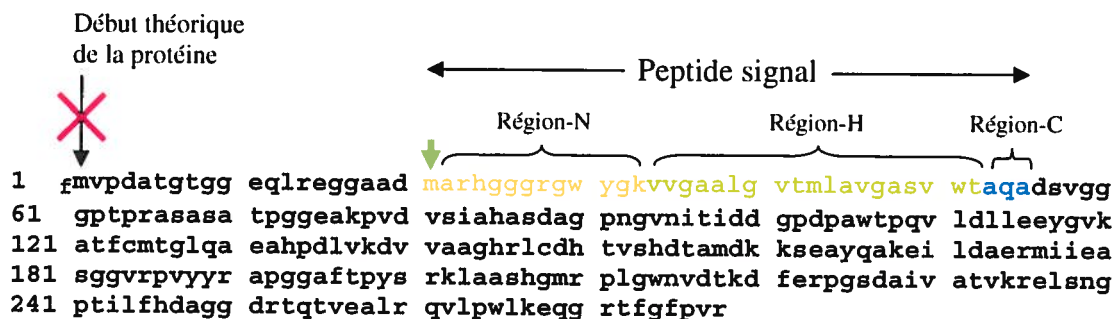


Figure 8 : Position du peptide signal dans la séquence en acides aminés de la protéine SC H35.12c.

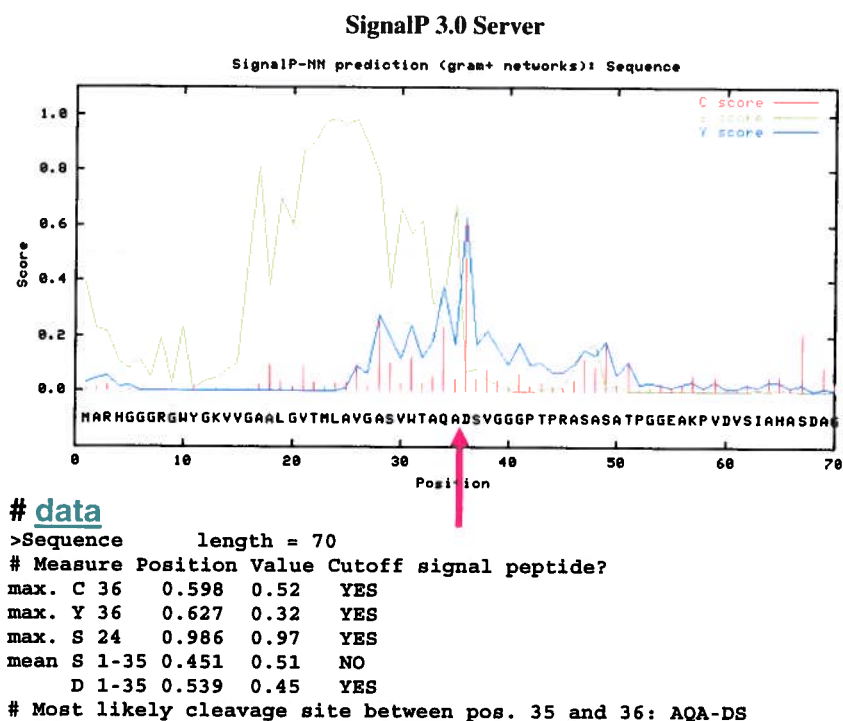


Figure 9 : Résultats de l'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine SC H35.12c par le programme SignalP 3.0 et position du site de clivage du peptide signal identifié.

1.3 EXPRESSION DE PROTÉINES

1.3.1 Système d'expression

L'élaboration d'un système d'expression consiste à mettre un gène d'intérêt à l'intérieur d'un vecteur plasmidique et d'insérer ce dernier dans une cellule hôte pour éventuellement faire exprimer le gène (Campbell et Mathieu, 1995). Il existe différents types de systèmes d'expression; les plus utilisés sont *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, des levures et des cellules de mammifères. Certains streptomycètes, pseudomonades, et champignons sont aussi utilisés. Les protéines exprimées dans des systèmes d'expression se divisent en quatre classes. La première comprend les peptides formés de moins de 80 acides aminés. La seconde regroupe les protéines comportant entre 80 et 500 acides aminés. Dans cette catégorie se retrouvent généralement les enzymes, les cytokines, les hormones, etc. Une troisième classe regroupe les protéines de plus de 500 acides aminés. Des exemples de protéines appartenant à cette classe sont les récepteurs de membrane et les grosses protéines sécrétées. Enfin, le quatrième groupe englobe toutes les protéines non sécrétées de plus de 80 acides aminés (Goeddel, 1991).

1.3.2 Le système d'expression *Streptomyces lividans*

Les streptomycètes sont de très bons producteurs d'exoenzymes de par leur nature de saprophytes du sol et décomposants de nombreuses macromolécules (Gusek et Kinsella, 1992; Anné et Van Mellaert, 1993). Parmi ces exoenzymes se trouvent des lipases, protéases, xylanases, chitinases, agarases, amylases et nucléases. Ces micro-organismes exportent donc des enzymes efficacement, ce qui est un avantage pour l'élaboration d'un système d'expression. *Streptomyces* est fréquemment utilisé comme cellule hôte pour accueillir des vecteurs à multi-copies (Gusek et Kinsella, 1992). De plus, le fait que ces bactéries soient non pathogènes et que les techniques de fermentation entourant celles-ci soient bien établies, fait de ces microorganismes des hôtes de choix pour la sécrétion de protéines (Anné et Van Mellaert, 1993). Ces bactéries ont aussi une

certaine habilité à sécréter des protéines étrangères, à reconnaître une grande quantité de promoteurs différents et à produire de faibles quantités de protéases (Gusek et Kinsella, 1992). Ces derniers avantages font une fois de plus de *Streptomyces lividans* un choix judicieux de cellule hôte pour l'expression de protéines.

1.3.3 Vecteurs d'expression

Les vecteurs d'expression sont des molécules d'ADN bien caractérisées qui contiennent une origine de répllication et peuvent se répliquer dans l'hôte. Ils contiennent aussi une séquence codant pour un caractère phénotypique permettant de confirmer leur présence (ex. résistance à un antibiotique). Ils sont dotés de sites de restriction permettant l'insertion de gènes (Prescott *et al.*, 2003).

1.3.4 Les vecteurs pIAF550MCSL et C109MCS

Le vecteur pIAF550MCSL est un dérivé plus court du vecteur pIAFC109MCS (se référer au tableau IV et aux figures 14 et 15). Ce sont tous deux des plasmides à multi-copies, ce qui permet d'avoir de nombreux exemplaires du gène cloné dans la bactérie et ainsi d'avoir une plus grande expression de protéines. Ils contiennent aussi le gène de résistance au thiostrepton, un antibiotique inhibant la croissance de *S. lividans*, ce qui permet de sélectionner les clones contenant le plasmide. Le promoteur présent sur ces plasmides est celui de la xylanase C de *S. lividans*. Il est situé en amont du site de clonage et permet donc de promouvoir la transcription des gènes clonés.

1.4 IDENTIFICATION DE PROTÉINES

1.4.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil fort intéressant pour l'identification de protéines. En effet, elle permet entre autres d'effectuer le séquençage des protéines. Les termes « spectrométrie de masse » sont apparus vers l'année 1920 suite à la détermination, pour la première fois, de la masse atomique d'un élément, soit le néon (20 et 22), par F. W. Aston. Par la suite, plusieurs autres éléments ont été étudiés. Durant la 2^e guerre mondiale, l'industrie grandissante du pétrole s'est tournée vers cette technique pour faire l'analyse des différents composés de ce produit pour améliorer sa qualité. Dans les années 50 et 60, la technique a ouvert ses horizons vers l'analyse de plus grosses molécules telles que les stéroïdes (Middleditch, 1979). De nos jours, elle est aussi utilisée pour effectuer le séquençage des protéines.

La spectrométrie de masse est très différente des autres formes de spectrométrie. En effet, elle est basée sur l'observation de l'effet d'une source d'énergie ionisante sur une molécule. Habituellement, suite à l'ionisation, la molécule se trouve sous forme d'ion. Si l'énergie appliquée est suffisante, l'ion est fragmenté. Ces nouveaux ions et l'ion moléculaire peuvent être détectés et représentent le spectre de masse (schématisé par des pics sur un graphique du ratio masse sur la charge en fonction d'un pourcentage). La masse de chaque ion peut alors être déterminée en multipliant la valeur obtenue par le nombre de charges et en soustrayant la valeur de la charge. Des pics isotopiques sont aussi observables sur le spectre de masse et sont à une distance de valeur entière (1, 2, 3, etc...) du pic principal. Les ions à multiples charges sont facilement reconnaissables, car les pics isotopiques sont à des distances non entières, résultat de la division m/z (ex. 0,5, 0,3, 0,25, etc...) (Middleditch, 1979). Dans le cas des protéines, il s'agit de digérer ces dernières à l'aide d'enzymes protéolytiques pour ainsi générer différents peptides. Ce sont ces derniers qui sont introduits dans le spectromètre de masse pour être fragmentés. En analysant la différence de masse entre les différents fragments obtenus, il est possible d'associer ces différences à la masse des acides aminés et ainsi reconstituer l'ordre de ces derniers dans le peptide, ce qui permet d'obtenir la séquence en acides aminés du peptide.

1.4.2 Immunobuvardage

Il est possible d'identifier une protéine en faisant un immunobuvardage si des anticorps spécifiques à cette dernière ou à une partie rajoutée à celle-ci (ex. queue de polyhistidine) sont disponibles. En effet, il suffit de faire migrer la protéine en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et d'effectuer un transfert de type Western sur une membrane. Les anticorps vont ensuite se lier à la protéine et des anticorps secondaires, c'est-à-dire spécifiques aux premiers, vont ensuite se lier à ceux-ci. Une enzyme est couplée à ces derniers (ex. phosphatase, peroxydase, etc.) et sert à la détection de la protéine. Dans le cas de l'immunochémiluminescence augmentée, la peroxydase est requise. Le principe de la méthode consiste à oxyder le luminol à l'aide de la peroxydase en conditions alcalines. Immédiatement après l'oxydation, le luminol est dans un état excité et émet de la lumière en revenant à l'état de base. L'utilisation de produits accélérateurs tels les phénols permet d'augmenter d'un facteur 1000 l'émission de lumière. Cette dernière atteint un maximum d'intensité après une durée de 5 à 20 minutes et a une demi-vie d'une heure. La longueur d'onde de la lumière émise est de 428nm et peut être détectée par une exposition à un film d'autoradiographie sensible à la lumière bleue (figure 11) (Isaccson et Watermark, 1974; Whitehead *et al.*, 1979; Rosewell et White, 1978; Motsenbocker, 1988).

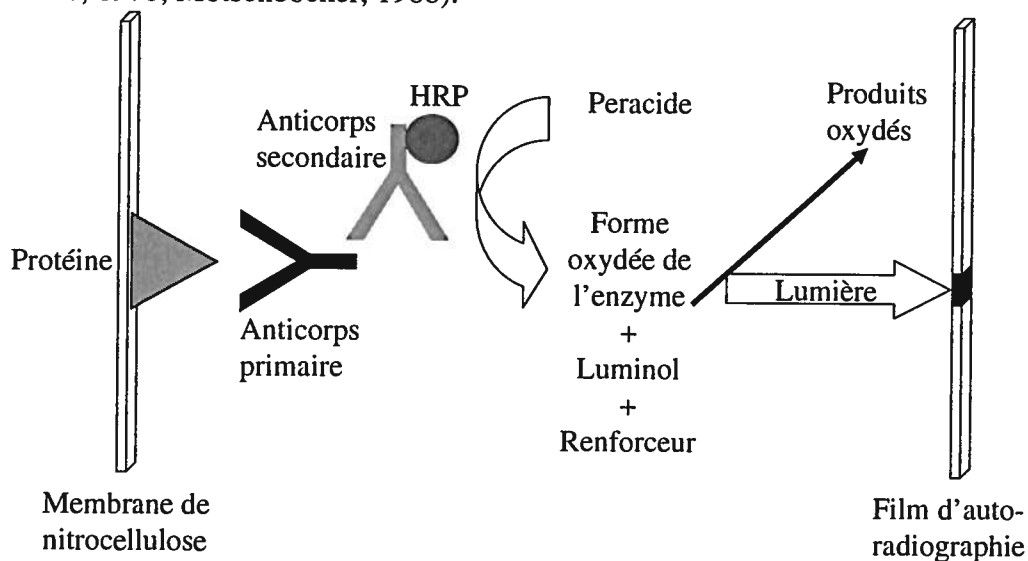


Figure 11 : Réaction d'immunobuvardage faisant appel à la technique d'immunochémiluminescence.

1.5 PURIFICATION DE PROTÉINES

Il existe de nombreuses méthodes de purification des protéines. Chacune d'elles est basée sur l'exploitation d'une caractéristique de la protéine à purifier. En effet, elles peuvent se baser sur la grosseur de celle-ci, son point isoélectrique, son affinité pour d'autres molécules, telles que les anticorps et certains métaux. La méthode la plus commune est sans doute celle du passage en colonne de chromatographie. Cette technique implique le retardement d'un composé à travers un certain matériel remplissant la colonne. C'est la nature du matériel à l'intérieur de celle-ci qui dictera sur quelle propriété de la protéine la purification de cette dernière sera basée. De cette façon, il existe donc la chromatographie à HPLC (high performance liquid chromatography), à échange d'ions, à affinité, à liaison à un ligand, à un anticorps, à filtration, etc. Le passage du composé dans la colonne peut être possible grâce à la simple force de gravité ou à l'aide d'une pompe péristaltique. La détection du composé est suivie à l'aide d'un détecteur à la sortie de la colonne. Différentes fractions du liquide sortant de la colonne sont récoltées dans le temps et analysées par la suite (Scopes, 1987). Dans ce travail, les techniques de chromatographie à échange d'ions (colonne cationique), à affinité (Ni-NTA) et à filtration (tamis moléculaire) seront abordées.

1.5.1 Colonnes échangeuses d'ions

Une protéine peut être chargée en étant dans un tampon au pH inférieur ou supérieur à son point isoélectrique (pI), point où la somme des charges sur celle-ci est égale à 0. Si le pH du tampon est inférieur au pI, la protéine sera chargée positivement, et inversement, si le pH est supérieur au pI, celle-ci sera chargée négativement. Le pH du tampon doit être supérieur ou inférieur au pI d'au moins une valeur de 0,3 pour que la liaison se fasse de façon efficace. Une protéine qui est chargée peut être purifiée en passant à travers une colonne remplie d'une matrice chargée de façon contraire à la protéine, ce qui attire cette dernière qui crée ainsi une liaison ionique avec la matrice (figure 12). Les colonnes échangeuses de cations sont habituellement composées de carboxyméthyl (CM) qui sera chargé négativement, mais peuvent aussi contenir du

sulfopropyle (SP). Pour leur part, les colonnes échangeuses d'anions sont composées de diéthylaminoéthyle (DEAE) chargé positivement, et peuvent aussi être composées de triéthylaminoéthyle (TEAE), de diéthyl-(2-hydroxypropyl) aminoéthylr (QAE) et de polyéthylène imino (PEI). Ces composés chargés peuvent être attachés à des matrices telles que la cellulose, l'agarose, le dextran, la silice et certains polymères. Il existe deux façons d'effectuer l'élution de la protéine qui est attachée à la matrice de la colonne. Il s'agit dans un premier temps de changer le pH du tampon entrant dans la colonne à une valeur où la liaison de la protéine n'est plus possible (diminuer le pH dans le cas des colonnes échangeuses d'anions et augmenter le pH dans le cas des échangeuses de cations). Il est aussi possible d'éluer la protéine en augmentant la force ionique (ex. gradient de sel) dans le tampon entrant, ce qui a pour effet de diminuer l'interaction électrostatique entre la protéine et la matrice, permettant ainsi à la protéine de décrocher (Scopes, 1987).

1.5.2 Tamis moléculaire

La technique du tamis moléculaire fut originellement mise au point par Porath et Flodin en 1959 et permet de séparer les macromolécules telles les protéines selon leur taille. En effet, cette technique consiste à faire passer les protéines à travers une colonne remplie de billes poreuses de dextran. Les pores compris dans celles-ci sont de grosseurs variables et non accessibles pour les molécules de grande taille. De cette façon, les plus petites molécules peuvent pénétrer dans les pores et sont ainsi retardées. Les plus grosses molécules, pour leur part, ne le sont pas, car elles passent entre les billes. Celles-ci sortent alors en premier dans le temps, suivies des molécules de grandeur moyenne qui se sont attardées dans quelques pores et finalement des plus petites molécules qui elles sont passées par tous les pores (figure 12). Les colonnes à tamis moléculaire sont généralement étroites et très longues de manière à obtenir une meilleure séparation des différents composés (Scopes, 1987).

1.5.3 Chromatographie par affinité

Le principe de la chromatographie par affinité, développée dans les années 60 et 70, est basée sur l'interaction entre une protéine, ou une partie de celle-ci, avec un ligand spécifique. Ce dernier doit pouvoir être emmagasiné à l'intérieur d'une colonne. La protéine spécifique au ligand sera retenue et les autres passeront à travers la colonne et en sortiront. L'utilisation de certains produits chimiques permet ensuite d'effectuer l'élution de la protéine retenue, car ces substances entrent en compétition avec cette dernière pour la liaison avec le ligand (Scopes, 1987). Un exemple de ce type de purification est l'utilisation d'une colonne contenant du sepharose chargé au nickel pour purifier les protéines possédant une queue de polyhistidine. Dans ce cas, la queue de polyhistidine est attirée par l'ion Ni^{2+} et l'imidazole est la substance utilisée pour effectuer l'élution de la protéine (figure 12).

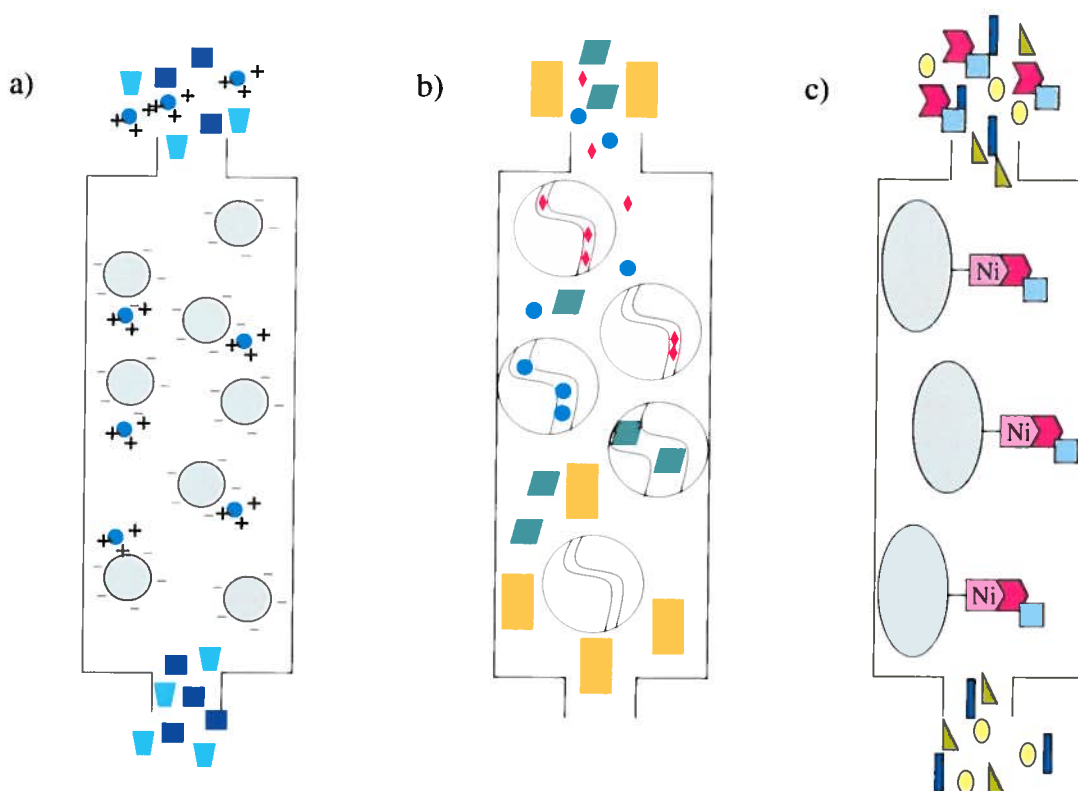


Figure 12 : Principes de chacune des méthodes de purification de protéines décrites dans ce travail; a) HPLC utilisant une colonne échangeuse de cations, b) tamis moléculaire et c) colonne Histrap.

1.6 CARACTÉRISATION DE PROTÉINES

Pour caractériser une protéine, il faut être en mesure de fournir le plus d'informations possible concernant celle-ci. Parmi ces données se trouvent la masse moléculaire, le point isoélectrique, le pH et la température optimaux de la réaction effectuée par l'enzyme, la cinétique de la réaction, la stabilité de l'enzyme, etc. Pour obtenir certaines de ces informations, il s'agit d'effectuer la réaction avec l'enzyme et son substrat, et de faire varier les paramètres contrôlant cette réaction (température, pH, etc.). Habituellement, la détection d'une substance libérée par la réaction permet de caractériser l'action de l'enzyme. Dans le cas de la déacétylation de la chitine, l'acétate sera la molécule à doser.

Il existe différentes façons d'évaluer la quantité d'acétate libérée. La réaction de déacétylation peut être suivie en utilisant la spectrophotométrie, méthode utilisée par Hekmat *et al.* dans leur étude en 2003. Il est aussi possible de quantifier l'acétate libérée en utilisant la méthode de HPLC, comme le témoigne l'étude de Dupont *et al.* en 1996. Une autre façon de doser l'acétate produite est permise par l'emploi de la radioactivité, tout comme l'ont fait Araki et Ito en 1975 dans leur étude. Et finalement, il est possible de doser indirectement l'acétate par dosage du NADH, méthode qui a été utilisée dans ce travail. Cette méthode permet de détecter et de quantifier l'acétate libérée par la réaction enzymatique. Elle est basée sur le principe impliquant trois réactions chimiques démontré par Bergmeyer et Möllering, en 1974 où interviennent trois enzymes; l'acétyl-CoA synthétase, la citrate synthase et la L-malate déhydrogénase (figure 13). Plus la quantité d'acétate est élevée, plus il y a d'acétyl-CoA produit, et plus il y a un besoin en oxaloacétate pour effectuer la deuxième réaction. Finalement, plus il y a production d'oxaloacétate, plus il y a de NADH produit. Le NADH est mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340nm. Une formule mathématique (se référer à la section 2.5.5.2) permet ensuite d'évaluer la concentration d'acétate libérée.

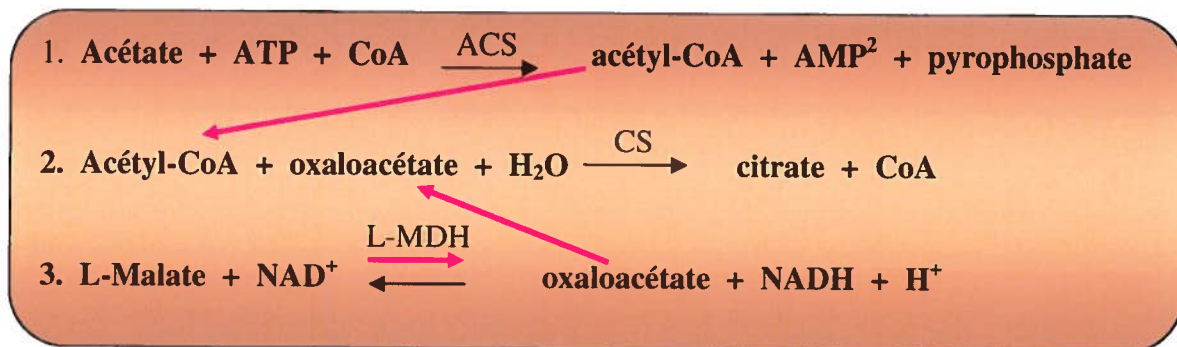


Figure 13 : Réactions chimiques impliquées dans le dosage de l'acide acétique, ainsi que les interactions entre chacune d'elles (en rouge).

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

2-méthoxy-éthanol (2-méthylcellosolve) (American Chemicals LTD)

Acétate de potassium (EM Science)

Acétate de sodium (Sigma)

Acétone (Aldrich)

Acétonitrile (EM Science)

Acide acétique glacial (EMD)

Acide borique (Biorad)

Acide chlorhydrique (EM Sciences)

Acide citrique (Sigma)

Acide éthylène diamine tétraacétique (J. T. Baker Chemical)

Acide trichloroacétique (EM Science)

Acide trifluoroacétique (EM Science)

Acrylamide et bis-acrylamide (GE Healthcare)

Adénosine triphosphate (GE Healthcare)

Agar (USB)

Agar Simmons Citrate (Difco)

Agarose (Roche)

Amorces (Sigma Genosys)

Ampicilline (Sigma)

Bacto tryptone (Difco)

Bicarbonate d'ammonium (MCB)

Bleu de Bromophénol (Biorad)

Bleu de Coomassie R-250 (Biorad)

Borax (tétraborate de disodium décahydraté) (Baker)

Butanol (Sigma)

Carboxyméthylcellulose (Sigma Chemical co.)

Casamino Acids (Difco)

Chloroforme (EM Science)

Chlorure de calcium dihydraté (EM Science)

Chlorure de cobalt hexahydraté (J. T. Baker Chemical)
Chlorure de cuivre dihydraté (Sigma)
Chlorure de fer tétrahydraté (Fisher Scientific Company)
Chlorure de magnésium hexahydraté (Sigma)
Chlorure de manganèse tétrahydraté (Fisher Scientific company)
Chlorure de potassium (Sigma)
Chlorure de sodium (BDH)
Chlorure de zinc (Sigma)
Citrates de sodium (Sigma)
Diméthyle sulfoxyde (Laboratoire MAT)
Dithiothréitol (GE Healthcare)
dNTP (GE Healthcare)
Dosage d'acide acétique, kit (Megazyme)
Échelle moléculaire 1Kb+ (Invitrogen)
Enzymes de restriction *Eco* RI, *Sac* I et *Sph* I (GE Healthcare)
Éthanol 95% (Alcools de commerces inc.)
Extrait de bœuf (Difco)
Extrait de levure (Multicell Wisent)
Ficoll 400 (GE Healthcare)
Flexiprep, kit (GE Healthcare)
Gamma-globuline (Fisher)
GFX, kit (GE Healthcare)
Glucose (J. T. Baker)
Glycérol (ICN Biomedicals)
Glycine (Pharmacia Biotech)
Hydroxyde de sodium (J. T. Baker Chemical)
Hydroxyquinoline (Sigma)
Imidazole (BDH)
Immunodétection ECL, kit (GE Healthcare)
Iodoacétamide (Sigma)
Isopropanol (J. T. Baker)

Isopropylthio- β -D-galactoside (Gibco BRL)
Ligase T4 (GE Health Care)
L-méthionine (Sigma)
L-proline (MP Biomedicals)
Lysozyme (Boehringer Mannheim GmbH)
Maltose (Difco)
Marqueur moléculaire RPN755 (GE Healthcare)
Marqueur moléculaire RPN800 (GE Healthcare)
Marqueur moléculaire Low range 161-0304 (Biorad)
Mercaptoéthanol (GE Healthcare)
Méthanol (Alcools de commerces inc.)
Molybdate d'ammonium tétrahydraté (Fisher Scientific company)
MOPS (Sigma)
NZ-amine A (Sigma)
Persulfate d'ammonium (Biorad)
Phénol (USB)
Phénylméthylsulfonylfluoride (BRL)
Phosphate de potassium dibasique (Fisher)
Phosphate de potassium monobasique (Sigma)
Phosphate de sodium dibasique (Anachemia Chemicals)
Phosphate de sodium monobasique (Fisher)
Polyéthylène glycol (Roche)
Polymérase *Pwo*, kit (Roche)
Polymérase *Taq*, kit (GE Healthcare)
Propionamide (Aldrich)
Réactif de Bradford (Biorad)
Remazol brilliant blue (Sigma)
RNase (GE Healthcare)
Saccharose (USB)
SDS (BioRad)
Spermidine (Sigma)

Sulfate d'ammonium (Fisher)
Sulfate de cuivre (Sigma)
Sulfate de fer heptahydraté (J. T. Baker Chemical)
Sulfate de magnésium heptahydraté (J. T. Baker Chemical)
Sulfate de manganèse monohydraté (J. T. Baker Chemical)
Sulfate de nickel (Sigma)
Sulfate de zinc heptahydraté (J. T. Baker Chemical)
Sulfate de potassium (J. T. Baker Chemical)
Tampon « one for all plus » (Pharmacia)
Tampon « one for all plus » (USB)
Tampon TES (Sigma)
TEMED (Biorad)
Thiamine (Sigma)
Thiostrepton (Sigma)
Tris (Roche)
Tris-base (Sigma)
Trypsine (Sigma)
Tryptic soy broth sans glucose (Difco)
Tween-20 (Biorad)
Tween-80 (Sigma)
Tyrosine (Gibco BRL)
X-gal (Gibco BRL)
Xylane oat spelts lot 77H0483 (Sigma)
Xylène cyanol (Sigma)
Xylose (Sigma)

2.2 SOUCHES BACTÉRIENNES

Tableau III : Souches bactériennes utilisées.

Souches	Description	Utilité
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 (John Innes Center)	Dérivé prototrophe de la souche A3 (2) sans les plasmides SCP1 et SCP2	Souche d'où proviennent les neuf gènes des déacétylases à l'étude
<i>Streptomyces lividans</i> 10-164 (Hurtubise <i>et al.</i> , 1995)	<i>msiK</i>	Système d'expression servant à exprimer les enzymes à l'étude
<i>Escherichia coli</i> DH11S (Lin <i>et al.</i> , 1992)	<i>mrcA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Delta(lac-proAB)$, $\Delta(rec1398)$, <i>deoR</i> , <i>rpsL</i> , <i>srl-thi-F'</i> <i>proAB</i> +, <i>lacI</i> ^q Z, $\Delta M 15$	Souche servant à recevoir les gènes à l'étude pour en faire plusieurs copies dans le but de les séquencer

2.3 VECTEURS

Tableau IV : Vecteurs utilisés.

Plasmides	Description
<i>Streptomyces</i> pIAFC109MCS F. Shareck (INRS-IAF)	Plasmide multi-copies contenant un site de clonage multiple et le gène de résistance au thiostrepton; sert à recevoir les gènes à l'étude pour les introduire ensuite chez <i>S. lividans</i> dans le but d'exprimer les déacétylases correspondant à chacun d'eux.
pIAF550MCSL F. Shareck (INRS-IAF)	Dérivé du plasmide pIAFC109MCS contenant un site de clonage multiple et le gène de résistance au thiostrepton; sert à recevoir les gènes à l'étude pour les introduire ensuite chez <i>S. lividans</i> dans le but d'exprimer les déacétylases correspondant à chacun d'eux.
<i>Escherichia coli</i> DH11S pTZ19R Gibco BRL	Dérivé d'un plasmide multi-copies de <i>Escherichia coli</i> , pUC19, contenant un site de clonage multiple, le gène de résistance à l'ampicilline et le promoteur T7 près du MCS; sert à recevoir les gènes à l'étude pour les introduire chez <i>E. coli</i> .

Plasmide pIAFC109MCS

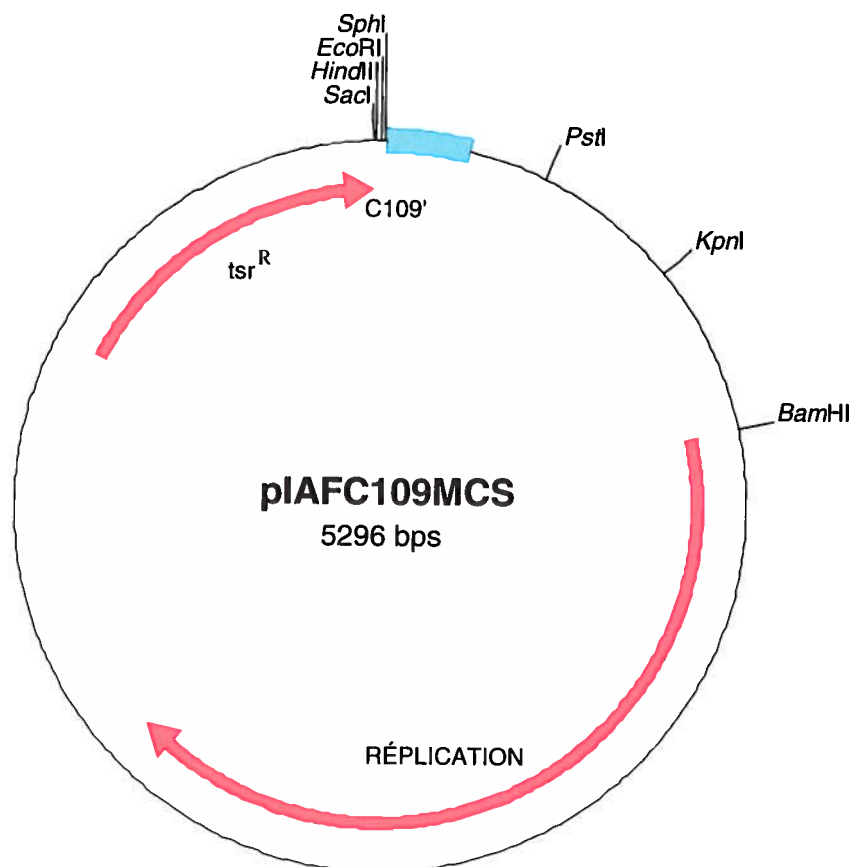


Figure 14 : Carte de restriction du plasmide pIAFC109MCS. *tsr^R*, résistance au thostrepton; C109, promoteur de la xylanase C de *Streptomyces lividans*.

Plasmide pIAF550MCSL

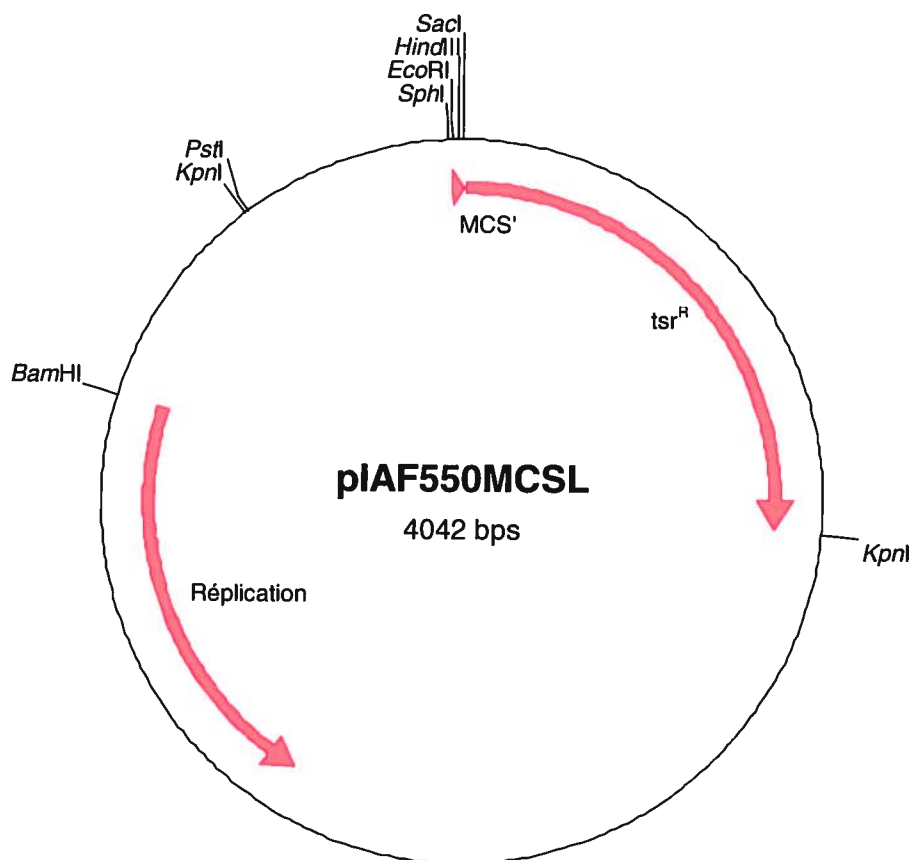


Figure 15: Carte de restriction du plasmide pIAF550MCSL. *tsr^R*, résistance au thiostrepton; C109, promoteur de la xylanase C de *Streptomyces lividans*; MCS, site de clonage multiple.

Plasmide pTZ19R

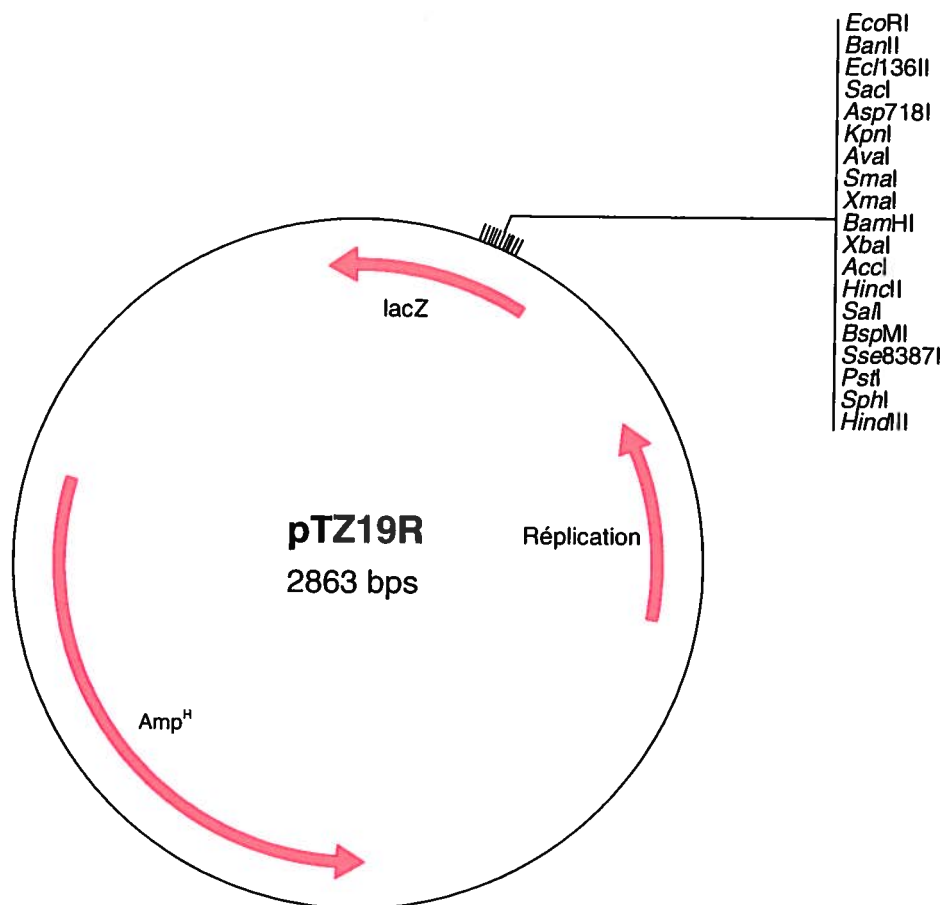


Figure 16 : Carte de restriction du plasmide pTZ19R. lacZ; Amp^R, résistance   l'ampicilline.

2.4 LISTE DES MILIEUX DE CULTURE

2.4.1 Milieux utilisés pour la croissance de *Streptomyces*

2.4.1.1 Méthode de sélection

Afin de sélectionner les clones de *Streptomyces lividans* possédant les plasmides pIAF550MCSL ou C109MCS contenant tous deux le gène de résistance au thiostrepton, cet antibiotique a été ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 5µg/mL dans un milieu liquide, et de 50µg/mL dans un milieu solide (cet antibiotique est dilué dans le DMSO à la concentration de 50mg/mL).

2.4.1.2 Milieu TSB

Ce milieu a été obtenu en mélangeant 27,5g de Tryptic soy broth sans glucose par litre d'eau distillée et en stérilisant le tout à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C.

2.4.1.3 Milieu Bennett

Dans un total d'un litre d'eau distillée, 1g d'extrait de levure, 1g d'extrait de bœuf, 2g de NZ-amine A, 10g de maltose et 22g d'agar ont été mélangés; le pH résultant étant de 7,3. Le milieu a été stérilisé pendant 20 minutes à 121°C. Ce milieu solide riche sert à la croissance et à la sporulation des streptomycètes.

2.4.1.4 Milieu R5 liquide

Dans un total d'un litre d'eau distillée; 103g de saccharose; 0,25g de K_2SO_4 ; 10,12g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 10g de glucose; 0,1g de Casamino Acids; 5g d'extrait de levure; 5,73g de tampon TES ainsi que 2mL de solution d'éléments traces ont été mélangés. Le milieu a été réparti en aliquots de 100mL et stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à $121^\circ C$. Ensuite ont été ajoutées stérilement, pour chaque aliquot, les solutions stériles suivantes : 1mL de KH_2PO_4 0,5%; 400 μ L $CaCl_2$ 5M; 1,5 mL de L-proline 20%; 1,4mL de NaOH 1N et 2,5mL de glycine 20%. Ce milieu sert à la préparation des protoplastes de streptomycètes.

Solution d'éléments traces : Dans un total d'un litre d'eau; 40mg de $ZnCl_2$; 200mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 10mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 10mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 10mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et 10mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ont été mélangés.

2.4.1.5 Milieu R5 solide

Ce milieu a été préparé en mélangeant 4800mL d'eau distillée; 515g de saccharose; 1,25g de K_2SO_4 ; 50,6g de $MgCl_2$; 50g de glucose; 0,5g de Casamino Acids; 10mL de solution d'éléments traces (voir plus haut); 25g d'extrait de levure; 28,65g de tampon TES et 110g d'agar. Le tout a été stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à $121^\circ C$. Ont été ajoutées stérilement les solutions stériles suivantes : 50mL de KH_2PO_4 0,5%; 20mL de $CaCl_2$ 5M; 5mL de $CuSO_4$ 5mg/mL; 75mL de L-proline 20%; 50mL de L-méthionine 1% et 2g de tyrosine dissous dans 25 mL de NaOH 1N. Le milieu a été réparti en boîtes de Pétri à raison de 25mL chacune et puis séché à la température de la pièce jusqu'à la perte de 15% de son poids. Ce milieu sert à la régénération des protoplastes lors de transformations de *Streptomyces*.

2.4.1.6 Milieu Stewart

Ce milieu a été obtenu en mélangeant 750mL d'eau distillée; 2g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5g de KH_2PO_4 ; 5g de K_2HPO_4 ; 0,5g d'extrait de levure; 0,5g de KCl; 1mL de sels de Mandel; 17g d'agar; et le pH a été ajusté à 7,2.

Sels de Mandel : Pour un total de 100mL d'eau distillée; 140mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 160mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 500mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 200mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ont été mélangés.

2.4.1.7 Milieu minimal M14

Ce milieu minimal servant à faire produire les enzymes par la bactérie et à les récupérer, a été obtenu en mélangeant 1,4g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5g de K_2HPO_4 ; 1g de KH_2PO_4 ; 2mL de Tween 80 et 1mL de sels de Mandel dans un volume total d'un litre d'eau; le pH résultant est 7,4. Le milieu a été autoclavé pendant 20 minutes à 121°C. Juste avant d'ensemencer, le milieu a été supplémenté du substrat* (source de carbone) pour une concentration finale de 1%, de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5% pour une concentration finale de 0,03%, et de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3% pour une concentration finale de 0,03%.

*Les substrats solides comme le xylane et la cellulose sont ajoutés avant stérilisation.

2.4.2 Milieux utilisés pour la croissance d'*Escherichia coli*

2.4.2.1 Méthode de sélection

Afin de sélectionner les transformants *Escherichia coli* DH11S possédant le plasmide pTZ19R, de l'ampicilline a été ajoutée pour une concentration finale de 100µg/mL dans le milieu tant liquide que solide étant donné que le gène de résistance à cet antibiotique est présent sur ce plasmide.

2.4.2.2 Milieu Simmons citrate

Ce milieu a été préparé en dissolvant par chauffage 24,2g d'agar Simmons citrate dans un litre d'eau distillée. Le tout a été stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C. Le milieu a été refroidi jusqu'à une température de 55°C. À cette température, du glucose pour une concentration finale de 0,4% et de la thiamine stérile pour une concentration finale de 0,01% ont été ajoutés au milieu. Ce dernier a été réparti dans des boîtes de Pétri à raison de 25mL chacun. Ce milieu a été utilisé pour la croissance et la conservation de la bactérie *Escherichia coli* DH11S.

2.4.2.3 Milieu 2XTY

Pour un litre de milieu, 16g de Bacto tryptone; 10g d'extrait de levure et 5g de NaCl ont été mélangés et complétés avec de l'eau distillée. Pour un milieu solide, 15g d'agar sont ajoutés par litre de milieu. Le milieu a été autoclavé pendant 20 minutes à 121°C et conservé à 4°C.

Avant d'ensemencer le milieu solide, un mélange de 50µL de X-gal (20mg/mL), 10µL d'IPTG (100µM) et de 100µL d'eau est ajouté à chaque gélose et réparti à l'aide de billes de verre. Ce milieu sert à mettre en évidence les clones de la bactérie *E. coli* ayant reçu les gènes à l'étude dans le but d'en obtenir une grande quantité pour effectuer leur séquençage.

2.5 LISTE DES PROTOCOLES

2.5.1 Méthodes utilisées pour le clonage des gènes

2.5.1.1 Extraction d'ADN chromosomique

L'extraction d'ADN chromosomique a été réalisée en recueillant, dans un microtube de 1,5mL, 50mg de mycélium provenant d'une culture de 48h en milieu TSB. Le mycélium a été resuspendu et incubé pendant 30 minutes à 37°C dans 500µL de solution 1*. Deux cent cinquante µL de SDS 2% ont été ajoutés au liquide et le tout a été agité au vortex pendant une minute. Cinq cents µL de phénol/chloroforme, en proportion de 1 : 1, ont été ajoutés au tube. Ce dernier a été agité durant 30 secondes sur agitateur et centrifugé deux minutes à 13000RPM à l'aide d'une centrifugeuse Baxter Canlab, Biofuge 13, de Heraeus Instruments. La phase aqueuse a été récupérée et les étapes d'ajout de phénol/chloroforme, d'agitation et de centrifugation ont été répétées trois fois. L'ADN a été précipité par l'ajout de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et d'un volume d'isopropanol, et le tout a été incubé à la température de la pièce durant cinq minutes. Le tube a été centrifugé pendant cinq minutes à 13000RPM et le surnageant a été retiré. Le culot a été resuspendu dans 500µL de tampon TE contenant 25µL de spermidine 100mM. Le tube a été agité au vortex durant cinq secondes et incubé pendant cinq minutes à la température de la pièce. Après une centrifugation de deux minutes, le surnageant a été retiré et le culot a été resuspendu dans 300µL d'acétate de sodium 0,3M contenant 10mM de MgCl₂ et 700µL d'éthanol 95% ont été ajoutés. Le tube a été agité au vortex et incubé pendant une heure à la température de la pièce. Celui-ci a été centrifugé pendant deux minutes à 13000RPM, et le surnageant a été enlevé. Le culot a été dissous dans 50 à 70µL de tampon TE pH 8.0. Le tube a été agité pendant 30 minutes sur un petit agitateur puis conservé à -20°C.

***Solution 1 :** saccharose 0,3M, Tris pH 8 25mM, EDTA 25mM, lysozyme 2mg/mL et RNase 50µg/mL.

2.5.1.2 PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)

Ont été mélangés 10µL de tampon à polymérase *Pwo* (sans MgSO₄), 4µL de MgSO₄ 25mM, 8µL de dNTP 10mM, 8µL de propionamide 50%, 10µL de Tween 20 0,5%, 10µL de chacune des amorces 10pmol/µL (tableau VI), 1µL d'ADN chromosomique de *Streptomyces coelicolor* M145 (100ng/µL), 38µL d'eau distillée stérile et 1µL de polymérase *Pwo* (5U/µL). Le liquide a été distribué dans dix tubes à PCR de 200µL à raison de 10µL par tube. La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur Biometra T Gradient en utilisant le programme suivant :

Programme :	94°C	2min	} 30 cycles	*Gradient 45-65°C (tableau V)
	94°C	45s		
	* °C	45s		
	72°C	1min		
	72°C	5min		
	4°C	Pause		

Tableau V : Température d'hybridation des amorces selon les puits du thermocycleur (les puits 1 et 12 ne sont pas utilisés).

Puits	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Température (°C)	45,5	46,9	49,0	51,4	53,8	56,2	58,6	60,9	63,1	64,5

2.5.1.3 PCR sur colonie

Pour la vérification des clones, une réaction de PCR a été réalisée en mélangeant 5µL de tampon à polymérase *Taq* (sans MgCl₂), 3µL de MgCl₂ 25mM, 4µL de dNTP 10mM, 5µL de chaque amorce 10pmol/µL (tableau VI), 22,5µL d'eau, 0,5µL de polymérase *Taq* (5U/µL) et une petite partie de la colonie (en la piquant avec un cure-dents et le trempant dans le mélange quelques secondes). La réaction de PCR a été réalisée tel que décrit plus haut en utilisant une température d'hybridation des amorces de 50°C (sans gradient).

Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour l'amplification de chacun des gènes.

Gènes	Amorce en 5'	Amorce en 3'	Enzymes de restriction	
			5'	3'
M10	AAAGCATGCGCAGCGAGCCGAT CCTGCGCA	AAAGAGCTCTCAGATCAGGCGC CGCCGGGGGA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
M10HT	AAAGCATGCATCACCATCACCA TCACATCGAGGGGCGGATGCGC AGCGAGCCGATCCTGCGCA	AAAGAGCTCTCAGATCAGGCGC CGCCGGGGGA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
M10Eco	AAAGAATTCGTGCGCAGCGAGC CGATCCTGCGCA	AAAGAGCTCTCAGATCAGGCGC CGCCGGGGGA	<i>Eco</i> RI	<i>Sac</i> I
H35	AAAGAATTCAGGAGAACGCGTG GTCCCCGACGCGACGGGGA	AAAGAGCTCTCAGCGCACCGGG AACCCGAA	<i>Eco</i> RI	<i>Sac</i> I
E59	AAAGCATGCCCTCCAGCACCCG CCGTCA	AAAGAGCTCTCACGGGCTCATG GCGCCGGGCGCGT	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
E59Eco	AAAGAATTCGAGATCCTCGCCG ACCACCGCGT	AAAGAGCTCTCACGGGCTCATG GCGCCGGGCGCGT	<i>Eco</i> RI	<i>Sac</i> I
D16A	AAAGCATGCGCACGCCACCTC ACCCCCA	AAAGAGCTCTCACGACTGCTGT GGCTGATGTGA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
2G38	AAAGCATGCGCAGACCGGAGGC ACCACGGA	AAAGAGCTCCTATCCCGGCGCC GGTGACCGA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
6G4.37	AAAGAATTCAGGAGAACGCGTG TCCCGGGCCTCTCGT	AAAGAGCTCTCACAGGTAGTCC TCCAGGCGGGCCA	<i>Eco</i> RI	<i>Sac</i> I
6G4.38	AAAGCATGCGCCGAGGGCGGTC CCGTCCGGCC	AAAGAGCTCCTAGAGGTAGTTC TCCAA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
C61A	AAAGCATGCGCCACTCCGTCGG CGACCGCTCGGACGACC	AAAGAGCTCTCACACCCCCGCC GCGGCCCGGCGGCGCAGG	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
D95A	AAAGCATGCGCCCAAGCAAGGT TCTCGCCGGT	AAAGAGCTCTCAGCCCAGGTGG GGATCGACCA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
D95AHis	AAAGCATGCATCACCATCACCA TCACATCGAGGGGCGGATGCGC CCAAGCAAGGTTCTCGCCGGT	AAAGAGCTCTCAGCCCAGGTGG GGATCGACCA	<i>Sph</i> I	<i>Sac</i> I
*550+/-40	CCCCGCCGTGGTTCGGGCAA	CCGCTCTTCCCCGTCCGGGA	-	-

*Ces amorces sont spécifiques à des régions se trouvant de part et d'autre du site de clonage multiple des plasmides pIAFC109MCS et pIAF550MCSL, ce qui permet d'amplifier cette zone et de confirmer la présence des gènes à l'étude.

2.5.1.4 Migration d'ADN en gel d'agarose

La migration de l'ADN a été effectuée dans un gel d'agarose 0,7% à un voltage de 30V. Cinq μL de tampon d'échantillon ont été ajoutés à l'ADN pour charger ce dernier. Les migrations ont été effectuées pendant 16 heures pour une meilleure séparation. Dix μL (1 μg) de 1Kb+ a été utilisé comme échelle moléculaire.

TBE 10X : 108g de Tris, 55g d'acide borique et 40mL d'EDTA 0,5M pH 8,0 ont été mélangés et complétés avec de l'eau pour un volume final de 1L. Une dilution 1 : 10 a été réalisée pour obtenir le TBE 1X.

Tampon d'échantillon : 15% (p/v) de Ficoll 400, 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol et 0,25% de xylène cyanol ont été mélangés dans de l'eau.

Échelle moléculaire 1Kb+ : 10 μL de 1Kb+, 10 μL de TBE 10X, 16,7 μL de tampon d'échantillon et 63,3 μL d'eau ont été mélangés ensemble (concentration finale 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

2.5.1.5 Purification d'ADN provenant d'un gel d'agarose

La purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose a été effectuée avec la trousse GFX de GE Healthcare (27-9602-01). La bande d'intérêt a été découpée et mise dans un tube de 1,5mL. À celui-ci ont été ajoutés 10 μL de « Capture buffer » pour chaque 10 mg d'agarose pour un maximum de 300 μL par tube. Le tout a été agité vigoureusement au vortex et incubé pendant 5 à 15 minutes à 60°C. Après l'incubation, le tube a été centrifugé brièvement. Le liquide a été transféré dans une colonne GFX dans un tube collecteur et le tout a été incubé durant une minute à la température de la pièce. Ensuite, le tube a été centrifugé pendant 30 secondes à 13000RPM et le contenu du tube jeté. Cinq cents μL de tampon de lavage ont ensuite été ajoutés à la colonne. Une

centrifugation de 30 secondes à 13000RPM a suivi et le tube collecteur et son contenu ont été jetés. La colonne a été placée dans un tube de 1,5mL stérile et 50µl de tampon d'éluion TE à pH 8,0 y ont été ajoutés, juste au-dessus de la membrane de la colonne. Le tout a été incubé durant une minute à la température de la pièce et centrifugé pendant une minute à 13000RPM. L'ADN recueilli a été conservé à -20 °C.

2.5.1.6 Digestion d'ADN

Afin de digérer les gènes et plasmides utilisés, les produits suivants ont été mélangés : le tampon « One for all plus 10X » de GE Healthcare (2 µl), l'ADN à digérer (10 à 17µl), le ou les enzymes de restriction (0,5µl ch.) et de l'eau distillée stérile pour un volume final de 20µl. Le tout a été incubé à 37°C pendant 1h30. Les enzymes ont été inactivées pendant 20 minutes à 65°C. Dans le cas où l'ADN à digérer provient directement de culture, 1µl de RNase 1mg/mL a été ajouté et le tout a été incubé à 37°C pendant 15 minutes avant l'inactivation.

2.5.1.7 Ligation d'ADN

Afin de liguer l'insert au plasmide, les produits suivants ont été mélangés : le tampon « One for all »10X de USB (2µl), l'ADN* à liguer, le vecteur*, l'ATP 10mM (2µl) et la ligase T4 3,7U/µL (1µl). Le tout a été incubé à la température de la pièce jusqu'au lendemain (ou pour un minimum de 4 heures).

*Les quantités d'ADN à liguer et du vecteur peuvent varier selon la quantité de matériel disponible (intensité des bandes obtenues sur gel lors d'un PCR suivi d'une purification, par exemple). Dans le cas où l'on fait varier les quantités, le volume final doit toujours être de 20µl; sinon, on doit compléter avec de l'eau distillée pour obtenir ce volume.

2.5.1.8 Préparation de protoplastes de *Streptomyces lividans* 10-164

À partir du mycélium provenant de 3-5mL d'une préculture de la souche incubée durant 24h en milieu TSB, une culture de 100mL de milieu R5 liquide supplémenté de glycine (0,5%) a été réalisée. Après 24h d'incubation à une température de 34°C et avec rotation de 240RPM, la culture a été centrifugée à 9000RPM dans une centrifugeuse Beckman avec un rotor JA-10 pour une durée de 15 minutes et le surnageant a été jeté. Le culot a été resuspendu dans 30mL de saccharose 10,3%, et centrifugé dans une centrifugeuse Beckman à 10 000RPM avec un rotor JA-20 pour une durée de 10 minutes. Le surnageant a été jeté et l'étape de lavage a été refaite de nouveau. Ensuite, le culot obtenu a été resuspendu doucement avec une pipette dans 30mL de la solution de lysozyme (1mg/mL en tampon P). Le tout a été incubé à une température de 34°C. À la 15^e et 30^e minute, le liquide a été rebrassé doucement à la pipette. Lorsqu'une proportion de 95% de protoplastes a été observée par microscopie, 15mL de tampon P ont été ajoutés au liquide et le tout a été incubé durant 20 minutes. Le liquide a ensuite été filtré sur de la laine de verre dans des tubes stériles de 50mL. Ces derniers ont été centrifugés à 5000RPM avec un rotor JA-20 pour une durée de sept minutes et le surnageant a été jeté. Le culot a été resuspendu dans son volume de liquide résiduel et 40mL de tampon P ont été ajoutés au tube. Le tout a été centrifugé tel que précédemment et ce lavage a été effectué deux fois. Le culot a ensuite été resuspendu dans 5 à 10mL de tampon P et la D.O.₆₀₀ a été prise. La concentration de protoplastes doit être de $1-2,5 \times 10^{10}$ cellules par mL de liquide (se référer à l'annexe 10). Le liquide a été réparti dans des tubes stériles de 1,5mL, à raison de 120 μ L par tube. Ces derniers baignaient dans un bac rempli de méthanol et de glace sèche permettant ainsi de refroidir le liquide rapidement. Les tubes ont ensuite été congelés à une température de -80°C.

Tampon P : 103g de saccharose, 0,25g de K₂SO₄, 2mL de solution d'éléments traces et 2,02g de MgCl₂·6 H₂O ont été mélangés et complétés avec de l'eau distillée pour un volume final de 800mL. Le tout a été stérilisé à l'autoclave.

2.5.1.9 Transformation de protoplastes de streptomycètes

Afin d'effectuer la transformation de cellules de streptomycètes, 10 à 20µL du produit de ligation, 50µl de protoplastes ($> 10^9$ cellules par mL) de la souche à transformer et 200µl de PEG 25% ont été mélangés et incubés à la température de la pièce pendant une minute et 30 secondes. Ensuite, 10, 25 et 100µL du mélange ont été ensemencés sur des boîtes de Pétri R5 à l'aide de billes de verre. Le tout a été incubé à une température de 34°C. Environ 16 à 20 heures plus tard, 10µL de thiostrepton (50mg/mL) dans un volume d'eau distillée stérile de 1,5mL ont été ajoutés dans chaque boîte de Pétri et le liquide a été répandu par rotation. Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante, elles ont été incubées à 34°C.

2.5.2 Méthodes utilisées pour la confirmation du clonage

2.5.2.1 Isolement de plasmides chez les streptomycètes

Un culot de 100mg d'une culture de 24h en milieu TSB (environ 500mL de culture) a été obtenu par centrifugation. Il a été resuspendu dans 500 μ L de solution 1*, agité au vortex et centrifugé pendant 30 secondes à 13000RPM. Le surnageant obtenu a été jeté et le culot resuspendu dans 400 μ L de solution 1 contenant du lysozyme à une concentration de 2mg par mL de solution 1. Le tout a été incubé pendant 30 minutes à 37°C. Deux cent cinquante μ L de solution 2 ont été ajoutés au tube et ce dernier a été agité au vortex immédiatement pendant 10 secondes. Le tube a été incubé à 70°C pendant 15 minutes, puis refroidi à la température de la pièce.

Cent μ L de solution 3 ont été ajoutés au tube qui a été agité immédiatement au vortex durant 10 secondes. Il a été centrifugé pendant trois minutes à 13000RPM. Sept cents μ L de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube; 70 μ L d'acétate de sodium 3M et 700 μ L d'isopropanol y ont été ajoutés. Le liquide a été mélangé par inversion et incubé pendant cinq minutes à la température de la pièce. Le tube a été centrifugé durant trois minutes. Le surnageant a été retiré et le culot séché à l'air libre durant cinq minutes.

Ensuite, 50 μ L de TE à pH 8,0 et 5 μ L d'acétate de sodium 3M ont été ajoutés au tube qui a été agité doucement durant une minute. Vingt-cinq μ L de phénol neutre ont été ajoutés au mélange et le tube a été agité au vortex durant cinq secondes immédiatement. Celui-ci a été centrifugé durant trois minutes. Cinquante μ L de la phase supérieure ont été transférés dans un nouveau tube et 50 μ L d'isopropanol y ont été ajoutés. Après avoir mélangé le liquide en inversant le tube, ce dernier a été incubé durant cinq minutes à la température de la pièce et centrifugé durant cinq minutes. Le surnageant a été retiré. Le culot a été séché durant cinq minutes à l'air libre. Cinquante μ L d'eau ont été ajoutés au culot et le tout a été agité doucement durant une minute et conservé à -20°C.

***Solution 1 :** 10,3g de saccharose, 2,5mL de Tris 1M et 5mL d'EDTA 0,5M pH 8,0, complétés avec de l'eau distillée pour un total de 100mL.

Solution 2 : 3,85mL d'eau, 0,15mL de NaOH 10N et 1mL de SDS 10%, frais.

Solution 3 : 5g de phénol, 5mL de chloroforme, 1mL d'eau et 5mg d'hydroxyquinoline.

2.5.2.2 Préparation de cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH11S

À partir d'une colonie isolée d'*E. coli* DH11S sur milieu Simmons citrate, une culture de 4 mL en 2XTY liquide a été préparée et incubée à 37°C, avec une agitation de 240RPM. Le lendemain matin, une seconde culture de 250mL en 2XTY a été faite à partir de 1% (2,5mL) de culture de la veille et incubée à 37°C, avec une agitation de 240RPM jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₀₀ de 0,4. La culture a ensuite été transférée dans des tubes à centrifuger de 250mL froids et le tout a été laissé sur glace pendant 15 minutes. Les bactéries ont été centrifugées pendant 15 minutes à 2500RPM avec un rotor JA10 dans une centrifugeuse Beckman à une température de 4°C. Après centrifugation, le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu doucement dans 80mL de tampon CB I*. Le tout a été laissé sur glace pendant une heure. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 3000RPM à une température de 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu dans 10mL de tampon CB II*. Le tout a été laissé sur glace pendant 15 min. Deux cent vingt µL de cellules compétentes ont été répartis par tube de 1,5mL stériles et le tout a été congelé rapidement dans du méthanol contenant de la glace sèche. Les cellules compétentes ont été conservées à une température de -80°C.

***CB I** : 100 mL d'H₂O, 20mL de KCl 1M, 12 mL de CaCl₂ 1M, 1,2mL d'acétate de potassium 5M et 30mL de glycérol ultra pur ont été mélangés. Le pH a été ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2M (50µL d'ac. acétique additionné de 4,3mL d'H₂O) et le mélange a été complété avec de l'eau distillée pour un volume de 200mL.

CB II : 100 mL d'H₂O, 2 mL de KCl 1M, 15 mL de CaCl₂ 1M, 4 mL de MOPS 0,5M et 30 mL de glycérol ultra pur ont été mélangés. Le pH a été ajusté 6,8 avec du NaOH 0,5M et de l'eau distillée a été ajoutée pour un volume de 200mL au total.

2.5.2.3 Transformation d'*Escherichia coli* par choc thermique

Cent μL de cellules compétentes de *E. coli* DH11S décongelées sur glace et 20 μL de produit de ligation ont été mélangés dans un tube stérile de 1,5mL. Le tout a été agité doucement et laissé sur glace pendant 30 minutes. Le tube a été transféré délicatement dans un bain-marie d'une température de 42°C pour une durée de deux minutes. Le tube a été remis sur glace pour deux minutes. Quatre cents μL de milieu 2XTY ont été ajoutés au tube et le tout a été incubé à une température de 37°C avec une agitation de 240RPM pendant 45 minutes. Juste avant d'ensemencer, quelques billes de verre stériles ont été déposées dans les boîtes de Pétri contenant du milieu 2XTY avec ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cinquante μL , 200 μL et le reste du liquide ont été ensemencés sur celles-ci et étalés à l'aide de billes de verres. Ces dernières ont été retirées et les boîtes de Pétri ont été incubées à une température de 37°C jusqu'au lendemain puis conservées à 4°C.

2.5.2.4 Isolement de plasmides chez *Escherichia coli* (Méthode FlexiPrep™)

Une colonie a été repiquée avec un cure-dents stérile et celui-ci a été déposé dans un tube de verre stérile de 15mL contenant 1,5mL de milieu 2XTY liquide (ampicilline 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le tout a été incubé à 37°C avec une agitation de 240RPM jusqu'au lendemain. Ensuite, le protocole d'isolement de plasmide Miniprep (procédure A) du kit FlexiPrep™ de GE Healthcare a été réalisé.

Lyse cellulaire : 1,5mL de culture 24h d'*E. coli* a été transféré dans un tube stérile de 1,5mL et centrifugée pendant 30 secondes à 13000 RPM. Le surnageant a été enlevé par aspiration. Le culot a été resuspendu dans 200 μl de Solution I (voir p. 56) en agitant au vortex vigoureusement. Deux cents μl de Solution II (p. 56) ont été ajoutés et le tout a été mélangé par inversion. Ensuite, 200 μl de Solution III (p. 56) ont été ajoutés et un mélange en inversant le tube a suivi. Ce dernier a été centrifugé pendant cinq minutes à 13000RPM et le surnageant a été transféré dans un autre tube stérile de 1,5mL. Quatre cent vingt μl d'isopropanol à la température de la pièce ont été ajoutés à ce surnageant.

Le tout a été agité au vortex et incubé pendant 10 minutes à la température de la pièce. Une centrifugation de 10 minutes à 13000RPM a été effectuée pour récupérer le culot. Le surnageant a été enlevé par aspiration et le culot asséché par inversion.

Purification de l'ADN : Le Sephaglas™ FP a été resuspendu en brassant la bouteille et 150µl de cette suspension ont été ajoutés au culot. Le tout a été agité doucement durant une minute pour dissoudre le culot puis centrifugé pendant 15 secondes à 13000RPM. Le surnageant a été enlevé par aspiration sans perturber le culot de Sephaglas™ FP. Le culot a été lavé en ajoutant 200µl de tampon de lavage et en agitant doucement au vortex pour le resuspendre. Le tout a été centrifugé pour une durée de 15 secondes à 13000 RPM et le surnageant a été enlevé. Trois cents µl d'éthanol 70% ont été ajoutés au tube et le culot a été resuspendu en agitant doucement au vortex. Le tube a été centrifugé pendant 15 secondes à 13000 RPM et le surnageant a été enlevé. Le culot a été dispersé dans le fond du tube et asséché durant 10 minutes à l'air libre. Cinquante µl de tampon TE (pH 8.0) ont été ajoutés au tube et le tout a été incubé durant cinq minutes en agitant régulièrement pour maintenir le Sephaglas™ FP en suspension. Le tube a été centrifugé durant une minute à 13000RPM et le surnageant a été transféré dans un autre tube en s'assurant qu'il n'y ait pas de Sephaglas™ FP dans le liquide, puis conservé à -20°C.

Solution I : Tris-HCl 100mM pH 7.5, EDTA 10mM, RNase I 400µg/mL.

Solution II : NaOH 1M, SDS 5.3% (p/v), le tout additionné de 130mL d'eau

Solution III : Potassium 3M, acétate 5M

Sephaglas : Sephaglas™ FP en suspension dans le tampon HCl (Guanidine-HCl 7M, Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 10mM)

Tampon de lavage : Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 20mM, NaCl 200mM, additionnés de 96mL d'éthanol 100%

2.5.2.5 Lyophilisation de souches de streptomycètes

Les spores de sept boîtes de Pétri de sept jours de la souche à lyophiliser ont été recueillies dans 6mL de lait écrémé 10% stérile à l'aide d'une pipette stérile. Cinq cents μ L de liquide ont été distribués par ampoule de verre stérile de 1mL et le tout a été congelé en trempant ces dernières dans du méthanol et de la glace sèche. Rapidement, les ampoules ont été branchées sur un lyophilisateur préalablement démarré et ayant atteint le vide. Le condensateur de ce dernier doit contenir du 2-méthoxy-éthanol(2-méthylcellosolve) et de la glace sèche. Le tout a été lyophilisé durant 24h et les ampoules scellées au chalumeau.

2.5.3 Méthodes utilisées pour exprimer et identifier les protéines

2.5.3.1 Préparation de cultures liquides de streptomycètes

Des précultures en milieu TSB (10mL) ont d'abord été préparées à partir des spores provenant d'une boîte de Pétri contenant du milieu Bennett qui ont été grattées à l'aide d'une pipette de 10mL stérile et recueillies dans du TSB. Le tout a été versé dans des Erlenmeyers de 50mL et le volume final a été ajusté à 10mL avec du TSB. Dix μ L de thiostrepton 5mg/mL ont été ajoutés au milieu et le tout a été incubé pendant 24h à une température de 34°C et à une rotation de 240RPM. À partir de ces précultures, le mycélium provenant de 8% (2mL) de la pré-culture a étéensemencé dans 25mL de milieu M14. Les cultures ont été incubées à une température de 34°C à une rotation de 240RPM pendant généralement 48h pour la production d'enzymes intracellulaires et 72h pour celle d'enzymes extracellulaires.

Lors de l'ensemencement d'une culture avec du mycélium, la procédure suivante est utilisée : la quantité désirée de préculture est centrifugée durant 5 minutes dans des tubes de plastique de 15mL à l'aide d'une centrifugeuse de table IEC, Model CL Clinical, à 7100 RPM (5125g). Le surnageant est jeté et le mycélium resuspendu dans 5mL de milieu frais dans lequel il seraitensemencé (lavage). Une centrifugation de 5 minutes suit, le surnageant est jeté et le mycélium resuspendu dans le milieu à ensemenecer.

2.5.3.2 Sonification de cellules de streptomycètes

Le mycélium d'une culture a été recueilli par centrifugation ou par filtration. Une quantité de tampon nécessaire pour resuspendre et laver le mycélium (tampon sodium/phosphate 0.02M, ou tampon potassium/phosphate 0,02M, NaCl 0,5M et imidazole 0,05M, pH 7,4) a été ajoutée au mycélium; généralement environ 1mL de tampon par gramme de mycélium recueilli. Le tout a été centrifugé pendant 5 à 10 minutes à 13000RPM et le surnageant a été jeté. Le mycélium a été resuspendu dans le même tampon supplémenté de PMSF pour une concentration finale de 0,1mM, de

manière à obtenir un mélange passablement liquide; généralement environ 4mL par gramme de mycélium. Le tout a été sonifié sur glace à raison d'intervalles d'une minute suivis d'un repos de 45 secondes jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mycélium (vérification par microscopie). Le liquide a ensuite été centrifugé durant 10 minutes à 13000RPM à 4°C; le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et conservé à -20°C.

2.5.3.3 Lyse des cellules à la presse de French

Le mycélium a été préparé de la même façon que pour la sonification. Le piston a été réfrigéré à 4°C durant 16 heures. Les joints d'étanchéité du piston ont été huilés et le montage a été réalisé. L'air a été purgé des tubes, la chambre a été lavée avec de l'eau distillée et rincée avec du tampon avant le passage de l'échantillon. Ce dernier a été passé dans la chambre à une pression de 12000psi et le liquide contenant les cellules brisées et leur contenu a été récupéré. Le liquide a été repassé deux fois pour s'assurer que toutes les cellules aient été brisées. La procédure a été réalisée en gardant l'échantillon sur glace le plus possible, entre les passages. Une vérification par microscopie a été faite pour s'assurer qu'il ne reste plus de mycélium. Le liquide a ensuite été centrifugé durant 25 minutes à une vitesse de 15000RPM à 4°C en utilisant une centrifugeuse Beckman et un rotor JA-20. Le surnageant a été recueilli et conservé à -20°C.

2.5.3.4 Précipitation de protéines à l'acétone

Cinq cents µl de surnageant de culture ont été prélevés et mis dans un tube de plastique stérile de 1,5mL. Un millilitre d'acétone a été ajouté et le tout a été agité au vortex. La précipitation a été faite pendant 1h sur glace. Le tout a été centrifugé pendant 5-10 minutes à 13000RPM. Le surnageant a été retiré par aspiration. Une centrifugation supplémentaire a été effectuée pendant 10 secondes pour enlever le reste du surnageant. Le culot a été séché pendant 5 minutes, resuspendu dans de l'eau distillée ou du tampon de chargement à migration SDS-PAGE et conservé à une température de -20°C.

2.5.3.5 Migration de protéines en gel SDS-PAGE

Les protéines ont été visualisées par coloration après migration dans un gel de polyacrylamide. La trousse de Biorad Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell a été utilisée pour la migration des protéines. La préparation du mélange pour le gel de séparation a été réalisée pour un gel de 12% d'acrylamide et 15% pour les protéines de faible poids moléculaire (20kDa et moins). 3,7mL du mélange ont été coulés entre les vitres pour constituer le gel. Du butanol saturé d'eau a été ajouté par-dessus et la polymérisation a été effectuée durant 45 minutes. Le butanol a été retiré, le montage rincé à l'eau et le gel de concentration a été préparé. Le mélange a été coulé par-dessus le gel de séparation et un peigne a été ajouté pour former dix puits. La polymérisation a été réalisée durant 30 minutes. Deux blocs de ce genre ont ensuite été ajustés à une électrode et déposés dans une chambre à électrophorèse. Trente µl d'un mélange de protéines dénaturées ont été déposés dans chaque puits ainsi qu'un échantillon de protéines standards de différents poids moléculaires. Les protéines ont migré durant 45 minutes sous un voltage de 200V. Après la migration, les gels ont été colorés au Bleu de Coomassie durant 20 minutes et décolorés par des lavages.

Gel de séparation : 100µL de SDS 10%, 4 mL d'acrylamide 30%, 2,5mL de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 3,35mL d'eau, 50 µL d'ammonium persulfate 10% et 5 µL de TEMED ont été mélangés.

Gel de concentration : 50 µL de SDS 10%, 0,665mL d'acrylamide 30%, 1,25mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 3,05mL d'eau, 25 µL d'APS 10% et 5 µL de TEMED ont été mélangés.

Tampon d'échantillon : 2,0mL de Tris-HCl 1M pH6,8, 3,2mL de glycérol, 1,6mL de β-mercaptoéthanol, 0,64g de SDS, 2 grains de bleu de bromophénol et 1,2mL d'eau ont été mélangés.

Dénaturation des protéines : Environ 25 μ g de protéines dans 22,5 μ L de liquide ont été mélangés à 7,5 μ L de tampon d'échantillon et le tout a été bouilli durant 10 minutes.

Tampon d'électrophorèse 5X : 15g de Tris, 72g de glycine et 5g de SDS dans un total d'un litre d'eau.

Coloration au Bleu de Coomassie : 1,25g de Bleu de Coomassie R-250, 227mL de méthanol, 227mL d'eau et 46mL d'acide acétique.

Décolorant : 100mL d'acide acétique, 400mL de méthanol et 500mL d'eau.

2.5.3.6 Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose (Western Blot)

Après la migration des protéines en gel SDS-PAGE, le gel de concentration a été retiré. Une membrane de nitrocellulose Hybond ECL de la même grandeur que le gel a ensuite été découpée. Le gel a été équilibré dans le tampon de transfert pendant 10 à 20 minutes. La membrane a été humidifiée à l'eau distillée par capillarité et trempée dans le tampon de transfert pendant 10 minutes. Deux papiers buvards de la même grandeur que la membrane ont été découpés, humidifiés avec du tampon de transfert et égouttés. Le montage commençant par un papier, suivi de la membrane, du gel puis d'un autre papier a été réalisé. Le transfert a été fait pendant 15 minutes à 20V dans l'appareil de transfert Trans-Blot[®] SD Semi-dry Transfer Cell de Biorad. La membrane a été séchée sur un papier absorbant, protéines vers le haut, durant une heure. L'immunodétection a été effectuée ou la membrane a été conservée entre deux papiers absorbants protégés par une pellicule de plastique à 4°C.

Tampon de transfert : glycine 39mM, Tris-Base 48mM et SDS 0,0037%.

2.5.3.7 Immunodétection ECL

La membrane a été réhydratée dans du PBS 1X* et incubée dans une solution de blocage (lait écrémé 3%) à la température de la pièce avec agitation pendant une heure. Elle a ensuite été rincée au PBS-T 1X*; deux fois avec 50mL, puis pendant 15 minutes avec agitation, puis deux fois pendant cinq minutes avec agitation. La membrane a été incubée dans la solution de blocage (lait écrémé 1,5%) avec une dilution 1 : 3000 (5µL dans 15 mL) de l'anticorps primaire pendant deux heures. La membrane a été rincée tel que précédemment. Elle a ensuite été incubée dans la solution de blocage pendant une heure avec une dilution 1 : 1000 (15µL dans 15mL) de l'anticorps secondaire. La membrane a été rincée tel que précédemment avec un lavage supplémentaire de 5 à 10 minutes. La membrane a été égouttée sur papier absorbant, déposée dans un contenant propre, protéines vers le haut, et incubée dans 3mL de la solution 2 de détection de la trousse ECL Western blotting detection reagents and analysis system de GE Healthcare (no. prod. RPN2109). À la chambre noire, la solution 1 (3mL) de détection a été ajoutée et le tout a été incubé pendant une minute. La membrane a été égouttée et déposée entre deux feuilles de plastique en prenant soin d'enlever les bulles d'air. À l'obscurité, le tout a été déposé dans une cassette à autoradiographie et un film a été déposé par-dessus pendant une courte durée de temps (de 10 secondes à 2 minutes selon les expériences). Le développement du film a été réalisé en utilisant un développeur de type AFP IMAGING, Mini-Med/90, X-Ray film processor.

***PBS 10X** : 80g de NaCl, 2g de KCl, 11.5g de Na₂PO₄-7H₂O et 2g de KH₂PO₄ dans un total de 1L d'eau. Le PBS 1X doit être préparé la journée même.

PBS-T 1X : 999mL de PBS 1X, 1mL de Tween-20.

2.5.3.8 Digestion de protéines à la trypsine et purification par colonne Zip Tip

Digestion tryptique : À partir d'un gel SDS-PAGE, la bande correspondant à la protéine à analyser a été découpée en petits morceaux ($\approx 1\text{mm}^3$), et le tout a été déposé dans un microtube. Les morceaux de gels ont été recouverts de 500 μL de NH_4CO_3 100mM et incubé durant une heure à la température de la pièce. Le liquide a ensuite été éliminé à l'aide d'une pipette de transfert. Cent cinquante μL de NH_4CO_3 100mM et 10 μL de DTT 45mM ont été ajoutés au tube. Ce dernier a été centrifugé durant 30 secondes et incubé à une température de 60°C durant 30 minutes. Par la suite, le mélange a été refroidi à la température de la pièce et 10 μL d'iodoacétamide 100mM ont été ajoutés. Le tout a été mélangé, centrifugé durant 30 secondes et incubé à la température de la pièce à l'abri de la lumière durant 30 minutes. Le liquide a ensuite été enlevé et 500 μL d'acétonitrile 50%/ NH_4CO_3 100mM ont été ajoutés au tube. Celui-ci a été incubé durant une heure avec agitation à la température de la pièce. Le liquide a été enlevé et les morceaux de gel ont été transférés dans un tube à PCR de 200 μL . Cinquante μL d'acétonitrile 100% ont été ajoutés au tube et le tout a été incubé durant 15 minutes à la température de la pièce. Le liquide a été éliminé et le reste du contenu du tube a été asséché à l'évaporateur rotatif durant 30 minutes. Le volume de tampon NH_4CO_3 25mM égal au volume de gel a été ajouté en deux étapes : le premier tiers de la quantité contenant 0,2 μg de trypsine a d'abord été ajouté. Le tube a été centrifugé durant 30 secondes et incubé durant 15 minutes à la température de la pièce. Les deux tiers restants ont ensuite été ajoutés pour recouvrir le gel et le tout a été incubé jusqu'au lendemain à une température de 37°C. Le tube a été centrifugé durant 30 secondes et le surnageant a été déposé dans un tube de 1,5mL. Cinquante μL d'acétonitrile 60%/TFA 0,1% ont été ajoutés au tube contenant le gel et le tout a été centrifugé durant 30 secondes et incubé durant 30 minutes à 37°C. Le tube a été agité durant cinq minutes et sonifié durant cinq minutes. Le liquide a été récupéré et ajouté au liquide déjà recueilli. Les étapes d'acétonitrile 60%/TFA 0,1% et les suivantes ont été répétées. Le tube contenant le liquide a été centrifugé durant une minute. Le liquide a été transféré dans un autre tube pour éliminer les résidus. Le liquide a ensuite été évaporé complètement à l'évaporateur rotatif. Les peptides ont été

resuspendus dans 20 μ L de TFA 1%. Le tout a été agité au vortex et centrifugé durant 30 secondes. Le liquide peut être conservé à -20°C.

Purification au Zip Tip C₁₈: Avec une pipette P20 ajustée à 10 μ L, la solution d'acétonitrile 50% a été aspirée et rejetée 4 fois dans le Zip Tip C₁₈ de Millipore. La solution de TFA 0,1% a été aspirée et rejetée 6 fois. L'échantillon de peptides a été déposé dans le Zip Tip à l'aide d'un embout de chargement. Le liquide a été aspiré et rejeté 11 fois dans un tube à PCR de 200 μ L. La solution de TFA 0,1% a été aspirée et rejetée 11 fois. Du méthanol 50%/acide acétique 0,1% a été déposé dans trois tubes à PCR à raison de 3 μ L par tube. Ce liquide a été aspiré et rejeté 6 fois pour chaque tube en laissant le liquide dans le tube. Le liquide de chaque tube a été combiné et le tout a été sonifié durant 5 minutes et centrifugé durant 30 secondes. Une analyse par spectrométrie de masse a ensuite suivi.

2.5.3.9 Dosage de protéines (Méthode de Bradford)

La quantité de protéines a été évaluée par la méthode de dosage Bradford. Une courbe de référence a été élaborée à partir de la gamma globuline; les différentes quantités d'eau et de gamma globuline (57,6mg/mL) sont énumérées dans le tableau VII selon les concentrations voulues. Différentes dilutions 1/5 des solutions de protéines ont été faites pour un volume final de 800 μ L. Les mêmes dilutions ont été faites avec le produit dans lequel les protéines baignent pour éliminer le bruit de fond. Deux cents μ L du réactif de Bradford (Biorad) ont été ajoutés. Après 5 à 15 minutes d'incubation, une lecture au spectrophotomètre à 595nm a été faite. Par la suite, différents calculs ont été effectués pour déterminer la concentration protéique de départ.

Tableau VII : Quantité d'eau et de solution de γ -globuline 57,6mg/mL nécessaire pour obtenir les concentrations voulues.

Concentration μ g/mL	0	3,6	7,2	14,4	21,6	28,8	36,0	43,2	50,4
Qté d'eau (μ L)	800	750	700	600	500	400	300	200	100
Qté γ globuline (μ L)	0	50	100	200	300	400	500	600	700

2.5.4 Méthodes utilisées pour la purification des protéines

2.5.4.1 Concentration des protéines sur membrane Amicon

Afin de concentrer les protéines provenant d'un surnageant de culture, la technique d'ultrafiltration sur membrane a été utilisée. Une membrane Diaflo Ultra Filtration PM10 de Amicon Division (no. prod. 13142 MEM 54771) a été utilisée. Ce type de membrane ne laisse passer que les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 10kDa. Le liquide a été introduit dans le montage et une pression de 40psi d'azote a été appliquée. Le tout a été laissé ainsi avec agitation légère à une température de 4°C jusqu'à une concentration d'un facteur 100 du liquide de départ.

2.5.4.2 Purification par colonne Hitrap

Les protéines extracellulaires ont été concentrées par ultrafiltration. Le concentré a été dialysé durant 24h dans l'eau et 24h dans le tampon citrate 4mM pH5,0. La colonne Hitrap SP Sepharose a été lavée avec 5mL de tampon citrate 20mM pH5,0 à raison de 1 à 4mL/min. Ensuite, 5mL de tampon de régénération (tampon citrate 20mM, NaCl 1M) ont été appliqués à la colonne. Une autre étape de lavage au tampon citrate a été faite. L'échantillon a été appliqué et l'éluat initial a été recueilli. La colonne a été lavée avec 5mL de tampon citrate. L'élution a été réalisée avec du tampon citrate de concentration de NaCl de 50mM, 100mM, 200mM, 300mM, 400mM et 500mM à raison de 3mL par concentration, recueillis en fractions de 1mL. La colonne a été lavée avec 5mL de tampon de régénération (recueilli en fractions de 1mL), puis avec 5mL de tampon citrate. Les fractions ont été analysées par gels SDS-PAGE.

*L'échantillon et tous les tampons ont été filtrés sur filtre de 0,22µm avant le passage sur la colonne et toute l'expérience a été réalisée à 4°C .

2.5.4.3 Purification par colonne Histrap

Le mycélium a été récupéré par centrifugation ou filtration. Celui-ci a été resuspendu dans du tampon* (généralement 4mL par gramme de mycélium) sodium/phosphate 0,02M; NaCl 0,5M; imidazole 0,05M; PMSF 0,1mM et urée 4 à 8M, pour dénaturer les protéines et rendre disponible la queue de polyhistidine qui pourrait être séquestrée dans la protéine. Les cellules ont été brisées par sonification ou presse de French (voir protocoles décrit précédemment). La colonne HistrapTM de GE Healthcare de 1mL a été utilisée pour la purification. Cette dernière a d'abord été lavée avec 5mL d'eau, à raison de 1 à 4mL par minute, puis remplie avec 0,5mL de NiSO₄ 0,1M. Un autre lavage de 5mL d'eau a ensuite été fait. La colonne a été équilibrée avec 10mL de tampon sodium/phosphate 0,02M, NaCl 0,5M et imidazole 50mM. L'échantillon a été appliqué à la colonne et l'éluat initial a été recueilli. La colonne a été lavée avec du tampon jusqu'à ce que la D.O._{280nm} du liquide sortant soit le plus près de 0 possible. Des tampons de différentes concentrations d'imidazole ont été faits (100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 500mM). Ils ont été appliqués à la colonne à raison de 5mL chacun et le liquide a été récolté en fractions de 1mL. La colonne a été lavée avec 10mL de tampon. Les fractions ont été analysées par gels SDS-PAGE.

*L'échantillon et tous les tampons ont été filtrés sur filtre de 0,22µm avant le passage sur la colonne et toute l'expérience a été réalisée 4°C.

2.5.4.4 Purification par HPLC

L'échantillon a été dialysé dans de l'eau durant 24h avec légère agitation à une température de 4°C, dans une chambre à dialyse (7kDa) de la compagnie Pierce. Une seconde dialyse a été faite de la même façon dans du tampon citrate 4mM. La colonne échangeuse de cations Protein-PakTM CM 8HR a été utilisée et le tout a été réalisé dans une chambre froide à 4°C. Le détecteur a été ajusté à une longueur d'onde de 280nm et à une sensibilité de 2. La colonne a été équilibrée avec du tampon citrate 50mM durant un minimum de 30 minutes à un débit de 0,8 à 1mL/min. L'échantillon a été appliqué à la

chambre d'injection à l'aide d'une seringue. L'injection a été réalisée en mode isocratique à un débit de 1mL/min jusqu'à ce que le détecteur ne détecte plus de protéines et l'éluat initial a été recueilli. Un programme de gradient d'élution a ensuite été amorcé. Ce dernier implique le passage de 100% du tampon de départ (tampon citrate 50mM) à 100% du tampon d'élution (tampon citrate 50mM, NaCl 1M) en 180 minutes. Le débit a été réglé à 0,8 à 1mL/min, le collecteur de fraction à une minute par fraction et le chromatographe à 1mm/min, donc une fraction par mm. Les fractions correspondant à un pic sur le graphique ont été analysées par gels SDS-PAGE.

Programme :	0-180min	100%A → 100%B	0,8 à 1,0mL/min
	180-210min	100%B	"
	210-215min	100%B → 100%A	"
	215-220min	100%A	0,8 à 1,0mL/min → 0,2mL/min
	220min et +	100%A	0,2mL/min

2.5.4.5 Purification par tamis moléculaire

La colonne à tamis moléculaire HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 High resolution 17-1194-01 a été équilibrée avec du tampon sodium phosphate 100mM pH6 et le détecteur a été allumé au moins deux heures avant l'utilisation du système. L'échantillon de protéines à purifier par cette technique doit être dans le plus petit volume possible (maximum 2mL). Ce dernier a été appliqué à la colonne à l'aide d'une seringue. Le même tampon que précédemment a été utilisé pour continuer le passage sur le tamis à un débit de 1mL par minute. Le collecteur de fractions a été ajusté à cinq minutes par fraction, ce qui donne des fractions de 5mL chacune. Le détecteur a été ajusté en fonction de la quantité de protéines à purifier (0,5; facteur inverse d'amplification du signal envoyé au graphe). La vitesse de l'enregistreur a été ajustée à 0,2mm par minute, ce qui représente une fraction par mm. Le passage a été effectué pendant plusieurs heures pour un total de 95 fractions recueillies. Celles correspondant à la sortie de protéines (visible par des pics sur le graphique) ont été analysées par gels SDS-PAGE.

2.5.4.6 Concentration des protéines par Macrosep

Les protéines provenant de petits volumes (3 à 15mL) ont été concentrées par filtration à l'aide d'une cellule Macrosep Centrifugal Device de Pall Life Science (no. prod. OD003C37) (figure 17). Le principe est de filtrer par centrifugation le liquide à travers une membrane ne laissant passer que les molécules inférieures à 3kDa. Le liquide a été déposé dans la chambre à filtration et le tout a été centrifugé à 4060 x g à une température de 4°C. Les protéines ont été recueillies dans un volume final de 0,5 à 1,5mL.

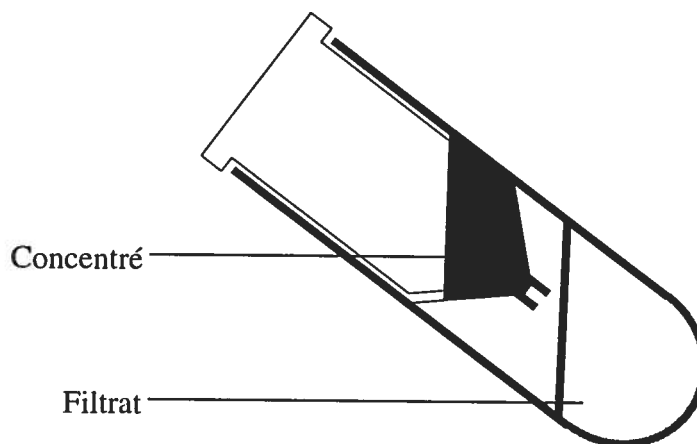


Figure 17 : Méthode de filtration de Macrosep Centrifugal Device.

2.5.5 Méthodes utilisées pour la caractérisation des protéines

2.5.5.1 Test enzymatique

Pour vérifier si les protéines purifiées avaient la capacité de déacétyler, des tests enzymatiques ont été réalisés. Vingt μL de l'enzyme (0,1mg/mL), 20 μL du substrat à déacétyler (50mg/mL), 10 μL de CoCl_2 (10mM) et 50 μL de tampon (50mM) ont été mélangés. La réaction a été réalisée durant 24h à la température voulue.

2.5.5.2 Dosage de l'acide acétique

La trousse de la compagnie Megazyme a été utilisée pour faire le dosage de NADH et ainsi calculer la quantité d'acétate produite par la réaction. Le test a été fait en mélangeant 200 μL d'eau, 10 μL d'échantillon, 50 μL de solution 1* et 20 μL de solution 2*. Une première mesure d'absorbance à 340nm (A_0) a été faite après 3* minutes. Ensuite, 2 μL de suspension 3 ont été ajoutés au mélange et une deuxième mesure d'absorbance (A_1) a été réalisée après quatre minutes. Finalement, 2 μL de suspension 4* ont été ajoutés au mélange et une dernière mesure d'absorbance (A_2) a été faite après une heure. Les tests ont tous été faits en triplicata. Pour calculer la concentration d'acétate libéré, les calculs suivants ont été réalisés (un blanc a été effectué pour chaque échantillon).

***Solution 1 :** Tampon TEA 0.8M pH 8.4; acide malique 60mM; chlorure de magnésium 20mM; azide de sodium 0.02% (p/v).

Solution 2 : 67mg de NAD⁺; 30mg de PVP; 9.8mg de Co-enzyme A; additionnés de 5.5mL d'eau.

Suspension 3 : L-malate déhydrogénase 1250u/mL; citrate synthase 180u/mL.

Suspension 4 : Acétyl-CoA synthétase 90U/mL.

Calcul du delta d'acide acétique :

$$\Delta A_{\text{Acide acétique}} = \left[(A_2 - A_0) - \frac{(A_1 - A_0)^2}{(A_2 - A_0)} \right]_{\text{Éch}} - \left[(A_2 - A_0) - \frac{(A_1 - A_0)^2}{(A_2 - A_0)} \right]_{\text{Blanc}}$$

Calcul de la concentration en acide acétique :

$$C = \frac{V * PM}{\epsilon * d * v} * \Delta A_{\text{Acide acétique}} \quad (\text{g/L})$$

Légende :

C	=	Concentration (g/L)
V	=	Volume final (mL)
PM	=	Poids moléculaire de l'acide acétique (g/mol) (= 60,06g/mol)
ϵ	=	Coefficient d'extinction du NADH à 340nm (= 6300 L * mol ⁻¹ * cm ⁻¹)
d	=	Hauteur du liquide dans le puits (cm)
v	=	Volume d'échantillon (mL)

3. RÉSULTATS

3.1 CLONAGE DES GÈNES DE DÉACÉTYLASES

Les différents gènes de déacétylases ont été amplifiés par PCR tel que décrit dans la section 2.5.1.2 à partir de la souche *S. coelicolor* M145 (tableau III). La figure 18 montre la migration des amplicons en gel d'agarose. Ils ont été purifiés à l'aide de la trousse GFX, digérés par les enzymes de restriction appropriées, et ligués dans les vecteurs pIAF550MCSL et pIAFC109MCS (figures 14, 15, tableau IV). Une transformation de la bactérie *Streptomyces lividans* 10-164 (tableau III) a suivi. La présence des gènes dans les transformants a été vérifiée soit par PCR sur colonie ou par isolement de plasmides (résultats non illustrés). Les inserts obtenus suite à l'isolement de plasmides ont été digérés et ligués dans le vecteur pTZ19R (figure 16, tableau IV). Le tout a servi à transformer la bactérie *Escherichia coli* DH11S (tableau III). Les plasmides ont été isolés de ces clones pour être séquencés et ainsi vérifier l'exactitude de la séquence des gènes.

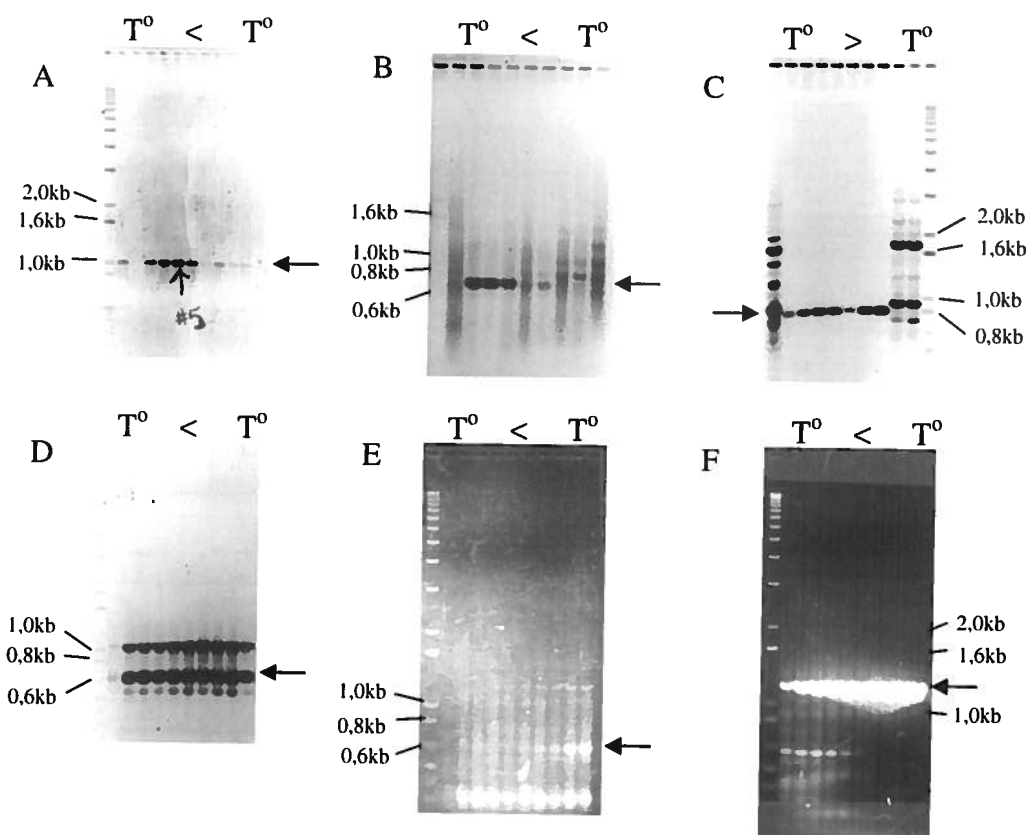


Figure 18 : Migration en gel d'agarose 0,7% des produits de PCR suite à l'amplification des gènes; (A) SC 2G38.22 (846pbs), (B) SC 6G4.38 (747pbs), (C) SC H35.12c (834pbs), (D) SC C61A.31 (687pbs), (E) SC M10.24c + Histag (633pbs) et (F) SC D95A.17c + Histag (1173pbs).

3.2 EXPRESSION ET IDENTIFICATION DES PROTÉINES

Suite au clonage des neuf gènes codant pour des déacétylases présumptives, l'expression de trois protéines correspondantes a pu être mise en évidence. Les autres n'ont donné aucun résultat d'expression concluant. Voici donc les différentes expériences ayant permis l'identification de ces trois protéines.

3.2.1 Identification de la protéine SC H35.12c

3.2.1.1 Expression de la protéine et migration en gel SDS-PAGE

La protéine SC H35.12c, qui avait été considérée au départ comme une protéine intracellulaire, est en fait sécrétée, tel que démontré dans la revue de littérature à la section 1.2.8.1.

Une culture de 25mL de M14-xylose 1% a été réalisée tel que décrit dans la section 2.5.3.1. Après 24h d'incubation, les protéines provenant de 500 μ L du surnageant de culture ont été précipitées à l'acétone et resuspendues dans 100 μ l de tampon d'échantillon. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE, puis visualisées par coloration au bleu de Coomassie. La figure 19, au puits 5, montre trois bandes de masse moléculaire d'environ 31, 29 et 26kDa.

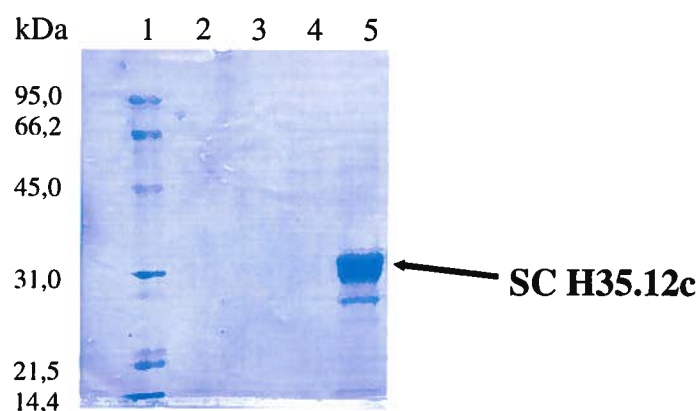


Figure 19 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines extracellulaires : puits 1, marqueur moléculaire; 2, C109/10-164; 3, 550/10-164; 4, SC C61A.31; 5, SC H35.12c.

3.2.1.2 Digestion tryptique et analyse par spectrométrie de masse de la protéine

Afin d'identifier la protéine d'intérêt, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée. Pour ce faire, un autre gel SDS-PAGE a été préparé de la même façon en n'y mettant que les protéines extracellulaires dans 8 puits. Trois bandes étaient visibles, soit à environ 31kDa, 29kDa et 26kDa (voir figure 20). Pour la bande à 31kDa, le gel correspondant à cette bande et provenant des puits 2-3-4-5 a été découpé et mis dans un tube, et celui provenant des puits 6-7-8-9, dans un autre tube. Une digestion tryptique a suivi et les peptides provenant des deux tubes ont été combinés pour avoir le plus de matériel possible pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le même procédé a été réalisé pour les bandes à 29kDa et à 26kDa. Les spectres correspondant à chaque bande étaient identiques et comprenaient les mêmes pics (résultats non illustrés). Certains peptides (pics principaux) ont été sélectionnés et fragmentés pour obtenir leur séquence en acides aminés (voir figure 21).

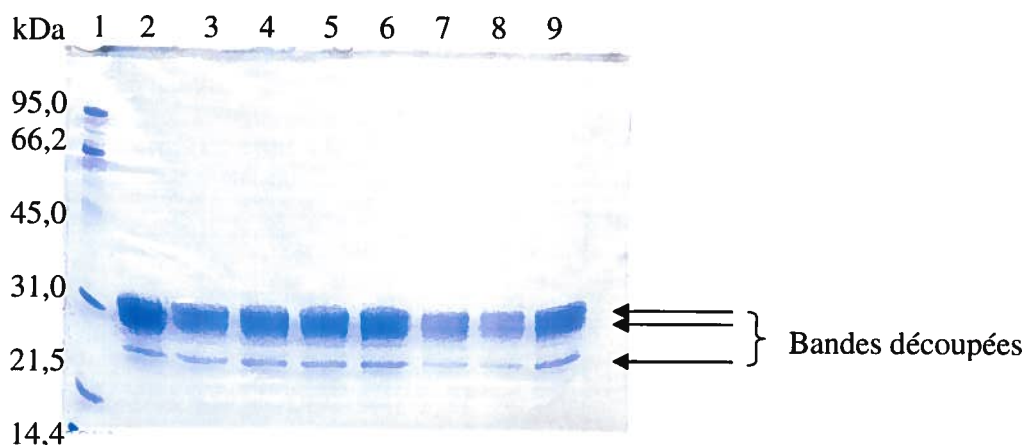


Figure 20 : Gel SDS-PAGE ayant servi à découper la bande correspondant à la protéine SC H35.12c pour effectuer une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse. Le gel comprend 10 μ L de protéines extracellulaires concentrées : puits 1, marqueur moléculaire; 2-9, protéine SC H35.12c.

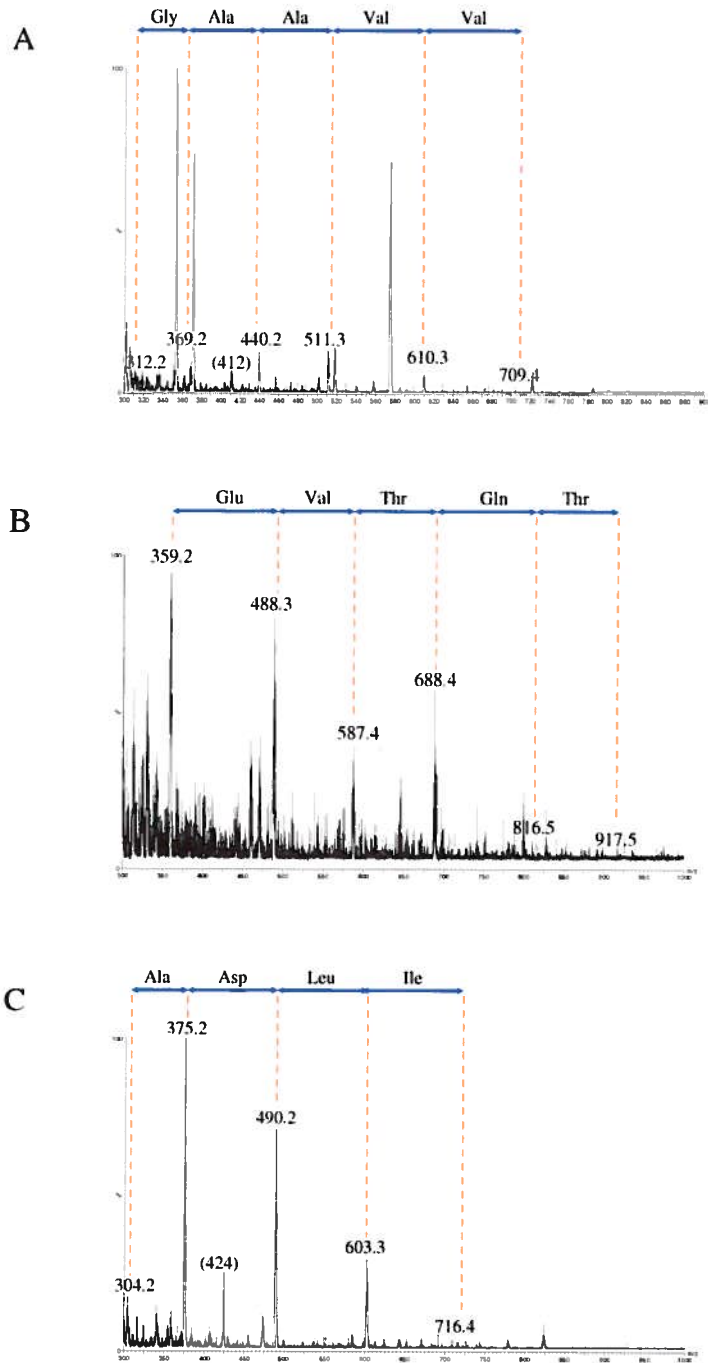


Figure 21 : Spectres de masse ayant servi à séquencer et à identifier différents peptides appartenant à la protéine SC H35.12c; (A) peptide T8 (**DVVAAGHR**), (B) peptide T12 (**EILDAER**) et (C) peptide T20 (**TQTVEALR**).

Après avoir fragmenté certains peptides et reconstitué leur séquence, cette dernière a été comparée à la séquence en acides aminés de la protéine afin de savoir si les peptides correspondaient bien à cette protéine. Il s'est avéré que plusieurs peptides ont pu être identifiés comme appartenant à cette protéine. Ces derniers sont indiqués en rouge dans la séquence de la protéine à la figure 22 et couvrent 43% de la protéine (une fois le peptide signal retranché). Cette expérience a donc permis d'identifier la protéine SC H35.12c.

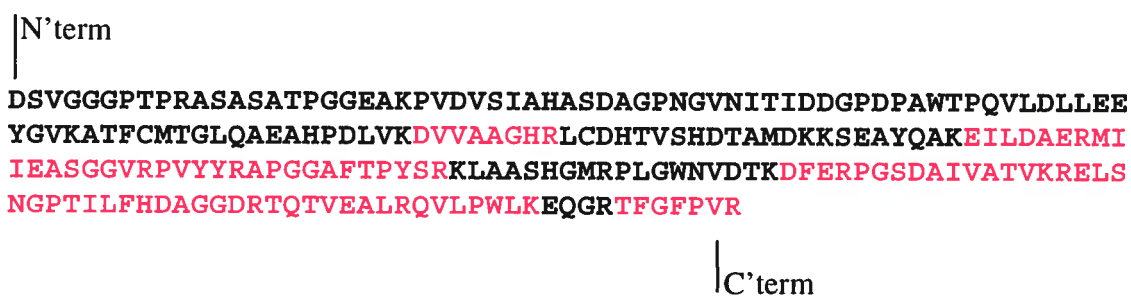


Figure 22 : Position dans la séquence de la protéine SC H35.12c des différents peptides séquencés (rouge) suite à la digestion tryptique et à l'analyse par spectrométrie de masse des protéines provenant des trois différentes bandes dans le but d'identifier la protéine SC H35.12c.

3.2.2 Identification de la protéine SC D95A.17c

3.2.2.1 Expression de la protéine et migration en gel SDS-PAGE

Tel que décrit dans la section 2.5.3.1, une culture de 25mL de M14-xylose 1% a été réalisée dans le but d'exprimer la protéine. Suite à une incubation de 24h, les protéines intracellulaires ont été récupérées conformément à la méthode de sonification de la section 2.5.3.2. Les protéines ont été visualisées par migration en gel SDS-PAGE (10 μ L de protéines par puits) (figure 23).

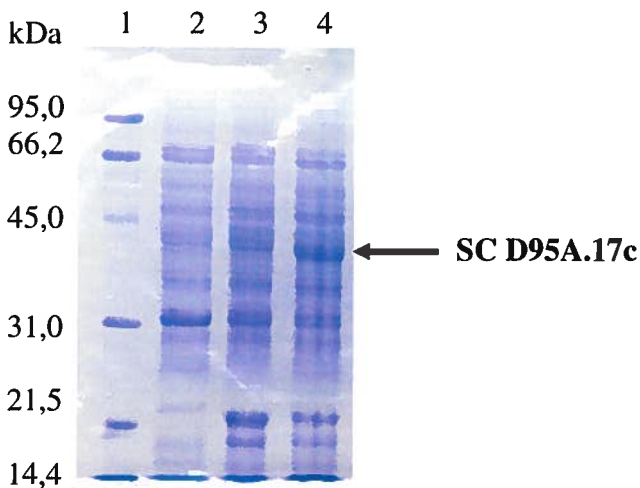


Figure 23 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines intracellulaires; puits 1, marqueur moléculaire; 2, C109/10-164; 3, SC M10.24c; 4, SC D95A.17c.

3.2.2.2 Digestion tryptique et analyse par spectrométrie de masse de la protéine

Afin d'identifier la protéine d'intérêt, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée. Les bandes de poids moléculaire 40kDa et 37kDa ont été ciblées (voir figure 24). Une digestion tryptique a suivi en empruntant le même procédé que celui utilisé pour la digestion de la protéine SC H35.12c (voir section 3.2.1.2). L'analyse par spectrométrie de masse a suivi et certains peptides ont été fragmentés pour reconstituer leur séquence en acides aminés (se référer à la figure 25).

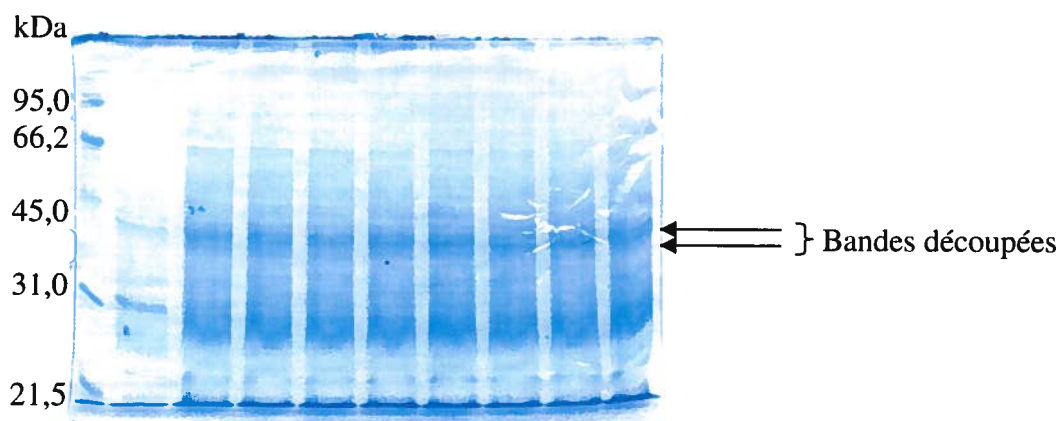


Figure 24 : Gel SDS-PAGE d'où ont été découpées les bandes susceptibles de correspondre à la protéine SC D95A.17c en vue d'une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse. Le gel comprend 10 μ L de protéines par puits : puits 1, marqueur moléculaire; 2, C109/10-164; 3-10, SC D95A.17c.

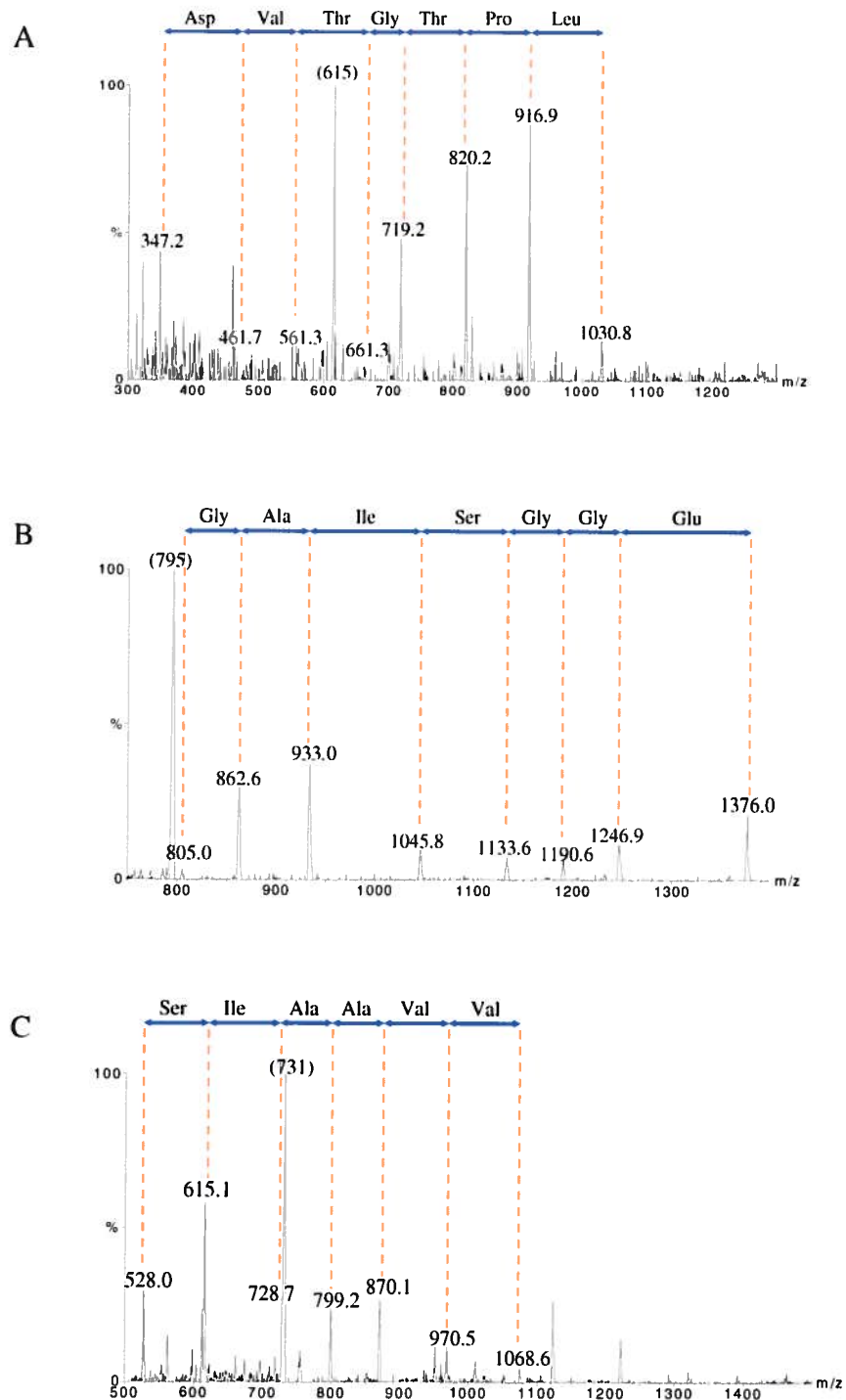


Figure 25 : Spectres de masses ayant servi à séquencer et à identifier différents peptides appartenant à la protéine SC D95A.17c (peptides provenant de la protéine de 40kDa); (A) peptide T3 (**VVLPTGTVDDGR**), (B) peptide T19 (**LVEGGSIAGSTLTDR**) et (C) peptide T22-23 (**AVTVDRLPVGDVVAISANPAR**).

Une fois la séquence de chaque peptide déterminée, celle-ci a été comparée à la séquence en acides aminés de la protéine pour vérifier si les peptides correspondaient à celle-ci. Dans le cas de la protéine à 40kDa, des peptides ont été identifiés comme appartenant à la protéine à l'étude, ce qui n'était pas le cas de celle à 37kDa. Seulement trois peptides ont pu être identifiés et associés à la protéine; ils sont illustrés en rouge dans la séquence en acides aminés à la figure 26.



Figure 26 : Position des différents peptides séquencés (rouge) et identifiés comme appartenant à la protéine SC D95A.17c suite à la digestion tryptique et à l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine correspondant à la bande située à 40kDa.

Une fois la protéine identifiée, le clonage du gène SC D95A.17c a été repris en ajoutant, en 5' du gène, une séquence codant pour une queue de polyhistidine, ce qui a permis de faciliter la purification de la protéine par la suite.

3.2.2.3 Expression et récupération des protéines intra et extracellulaires

Une culture de 100mL en milieu M14-xylose 1% a été réalisée, tel que décrit dans la section 2.5.3.1 afin de recueillir les protéines produites par les clones contenant le plasmide avec ou sans l'insert comme contrôle négatif. Après 24h d'incubation, le mycélium et le surnageant ont été séparés par filtration. Le mycélium a été sonifié pour récupérer les protéines intracellulaires et 500 μ L du surnageant ont été précipités à l'acétone pour recueillir les protéines extracellulaires.

3.2.2.4 Migration en gels SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

Les protéines ont été analysées par migration en gel SDS-PAGE, et un gel supplémentaire, identique, a servi à faire un immunobuvardage de type Western pour confirmer la présence de la protéine ayant une queue de polyhistidine (figure 27).

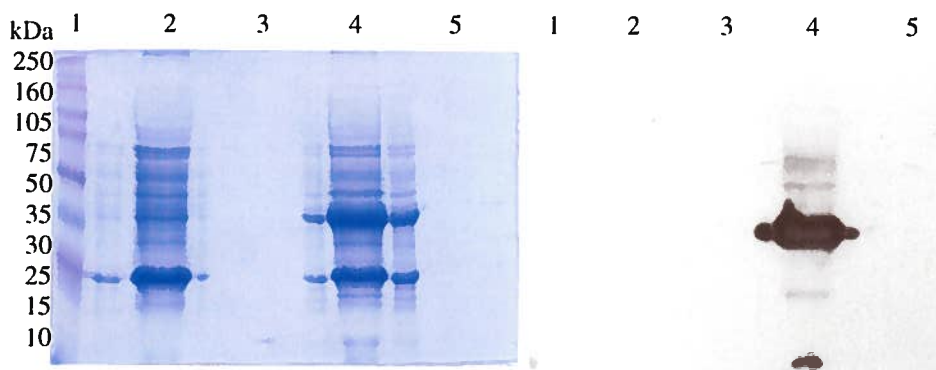


Figure 27 : Gel SDS-PAGE et résultat de l'immunodétection des protéines produites : puits 1, marqueur moléculaire Rainbow; 2, 550/10-164 intra; 3, 550/10-164 extra; 4, SC D95A.17c + Histag intra; 5, SC D95A.17c + Histag extra.

3.2.3 Identification de la protéine SC M10.24c

3.2.3.1 Expression et récupération des protéines intracellulaires

Une culture de 25mL en milieu M14-xylose 1% a été réalisée tel que décrit dans la section 2.5.3.1. Après 24h d'incubation, les protéines intracellulaires ont été récupérées conformément à la méthode de sonification de la section 2.5.3.2. Les protéines ont été visualisées par migration sur gel SDS-PAGE (15 μ L de protéines intracellulaires par puits) (figure 28).

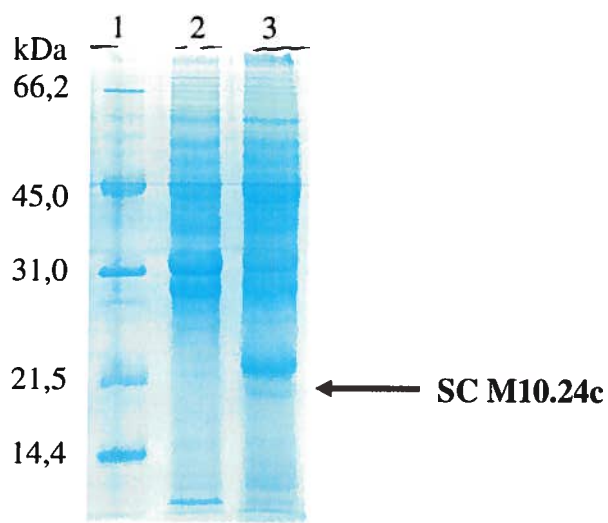


Figure 28 : Gel SDS-PAGE représentant les protéines : puits 1, marqueur moléculaire; 2, 550/10-164; 3, SC M10.24c.

Suite à l'observation d'une protéine au poids moléculaire attendu de la protéine SC M10.24c, le clonage du gène a été repris en ajoutant, en 5' du gène, une séquence codant pour une queue de polyhistidine, de la même façon que pour la protéine SC D95A.17c.

3.2.3.2 Expression et récupération des protéines intracellulaires avec queue de polyhistidine

Une culture de 25mL en milieu M14-xylose 1% a été réalisée tel que décrit dans la section 2.5.3.1 pour le clone contenant le plasmide avec l'insert ainsi que celui ayant le plasmide sans insert comme contrôle négatif. Après 24h d'incubation, le mycélium et le surnageant ont été séparés par filtration. Le mycélium a été sonifié afin de récupérer les protéines intracellulaires.

3.2.3.3 Migration en gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

L'analyse des protéines produites a été faite en réalisant une migration en gel SDS-PAGE. Pour confirmer la présence de la protéine à l'étude ayant une queue de polyhistidine, un immunobuvardage de type Western a été réalisé (à l'aide d'un gel identique au premier) (figure 29).

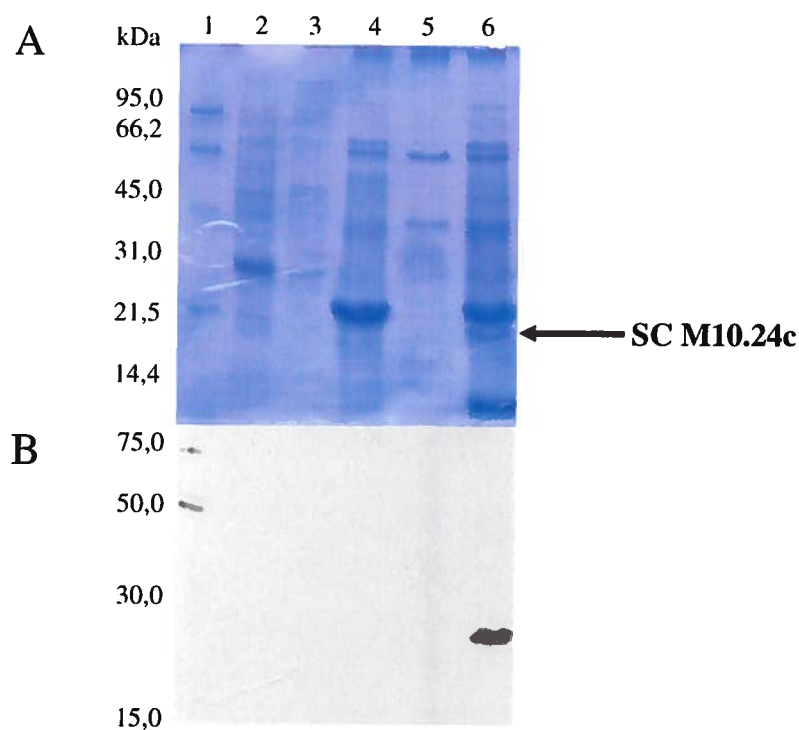


Figure 29 : Gel SDS-PAGE (A) et résultat de l'immunodétection des protéines (B) : puits 1, marqueur moléculaire; 2, contrôle positif, 3, contrôle négatif; 4, 550/10-164; 5, SC M10.24c; 6, SC M10.24c + Histag.

3.3 PURIFICATION DES PROTÉINES

3.3.1 Purification de la protéine SC H35.12c

3.3.1.1 Préparation de la culture de trois jours et concentration du surnageant

La protéine SC H35.12c a été purifiée en commençant d'abord par préparer une culture de trois jours d'un litre en M14-xylose 1% pour produire la protéine tel que décrit dans la section 2.5.3.1. La culture a été filtrée avec du papier-filtre sous vide pour recueillir le surnageant uniquement. Ce dernier a ensuite été centrifugé durant 20 minutes avec un rotor JA-10 à 10 000RPM et filtré sur membrane (0,22µm). Les protéines du surnageant ont été concentrées d'un facteur 100 pour obtenir 10mL à l'aide de membrane Amicon tel que décrit dans la section 2.5.4.1.

3.3.1.2 Purification par HPLC sur colonne cationique Protein-Pak™ CM 8HR

Une partie du 10mL recueilli a servi à faire des essais de purification qui se sont avérés non concluants. Les 3mL restants ont servi à faire une purification intéressante. Ce liquide contenant les protéines concentrées a été dialysé durant 24h dans de l'eau et durant 24 h dans du tampon citrate 4mM à pH 5,0. Le pH 5,0 a été utilisé puisqu'il est inférieur au point isoélectrique de la protéine (5,38), ce qui fait en sorte que la protéine est chargée positivement suite à la dialyse et qu'elle peut adhérer à une colonne échangeuse de cations.

Les protéines ont ensuite été purifiées par HPLC en utilisant une colonne Protein-Pak™ CM 8HR, tel que décrit dans la section 2.5.4.4. L'expérience a été arrêtée après la récolte de la 70^e fraction étant donné que la ligne de base avait été atteinte sur le graphe. Les fractions 11 à 62 ont été analysées par gels SDS-PAGE 12% pour identifier celles qui contenaient la protéine SC H35.12c. Les résultats de cette expérience sont illustrés à la page suivante à la figure 30.

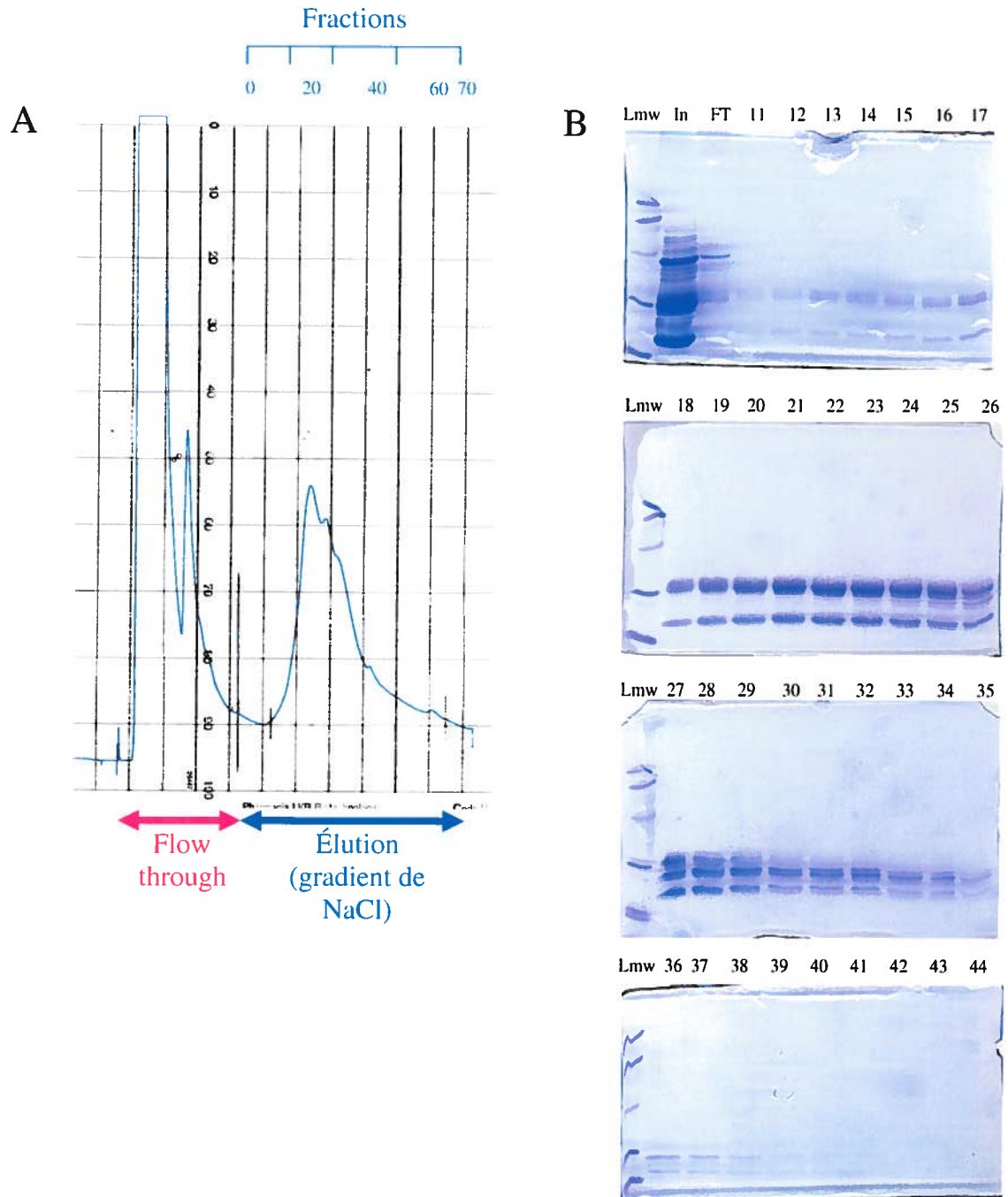


Figure 30 : Graphique représentant la purification par HPLC sur colonne Protein-Pak™ CM 8HR de la protéine SC H35.12c (A) et gels SDS-PAGE représentant plusieurs fractions (B) : Lmw, marqueur moléculaire; In, initial; FT, flowthrough; les no. représentent les fractions (les gels correspondant aux fractions 45 à 62 n'ont montré aucune bande et ne sont pas illustrés).

3.3.1.3 Purification par tamis moléculaire HiPrep

L'expérience de purification par HPLC sur colonne cationique a été réalisée trois fois pour avoir le plus de protéines possible. Les fractions correspondant à la protéine et contenant le moins possible d'autres protéines ont été mises ensemble pour effectuer une étape de purification supplémentaire de tamis moléculaire.

1^{er} passage HPLC : ensemble des fractions 14 à 23

2^e passage HPLC : ensemble des fractions 11 à 16

3^e passage HPLC : ensemble des fractions 7 à 12

Le liquide de chacun des pools de fractions a été concentré individuellement à l'aide d'une membrane Macrosep pour obtenir environ 2mL. Les concentrés de chaque pool ont été mis ensemble et reconcentrés par la même méthode pour un volume final de 1,7mL contenant 2,017mg de protéines. C'est ce concentré final qui a été injecté à la colonne de tamis moléculaire. Le passage sur colonne HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR a été réalisé tel que décrit dans la section 2.5.4.5.

Quatre pics ont été identifiés sur le graphique (voir figure 31) et les fractions correspondant à chacun des pics ont été mises ensemble et concentrées d'abord à l'aide d'une membrane Amicon, et par la suite à l'aide d'une membrane Macrosep pour un volume final de 1mL pour chaque pic. Les protéines contenues dans chaque échantillon ont été analysées par gel SDS-PAGE pour identifier le pic correspondant à la protéine SC H35.12c (les résultats sont illustrés à la page suivante à la figure 31). Le pic no. 3 représente la protéine recherchée. La concentration en protéines de cet échantillon a été dosée par la méthode de Bradford et est de 1,55mg/mL.

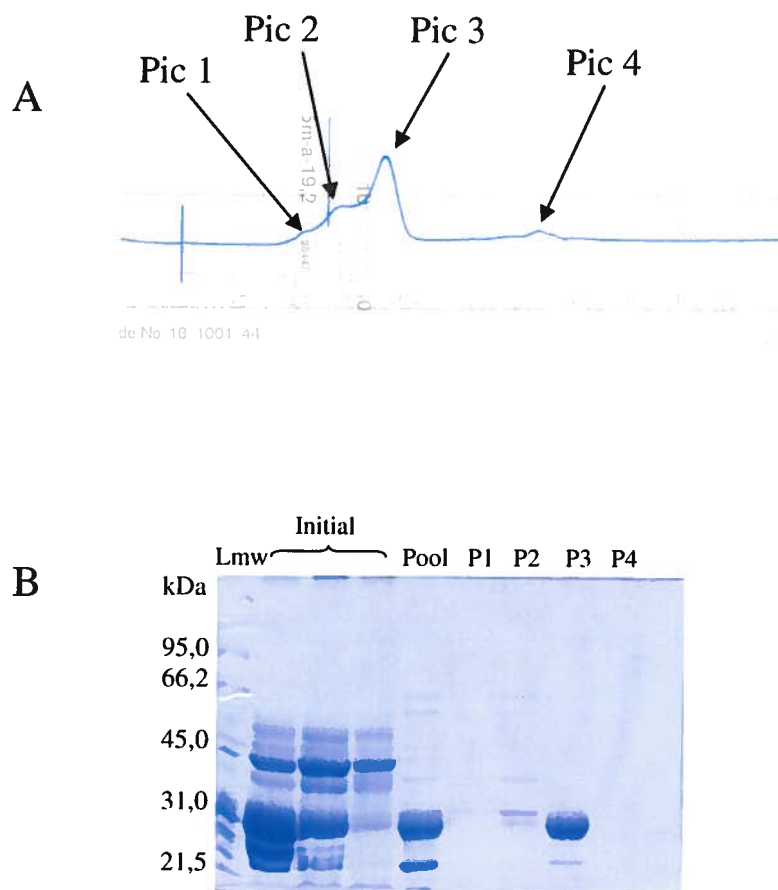


Figure 31 : Graphique représentant la purification finale de la protéine SC H35.12c par tamis moléculaire HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (A) et gels SDS-PAGE (B) correspondant aux protéines extracellulaires de chacune des cultures initiales, au concentré obtenu après trois passages sur HPLC et aux protéines correspondant à chacun des pics obtenus lors du passage sur tamis moléculaire.

3.3.1.4 Confirmation de la protéine H35 purifiée par spectrométrie de masse

Une fois que la protéine a été purifiée, la confirmation de l'identité de celle-ci a été réalisée. Pour ce faire, un gel SDS-PAGE a été réalisé en appliquant l'équivalent de 15µg de protéine purifiée par puits dans 8 puits pour avoir le plus de matériel possible (voir figure 32). Suite à la migration sur le gel, les bandes correspondant à la protéine ont été découpées; les bandes des puits 2 à 5 ont été mises dans un tube et celles des puits 6 à 9 dans un autre. Le protocole de digestion à la trypsine a ensuite été réalisé pour permettre l'analyse par spectrométrie de masse.

Les séquences des peptides analysés ont été comparées à la base de données Mascot. Le résultat obtenu indique que la protéine est une hydrolase présumptive de *Streptomyces coelicolor*, ce qui confirme la purification de la bonne protéine (voir figure 33).

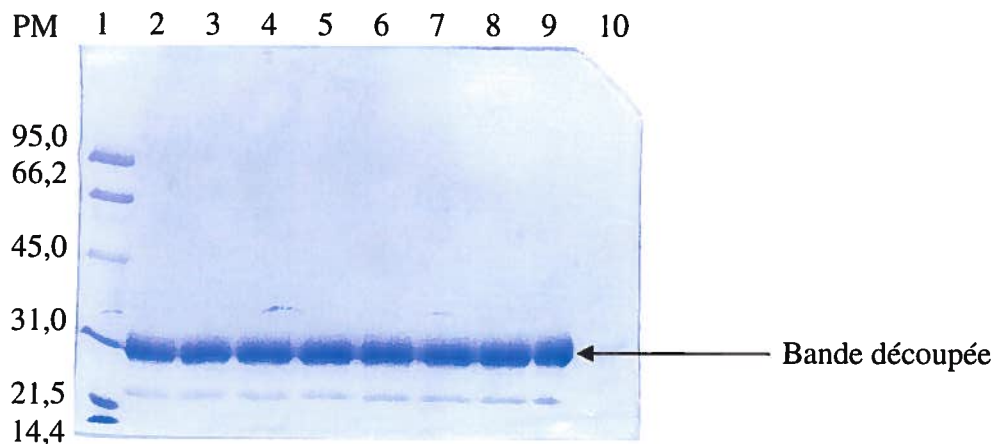
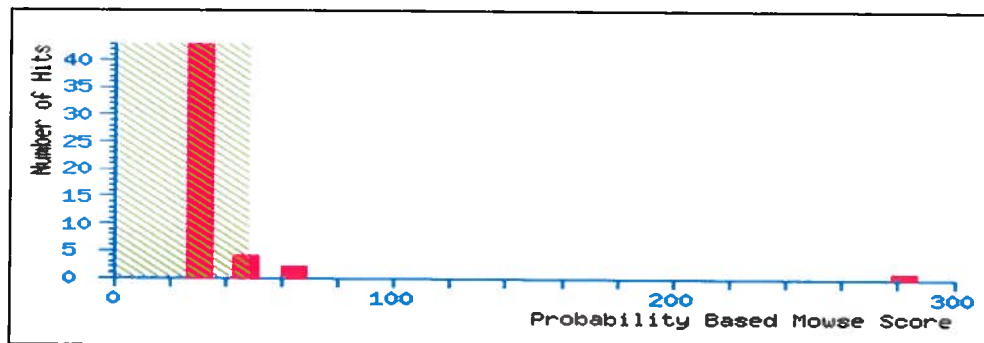


Figure 32 : Gel SDS-PAGE ayant servi à découper la bande correspondant à la protéine SC H35.12c pour effectuer une digestion tryptique permettant l'analyse par spectrométrie de masse : puits 1, marqueur moléculaire; 2-9, SC H35.12c.

MATRIX Mascot Search Results



T36647 **Mass: 29251** **Score: 282**
 probable hydrolase - *Streptomyces coelicolor*

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
15	411.57	821.13	822.44	-1.31	0	(34)	1.9	1	TFGFPVR
16	411.75	821.49	822.44	-0.95	0	37	0.99	1	TFGFPVR
17	412.30	822.59	822.44	0.15	0	(31)	3.8	1	TFGFPVR
18	412.33	822.69	822.44	0.23	0	(33)	1.4	1	TFGFPVR
19	412.37	822.73	822.44	0.29	0	(31)	4	1	TFGFPVR
22	442.13	882.25	882.53	-0.29	0	30	1.6	3	QVLPWLK
66	361.69	1121.37	1122.55	-1.18	0	(32)	7.8	1	APGGAFPTSR
67	362.87	1123.73	1122.55	1.18	0	43	0.2	1	AVGGAFTYSR
148	802.40	1602.79	1603.82	-1.04	0	(59)	0.0051	1	DFERPGSDAIVATVK
149	803.00	1603.99	1603.82	0.16	0	64	0.0015	1	DFERPGSDAIVATVK
150	533.87	1604.59	1603.82	0.77	0	(34)	1.3	1	DFERPGSDAIVATVK
167	571.11	1710.31	1709.89	0.42	0	26	7.4	9	MIIEASGGVRPVYR
186	600.45	1798.33	1797.86	0.46	0	46	0.071	1	ELSNPTILFHDAGGDR
211	663.36	1987.06	1987.93	-0.89	0	33	1.1	1	ATFCMTGLQAEAIPLVK

```

1  MVPDATGTGG  EQLREGGAAD  MARHGGGRGW  YGKVVGAALG  VTMLAVGASV
51  WTAQADSVGG  GTPRASASA  TPGGEAKPVD  VSIAHASDAG  PNGVNITIDD
101 GPDPAWTPQV  LDLLEEVGK  ATFCMTGLQA  EAHPDLVKDV  VAAGHRLCDH
151 TVSHDTAMDK  KSEAYQAKEI  LDAERMIIEA  SGGVRPVYR  APGGAFPTYS
201 RKLAASHGMR  PLGWNVDTKD  FERPGSDAIV  ATVKRELSNG  PTILFHDAGG
251 DRQTQVEALR  QVLPWLKEQG  RTFGFPVR

```

Figure 33 : Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse utilisant la base de données Mascot incluant le pointage Mascot, les peptides identifiés ainsi que leur position dans la séquence de la protéine.

3.3.2 Purification de la protéine SC D95A.17c

3.3.2.1 Préparation de la culture 48h et récupération des protéines intracellulaires

Une culture de 48h d'un litre en milieu M14-xylose 1% a été réalisée tel que décrit dans la section 2.5.3.1. Le mycélium (8,71g) a été récupéré par filtration sur papier filtre sous vide. Les cellules ont été brisées à l'aide de la presse de French dans 40mL de tampon tel que décrit dans la section 2.5.3.3.

3.3.2.2 Passage sur colonne Histrap et pool des fractions

Le liquide a été passé sur colonne Histrap conformément au protocole retrouvé dans la section 2.5.4.3. Les différentes fractions obtenues ont été analysées par gels SDS-PAGE. Les fractions correspondant à la protéine à l'étude la plus pure possible ont été mises ensemble. En l'occurrence, les trois dernières fractions recueillies pour l'élution à 100mM d'imidazole et la première de l'élution à 200mM d'imidazole ont été combinées (figure 34). Le dosage de ce mélange a été réalisé et la concentration obtenue est de 0,603mg/mL, donc 2,41mg de protéines ont été recueillis au total.

3.3.2.3 Confirmation de la protéine SC D95A.17c

Un immunobuvardage de type Western a été réalisé pour analyser les différentes fractions obtenues et pour confirmer la présence de la protéine à l'étude. Cependant, la réaction de chémiluminescence a émis une lumière si intense que le film devenait noir même à une seconde d'exposition. Le résultat était quand même difficilement visible à l'œil et la présence de la protéine a été confirmée, mais les résultats ne sont pas présentés en raison de la mauvaise qualité d'image obtenue lors du scan. L'immunobuvardage n'a pas été refait pour ne pas perdre trop de matériel en en avoir le plus possible pour les expériences de caractérisation.

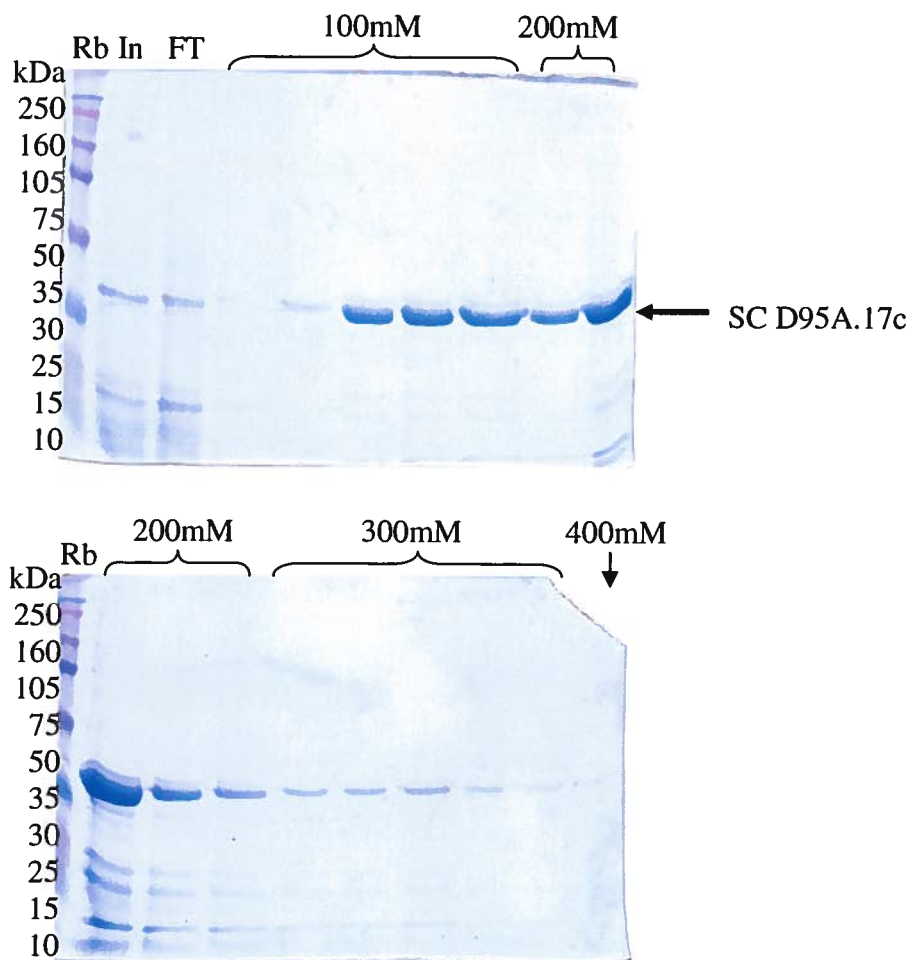


Figure 34 : Gels SDS-PAGE correspondant aux protéines recueillies pour chaque fraction suite au passage de la protéine SC D95A.17c sur colonne Histrap : Rb, marqueur moléculaire Rainbow; In, initial; FT, flowthrough (le dernier gel n'est pas illustré étant donné les très faibles bandes visibles).

3.3.3 Purification de la protéine SC M10.24c

3.3.3.1 Préparation de la culture 48h et récupération des protéines intracellulaires

Suite à une culture de 48h d'un litre en milieu M14-xylose 1% (tel que décrit à la section 2.5.3.1), le mycélium (7,60g) a été récupéré par filtration sous vide à l'aide d'un papier-filtre. La méthode de sonification a été utilisée pour briser les cellules (conformément à la section 2.5.3.2).

3.3.3.2 Passage sur colonne Histrap et pool des fractions

Comme dans le cas de la protéine SC D95A.17c, la protéine a été purifiée par un passage sur colonne Histrap. Le protocole retrouvé dans la section 2.5.4.3 a été suivi. Suite au passage, les fractions obtenues ont été analysées par gels SDS-PAGE. Les fractions qui s'avéraient contenir la protéine à l'étude de façon la plus pure possible ont été combinées. Comme les quantités recueillies étaient très faibles, les protéines purifiées provenant de deux expériences ont été mises ensemble. De cette façon, toutes les fractions correspondant aux éluions 100mM et 200mM d'une première expérience (figure 35) et les cinq fractions recueillies pour l'éluion à 200mM d'imidazole d'une deuxième expérience ont été combinées (figure 36). Le tout a par la suite été concentré à l'aide d'une membrane Macrosep. Suite au dosage de ce mélange, la concentration en protéines obtenue était de 0,097mg/mL, ce qui fait un total de 0,145mg de protéines recueillies.

3.3.3.3 Confirmation de la protéine SC M10.24c

Un immunobuvardage de type Western a été réalisé pour analyser les différentes fractions obtenues et pour confirmer la présence de la protéine à l'étude (a été fait pour la première expérience seulement, voir figure 35).

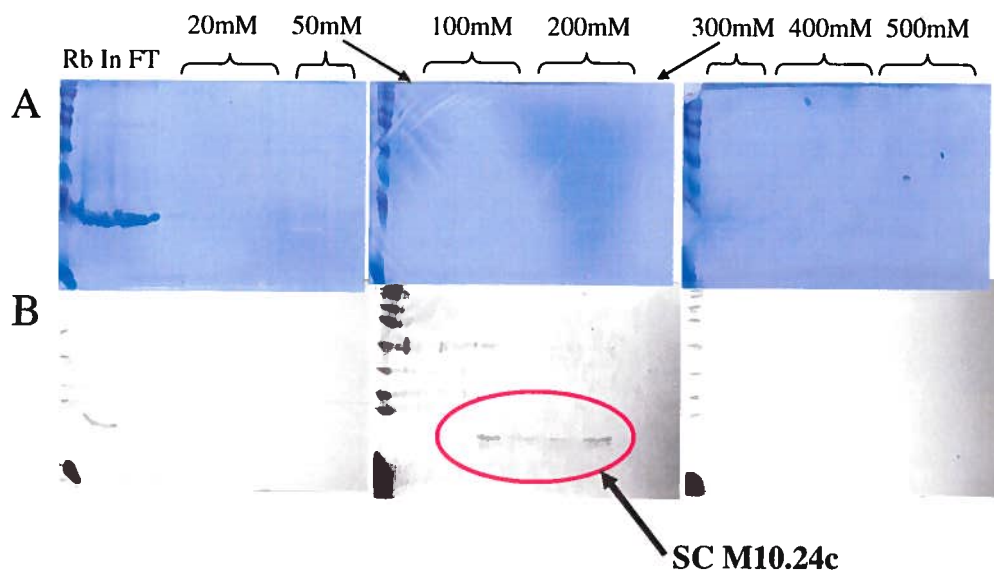


Figure 35 : Gels SDS-PAGE (A) et immunobuvardage (B) correspondant à la migration des protéines recueillies pour chaque fraction suite au premier passage sur colonne Histrap des protéines intracellulaires produites par le clone contenant le gène correspondant à la protéine SC M10.24c : Rb, marqueur moléculaire Rainbow; In, initial, FT, flowthrough.

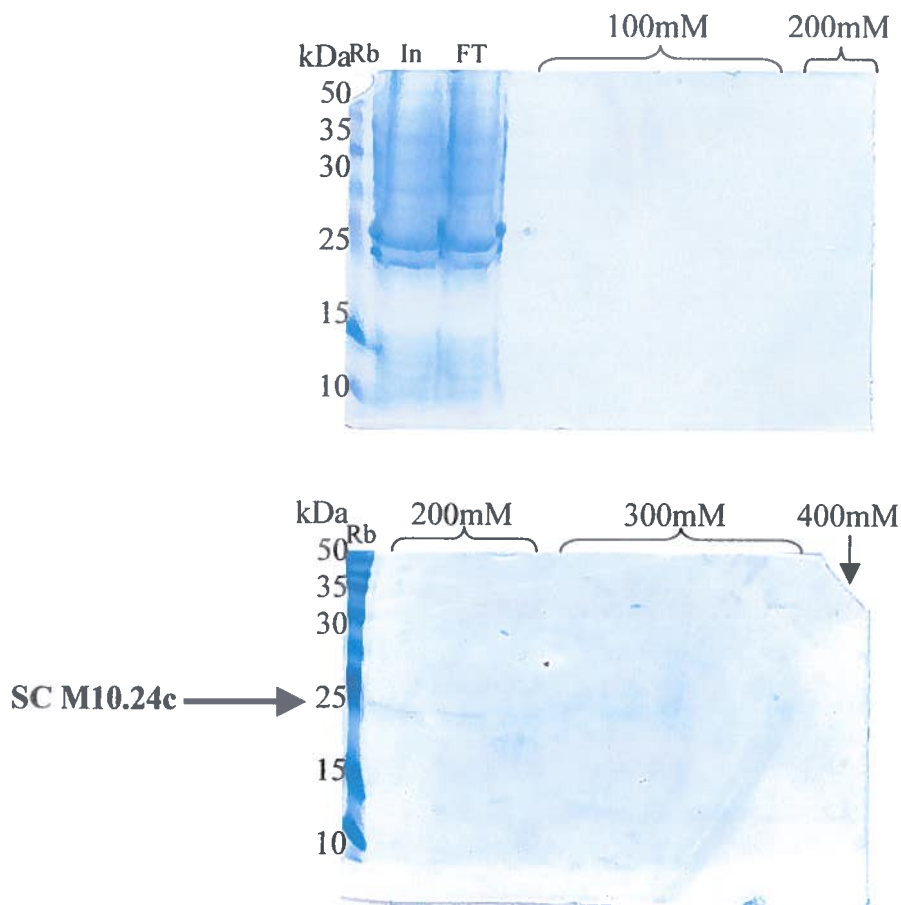


Figure 36 : Gels SDS-PAGE correspondant à la migration des protéines recueillies pour chaque fraction suite au deuxième passage sur colonne Histrap des protéines intracellulaires produites par le clone contenant le gène correspondant à la protéine SC M10.24c : Rb, marqueur moléculaire Rainbow; In, initial; FT, flowthrough.

3.4 CARACTÉRISATION

3.4.1 Protéine SC H35.12c

Des tests enzymatiques ont été effectués tels que décrit dans la section 2.5.5 pour vérifier si la protéine avait une activité déacétylase. Les substrats DP6.4, DP7.4 et chitosane, tous trois étant acétylés à 20%, ont été testés, mais aucune activité n'a été observée. Des tests préliminaires sur un oligomère de chitine, le DP6 (hexa-*N*-acétylchitohexaose), ont été réalisés et une activité de déacétylation comparable à celle de l'acétylxylane estérase de *S. lividanas* a été observée (voir tableau VIII).

Tableau VIII : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par les enzymes SC H35.12c et AxeA sur le DP6 à une température de 50°C pendant 24h.

Enzymes	Tampon	pH	Quantité d'acétate libérée (nmole)
SC H35.12c	Tampon phosphate de sodium	7,0	0,391
	Tris-HCl	7,0	0,325
		7,5	0,440
		8,0	0,529
AxeA		7,5	0,556

Ensuite, d'autres tests ont été effectués en utilisant ce substrat pour déterminer les meilleures conditions de pH et de température pour cette réaction. Pour déterminer le pH optimum, la réaction a été réalisée à une température de 50°C dans les tampons suivants : glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9). Une fois le pH optimum déterminé, des tests faisant varier la température de 30 à 60°C par tranche de 10°C ont été réalisés à ce pH. Les résultats sont montrés à la page suivante aux figures 37 et 38.

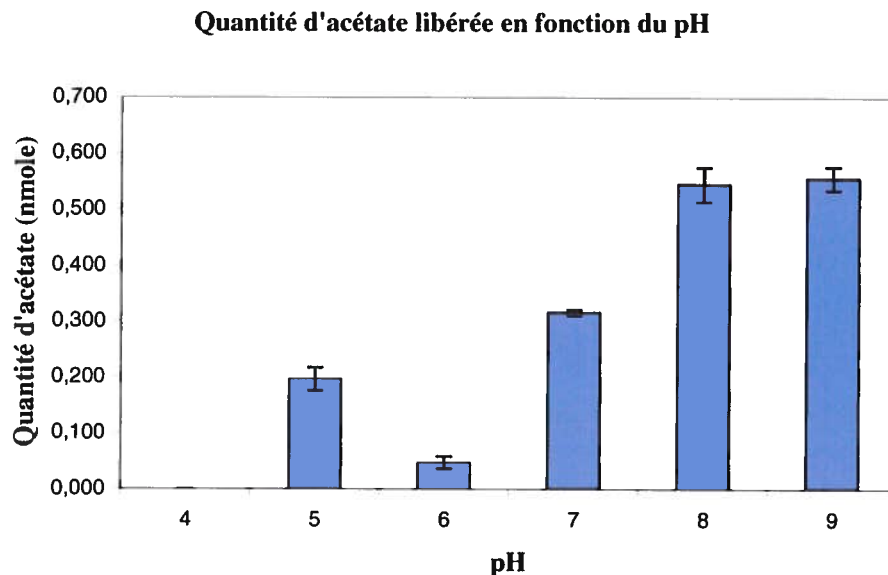


Figure 37 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9).

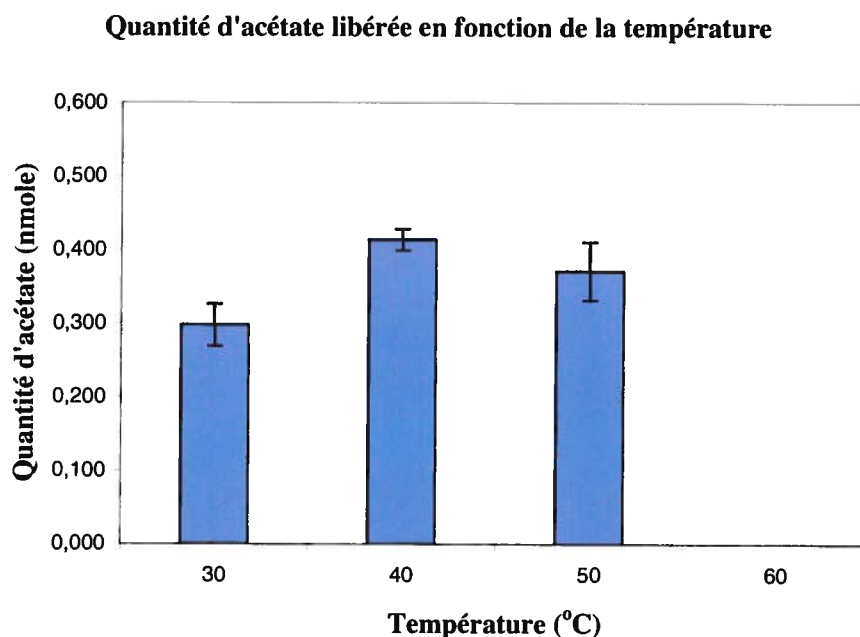


Figure 38 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 effectuée pendant 24h dans le tampon Tris-HCl à un pH de 9,0 à 30, 40, 50 et 60°C.

D'autres tests ont été effectués avec cette protéine aux pH et température optimaux à différents intervalles de temps pour vérifier si la réaction était complétée en deçà de 24h. La réaction a donc été arrêtée après 4, 8, 16 et 24h. Les résultats sont illustrés à la figure 39. Par la suite, le phénomène inverse a aussi été vérifié, c'est-à-dire si la réaction continuait après 24h. La réaction a donc été arrêtée après 24 et 48h. La quantité d'acétate libérée après 48h en comparaison avec celle libérée après 24h a presque doublé, passant de 0,441 à 0,643nmol.

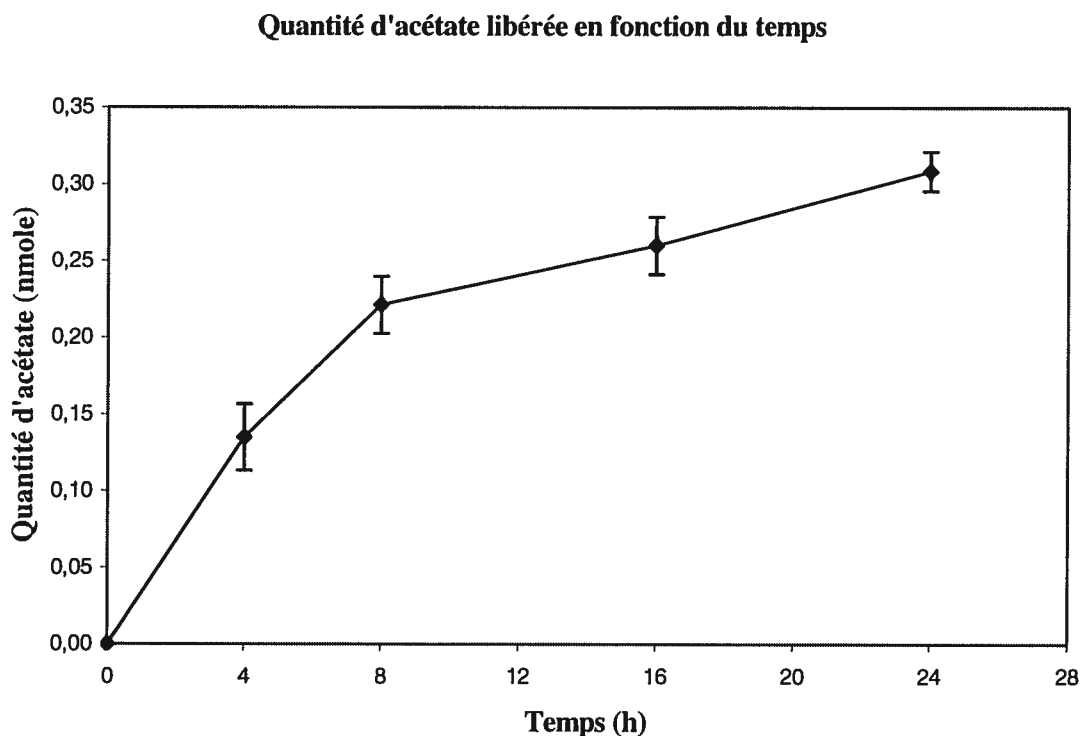


Figure 39 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée après différents intervalles de temps dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC H35.12c et le substrat DP6 dans le tampon Tris-HCl à un pH de 9 à une température de 40°C.

Tableau IX : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC H35.12c (et AxeA au bas du tableau) sur le DP6 pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.

Tampon	pH	Température (°C)	Qté acétate (nmole)	% déacétylation
Tests préliminaires :				
Phosphate de sodium	7,0	50	0,391	7,94
Tris-HCl	7,0	50	0,325	6,60
Tris-HCl	7,5	50	0,440	8,94
Tris-HCl	8,0	50	0,529	10,75
Test pour déterminer le pH optimal :				
Glutamate	4,0	50	0,000	0,00
Glutamate	5,0	50	0,196	3,98
Phosphate de sodium	6,0	50	0,047	0,96
Phosphate de sodium	7,0	50	0,316	6,43
Tris-HCl	8,0	50	0,545	11,08
Tris-HCl	9,0	50	0,556	11,31
Test pour déterminer la température optimale :				
Tris-HCl	9,0	30	0,298	6,05
Tris-HCl	9,0	40	0,414	8,41
Tris-HCl	9,0	50	0,378	7,54
Tris-HCl	9,0	60	0,000	0,00
Test sur l'AxeA :				
Tris-HCl	7,5	50	0,556	11,30

3.4.2 Protéine SC D95A.17c

Des tests enzymatiques impliquant la protéine SC D95A.17c ont été réalisés sur le substrat DP6 à des pH près de la neutralité et à une température de 50°C durant 24h, mais aucune activité de déacétylation significative n'a été observée. La protéine a par la suite été testée de la même façon sur le substrat *N*-acétyl-D-glucosamine et une activité de déacétylation très faible, mais significative, a été observée. Les résultats sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC D95A.17c sur le *N*-acétyl-D-glucosamine à une température de 50°C pendant 24h.

Enzyme	Tampon	pH	Quantité d'acétate (nmole)
SC D95A.17c	Tampon phosphate de sodium Tris-HCl	7,0	0,035
		7,0	0,048
		7,5	0,064
		8,0	0,058

De la même manière que pour la protéine SC H35.12c, des tests ont été réalisés pour déterminer le pH optimum de la protéine SC D95A.17c en faisant varier le pH entre 4 et 9 à une température de 50°C pour une durée de 24h. Les résultats sont illustrés à la figure 40. La protéine semble avoir deux pH optimaux, soit 5 et 9. Des réactions enzymatiques ont été réalisées à différentes températures à ces deux pH pour déterminer la température et le pH donnant les meilleurs résultats (se référer à la figure 41). On remarque une forte diminution de la quantité d'acétate libérée; il est possible que l'enzyme ait perdu un peu de son activité et efficacité dans le temps, suite aux manipulations (ex. congélation, décongélation, etc.). Tout comme la protéine SC H35.12c, la réaction a été réalisée en différents temps, 4h, 8h, 16h, 24h et 48h (figure 42).

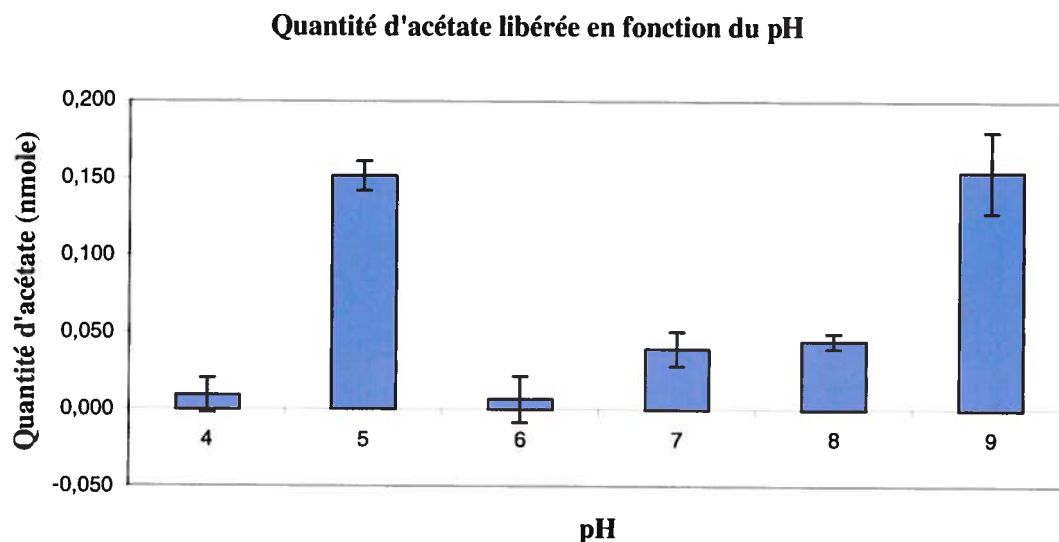


Figure 40 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC D95A.17c et le substrat *N*-acétyl-D-glucosamine effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9).

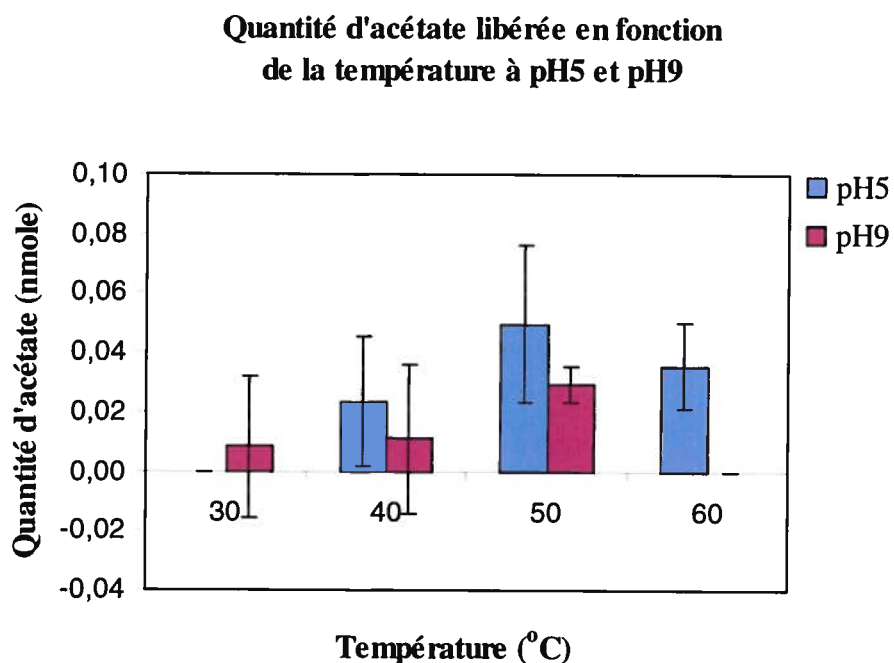


Figure 41 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température à pH5 (tampon glutamate) et pH9 (tampon Tris-HCl) suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC D95A.17c sur le *N*-acétyl-D-glucosamine.

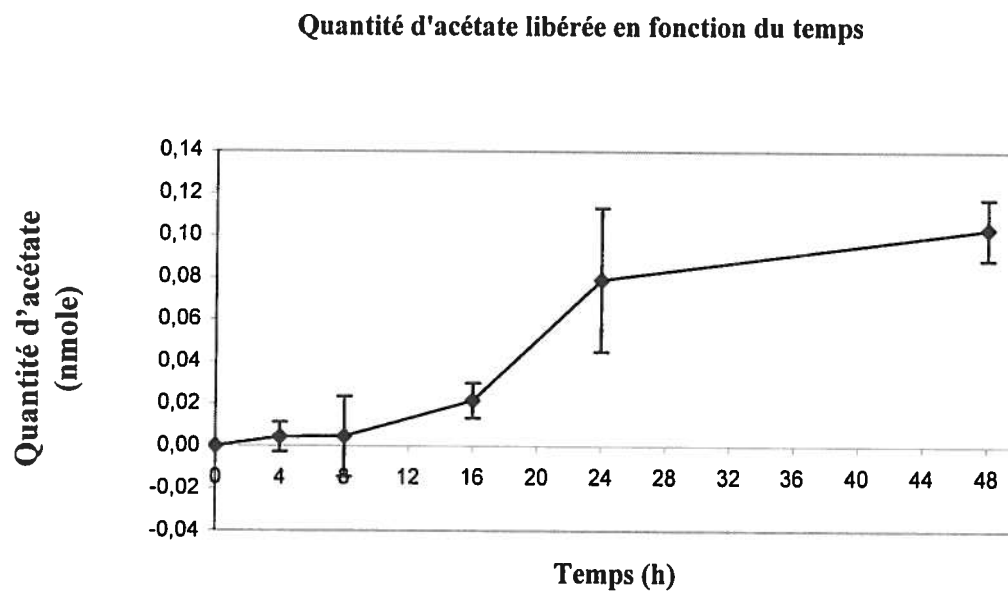


Figure 42 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée après différents intervalles de temps dans la réaction enzymatique impliquant la protéine SC D95A.17c et le substrat *N*-acétyl-D-glucosamine dans le tampon glutamate à un pH de 5 à une température de 50°C.

Tableau XI : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC D95A.17c sur le *N*-acétyl-D-glucosamine pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.

Tampon	pH	Température (°C)	Qté acétate (nmole)	% déacétylation
Tests préliminaires :				
Phosphate de sodium	7,0	50	0,035	0,78
Tris-HCl	7,0	50	0,048	1,06
Tris-HCl	7,5	50	0,064	1,42
Tris-HCl	8,0	50	0,058	1,29
Test pour déterminer le pH optimal :				
Glutamate	4,0	50	0,009	0,20
Glutamate	5,0	50	0,151	3,35
Phosphate de sodium	6,0	50	0,007	0,15
Phosphate de sodium	7,0	50	0,039	0,87
Tris-HCl	8,0	50	0,044	0,98
Tris-HCl	9,0	50	0,154	3,40
Test pour déterminer la température optimale :				
Glutamate	5,0	30	0,000	0,00
Glutamate	5,0	40	0,024	0,52
Glutamate	5,0	50	0,050	1,10
Glutamate	5,0	60	0,036	0,79
Tris-HCl	9,0	30	0,008	0,18
Tris-HCl	9,0	40	0,011	0,25
Tris-HCl	9,0	50	0,029	0,65
Tris-HCl	9,0	60	0,000	0,00

3.4.3 Protéine SC M10.24c

Des tests enzymatiques impliquant la protéine SC M10.24c ont été réalisés sur le substrat DP6 à des pH près de la neutralité et à une température de 50°C durant 24h. Une activité très faible a été observée (se référer au tableau XII).

Tableau XII : Quantité d'acétate libérée suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC M10.24c sur le DP6 à une température de 50°C pendant 24h.

Enzyme	Tampon	pH	Quantité d'acétate (nmole)
SC M10.24c	Tampon phosphate de sodium Tris-HCl	7,0	0,005
		7,0	0,026
		7,5	0,016
		8,0	0,000

D'autres tests ont été effectués sur le DP6 pour déterminer le pH et la température optimaux de la réaction. Comme pour les autres protéines, ils ont été faits en faisant varier le pH entre 4 et 9, et la température entre 30 et 60°C. Les résultats sont illustrés aux figures 43 et 44. Étant donné que les quantités d'acétate libérée sont extrêmement faibles, les résultats comportent beaucoup de variabilité (se référer au tableau résumé XIII) et sont peu concluants. On peut toutefois affirmer qu'il y a quand même une activité de déacétylation, mais très faible.

**Quantité d'acétate libérée
en fonction du pH**

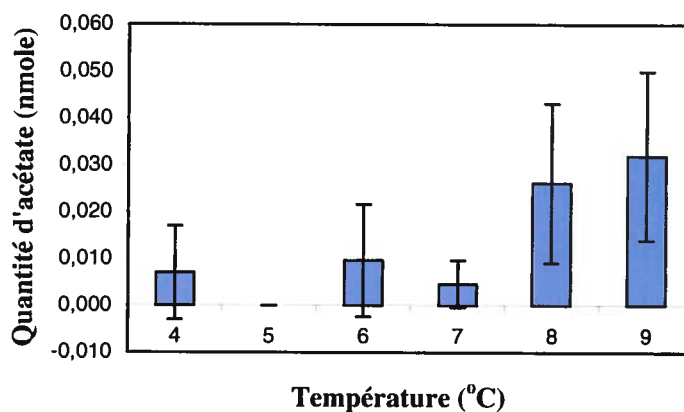


Figure 43 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction du pH suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC M10.24c sur le substrat DP6 effectuée pendant 24h à 50°C dans les tampons glutamate (pH 4 et 5), phosphate de sodium (pH 6 et 7) et Tris-HCl (pH 8 et 9).

**Quantité d'acétate libérée
en fonction de la température**

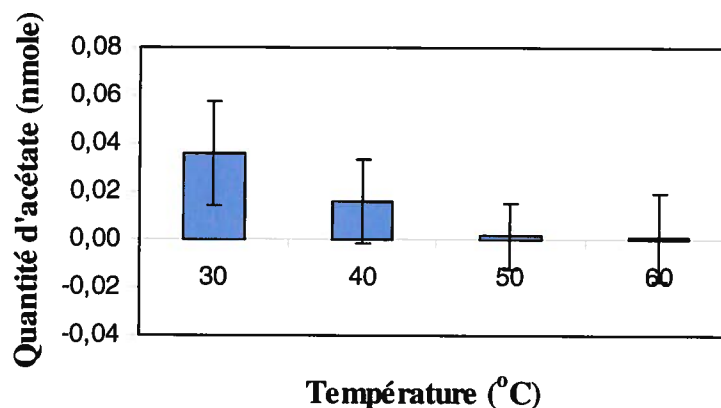


Figure 44 : Graphique représentant la quantité d'acétate libérée en fonction de la température suite à la réaction enzymatique produite par la protéine SC M10.24c sur le substrat DP6 à pH9 pendant 24h dans le tampon Tris-HCl.

Tableau XIII : Quantité d'acétate libérée et % de déacétylation du polymère suite aux réactions enzymatiques effectuées par l'enzyme SC M10.24c sur le DP6 pendant 24h à différentes températures, avec différents tampons et à différents pH.

Tampon	pH	Température (°C)	Qté acétate (nmole)	% déacétylation
Tests préliminaires :				
Phosphate de sodium	7,0	50	0,005	0,09
Tris-HCl	7,0	50	0,026	0,53
Tris-HCl	7,5	50	0,016	0,32
Tris-HCl	8,0	50	0,000	0,00
Test pour déterminer le pH optimal :				
Glutamate	4,0	50	0,007	0,14
Glutamate	5,0	50	0,000	0,00
Phosphate de sodium	6,0	50	0,010	0,20
Phosphate de sodium	7,0	50	0,005	0,09
Tris-HCl	8,0	50	0,026	0,53
Tris-HCl	9,0	50	0,032	0,65
Test pour déterminer la température optimale :				
Tris-HCl	9,0	30	0,036	0,73
Tris-HCl	9,0	40	0,016	0,32
Tris-HCl	9,0	50	0,001	0,03
Tris-HCl	9,0	60	0,001	0,01

4. DISCUSSION

4.1 CLONAGE

Le clonage des gènes a été effectué tel que décrit dans la section 2.5.1. La vérification de la séquence des gènes par séquençage a permis de confirmer l'authenticité de la plupart des séquences de gènes. Cependant, il s'est glissé quelques erreurs, notamment, le gène SC C61A.31 s'est avéré être un artefact de PCR (région amplifiée ne correspondant pas au gène attendu). La synthèse de nouvelles amorces plus spécifiques (un peu plus longues) a dû être faite et le clonage a été repris avec succès. Des erreurs dans la séquence des gènes SC 2G38.22, SC M10.24c (avec queue de polyhistidine) et D95A.17c (avec queue de polyhistidine) ont été observées suite au séquençage. L'amplification de ces gènes a donc été reprise avec de nouvelles amorces (car les erreurs se trouvaient au niveau de ces dernières) et le clonage a été réalisé avec succès.

4.2 EXPRESSION ET IDENTIFICATION DES PROTÉINES

4.2.1 Protéine SC H35.12c

Suite à la vérification du clonage des gènes, les protéines ont été exprimées. Parmi celles-ci, une première a été identifiée, soit la protéine SC H35.12c. Une protéine extracellulaire a d'abord été observée aux alentours de 31kDa, ce qui est relativement près du poids moléculaire attendu de la protéine qui est de 23,8kDa, compte tenu du degré de précision moyen de ces gels (voir figure 19). L'analyse par spectrométrie de masse de cette protéine a permis de confirmer l'identité de SC H35.12c grâce à l'identification de nombreux peptides appartenant à cette protéine (voir figures 21 et 22). Des peptides dans la partie C-terminal de la protéine ont été identifiés. Le fait de retrouver cette protéine au niveau de la portion extracellulaire confirme le fait qu'elle est sécrétée et non intracellulaire comme il avait été prévu au départ lors du séquençage du génome, tel qu'expliqué dans la section 1.2.8.1 de la revue de littérature).

Suite aux résultats de spectrométrie de masse, il s'est avéré que les autres protéines observées correspondaient aussi à la protéine SC H35.12c. Ces dernières peuvent être des formes tronquées de la protéine. En effet, elles possèdent des peptides correspondant et sont de poids moléculaire inférieur à la protéine à l'étude (voir figure 19). Il est probable que ces formes tronquées de la protéine aient été obtenues suite à l'action de protéases. La bactérie *Streptomyces lividans* utilisée ici pour exprimer la protéine sécrète de bas niveaux de protéases, ce qui est d'ailleurs l'un des avantages de ce microorganisme faisant de lui un bon système d'expression (Gusek et Kinsella, 1992). Cependant, il se peut que les quantités de protéases aient été suffisamment élevées permettant ainsi la dégradation partielle de la protéine et l'apparition de formes tronquées.

4.2.2 Protéine SC D95A.17c

Une deuxième protéine a été exprimée et identifiée, soit la protéine SC D95A.17c. Comme cette dernière ne possède pas de peptide signal, il était prévu qu'elle ne soit pas sécrétée. Une protéine intracellulaire a été observée aux alentours de 40kDa, ce qui était très près du poids moléculaire attendu de la protéine, soit de 39,6kDa (voir figure 23). L'analyse par spectrométrie de masse a permis de confirmer que cette protéine était bien SC D95A.17c, grâce à l'identification de trois peptides appartenant à cette protéine (voir figures 25 et 26). Une autre protéine a été observée aux alentours de 37kDa (qui était près aussi du poids moléculaire attendu). Il s'est avéré qu'aucun peptide correspondant à la protéine SC D95A.17c n'a pu être identifié, ce qui permet de confirmer que cette protéine n'est pas la protéine à l'étude.

Pour faciliter la purification de la protéine, le clonage du gène de cette protéine a été repris en ajoutant une séquence codant pour une queue de polyhistidine et une séquence de clivage IEGR entre la queue et le début de la protéine. L'utilisation du facteur Xa, spécifique à cette séquence, permet ensuite de cliver à cet endroit pour ôter la queue de polyhistidine. Le clonage a été réalisé et vérifié et la protéine a été exprimée. Cette dernière a été observée sur gel SDS-PAGE à un poids moléculaire d'environ

40kDa. Sa présence a été détectée suite à la réalisation d'un immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps spécifiques à la queue de polyhistidine (voir figure 27).

4.2.3 Protéine SC M10.24c

Finalement, une troisième enzyme a été identifiée, soit SC M10.24c. Une protéine intracellulaire a été d'abord observée aux alentours de 21kDa, ce qui est très près du poids moléculaire attendu de 22,8kDa (figure 28). Notons que cette protéine ne possédait pas de peptide signal, et qu'elle était par le fait même attendue au niveau de l'intracellulaire. Pour faciliter la purification de cette protéine, comme dans le cas de la protéine SC D95A.17c, le clonage a été repris cette fois en ajoutant, en 5' du gène, une portion codant pour une queue de polyhistidine. Dans ce cas aussi, une séquence codant pour le site de clivage IEGR a été ajoutée entre le début de la protéine et la queue pour éventuellement ôter cette étiquette de polyhistidine. La protéine a ensuite été exprimée, suite au clonage et à la vérification de la séquence du gène. Une protéine a été observée aux alentours de 21kDa suite à la migration des protéines intracellulaires sur gel SDS-PAGE. Comme dans le cas de la protéine SC D95A.17c, la protéine a été détectée par la réalisation d'un immunobuvardage, ce qui a permis de confirmer de façon absolue l'expression de la protéine (figure 29).

4.3 PURIFICATION DES PROTÉINES

4.3.1 Protéine SC H35.12c

L'utilisation du logiciel Clone Manager a permis d'estimer le point isoélectrique de la protéine à 5,38. Pour l'utilisation d'une colonne échangeuses de cations, la protéine doit être chargée positivement, et l'utilisation de tampon au pH inférieur (pH5,0) permet ainsi de travailler dans ces conditions. Cependant, cette technique ne permettait pas de

séparer toutes les protéines ni celles de poids moléculaire très rapproché à celui de la protéine à l'étude qui représentaient les autres formes de la protéine (identifiées par spectrométrie de masse, voir précédemment dans la discussion). En effet, logiquement, si ces protéines sont des formes tronquées de la protéine à l'étude, elles devraient avoir un poids moléculaire inférieur. Si tel est le cas, les points isoélectriques de chacune de ces formes peuvent être légèrement différents, étant donné qu'ils correspondent à la somme des charges retrouvées sur la protéine. L'élution de la protéine en faisant un gradient de sel très lent et en récupérant de nombreuses fractions permettrait peut-être de séparer ces formes de la protéine SC H35.12c, même si elles ont un pI très rapproché. L'utilisation de la technique de HPLC avec colonne échangeuse de cations était appropriée et a en effet permis de séparer la protéine des autres formes tronquées de cette dernière (se référer à la figure 30).

Cependant, étant donné que d'autres protéines ont accroché à la colonne en même temps que la protéine à l'étude une étape supplémentaire de purification était requise. La purification par tamis moléculaire était une technique appropriée pour séparer les protéines restantes cette fois selon leur poids moléculaire. Les protéines purifiées suite à trois expériences de passage sur colonne cationique ont été mises ensemble pour avoir le plus de protéines possible. Le passage sur tamis moléculaire a permis d'observer quatre pics correspondant à quatre sorties de protéines (se référer à la figure 31). L'analyse par gels SDS-PAGE a permis de visualiser les protéines correspondant à chaque pic. Aucune protéine n'est observée pour les pics 1 et 4, ce qui signifie que les protéines étaient probablement en quantité trop faible. Pour ce qui est des pics 2 et 3, des protéines de poids moléculaire supérieur à celles du pic 3 sont observées, ce qui est normal, étant donné que les protéines de poids moléculaire plus élevé sortent avant les plus petites du tamis moléculaire. La protéine correspondant au pic 3 semble être la protéine à l'étude étant donné qu'elle a été observée au poids moléculaire attendu de 23,8kDa. L'identité de la protéine a pu être confirmée suite à une analyse par spectrométrie de masse (figure 33).

4.3.2 Protéine SC D95A.17c

La protéine SC S95A.17c possédait une queue de polyhistidine et a été purifiée à l'aide d'une colonne Histrap qui était appropriée pour la purification de protéines possédant ce genre d'étiquette. L'utilisation d'urée dans le tampon de départ avait pour but de dénaturer la protéine de façon temporaire pour éviter que la queue de polyhistidine soit séquestrée à l'intérieur de la protéine. L'étape de lavage a permis ensuite d'éliminer graduellement et complètement l'urée, ce qui permet à la protéine de reprendre sa forme. L'analyse des différentes fractions obtenues à l'aide de gels SDS-PAGE a permis d'observer une protéine au bon poids moléculaire à partir de la fraction 3 de l'élution à 100mM d'imidazole (se référer à la figure 34). Un immunobuvardage de type Western (avec anticorps spécifiques à la queue de polyhistidine) a permis de confirmer la présence de cette protéine (résultats non illustrés en raison de leur mauvaise qualité).

4.3.3 Protéine SC M10.24c

La protéine SC M10.24c, tout comme la protéine SC D95A.17c, possédait une queue de polyhistidine et a été purifiée à l'aide d'une colonne Histrap. L'utilisation d'urée à de plus fortes concentrations que pour la protéine précédente dans le tampon de départ était nécessaire. En effet, lors de tests préliminaires, la protéine n'accrochait pas à la colonne s'il n'y avait pas ou peu d'urée (4M) dans le tampon de départ (résultats non illustrés). À 8M d'urée, la protéine accrochait, ce qui signifie que la queue de polyhistidine était séquestrée à l'intérieur de la protéine et ainsi n'était pas accessible pour le nickel dans la colonne Histrap. Même avec de fortes concentrations d'urée dans le tampon de départ, de très faibles quantités de protéines ont pu être purifiées. C'est pour cette raison que des fractions de deux différentes expériences ont dû être mises ensemble pour obtenir une quantité de protéines suffisante pour effectuer les tests enzymatiques (se référer aux figures 35 et 36). Suite à la concentration de ce pool, une concentration de protéines de 0,097mg/mL a été obtenue pour un total de 0.145mg.

4.4 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES

4.4.1 Protéine SC H35.12c

Le gène correspondant à cette protéine codait au départ pour une hydrolase présomptive, ce qui donnait peu d'information sur le substrat sur lequel la protéine pouvait agir. Cependant, la séquence de la protéine SC H35.12c démontre une certaine homologie non négligeable avec celle de l'AxeA de *Streptomyces lividans*, soit de 33% (selon NCBI), ce qui porte à croire qu'elle pourrait se comporter comme cette enzyme au niveau de la déacétylation. Des tests préliminaires avec le chitosane (80% déacétylé), le DP6.4 et le DP7.4, ont été faits et aucune activité de déacétylation n'a été observée. Par ailleurs, une activité enzymatique comparable à celle de l'AxeA a été observée lorsque testée sur le DP6 (voir tableau VIII). Le DP6 ou hexa-*N*-acétylchitohexaose, en comparaison avec les autres substrats testés qui sont acétylés à 20%, est un oligomère de chitine complètement acétylé (100%). L'enzyme semble donc être plus productive sur un substrat chitineux complètement acétylé. Le test suivant a permis de déterminer le pH optimal de la réaction qui s'est avéré être 9. Le choix entre les pH 8 et 9 n'était pas évident, mais étant donné que les valeurs obtenues pour le pH 8 ont démontré une plus grande variabilité que celles pour le pH 9 (qui étaient aussi plus élevées), c'est le pH 9 qui a été retenu comme optimal. La meilleure activité a été observée à une température de 40°C (figures 37 et 38). Les valeurs obtenues lors de ce test sont inférieures à celles obtenues lors du test du pH optimal (se référer au tableau IX) et ce, même pour des conditions identiques (ex. 50°C à pH 9). La température 40°C à pH 9 a quand même été retenue étant donné qu'elle a donné de meilleurs résultats qu'à 50°C pour cette expérience (mêmes conditions, échantillons effectués en même temps; certains facteurs auraient pu influencer le résultat, comme le fait que l'activité et l'efficacité de l'enzyme ont pu diminuer dans le temps, dû aux manipulations de laboratoire).

Les tests étaient basés sur ce qui avait déjà été fait pour tester l'activité de déacétylation de l'AxeA. Comme la réaction enzymatique était arrêtée après 24h, il n'était pas possible de savoir si la réaction terminait en deçà de ce délai. C'est pourquoi des tests ont été réalisés en arrêtant la réaction à différents temps. La figure 39 permet d'observer que la quantité d'acétate libérée par la réaction augmente continuellement au

cours du temps; elle semble augmenter plus rapidement dans les premières 4h, et par la suite elle augmente de façon graduelle. Pour vérifier si la réaction continuait pour une durée supérieure à 24h, des tests comparant une réaction arrêtée après 24h et une autre après 48h ont été réalisés. La quantité d'acétate libérée passe de 0,441 à 0,643nmol. La réaction de déacétylation du DP6 par l'enzyme SC H35.12c est donc une réaction très lente durant au moins 48h, pouvant probablement durer plusieurs jours.

Si on compare les résultats obtenus pour cette protéine avec les autres déacétylases connues, on note que la température optimale de SC H35.12c (40°C) est légèrement inférieure à celle des autres déacétylases (50°C) (pour les comparaisons avec les autres déacétylases, se référer au tableau I, résultats tirés de Tsigos *et al.*, 2000). Cependant, selon la figure 37, les résultats à 40°C et 50°C sont tout de même assez rapprochés. La protéine SC H35.12c semble donc se comporter presque comme les autres déacétylases connues en ce qui a trait à la température d'action. Elle a une masse moléculaire de 23,8kDa, valeur comparable à celle de la déacétylase provenant d'*Aspergillus nidulans* (27kDa) (Alfonso *et al.*, 1995) et de l'une retrouvée chez *Collitotrichum lindemuthianum* (ATCC 56676) (24kDa) (Tsigos et Bouriotis, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996). Les autres déacétylases connues ont une masse moléculaire beaucoup plus élevée, allant de 75 à 150kDa. En ce qui concerne le point isoélectrique, celui de la protéine SC H35.12c (5.38) semble plus élevé que celui des autres déacétylases qui varie autour de 2,75, 3 et entre 3 et 5. L'expression de la protéine SC H35.12c est extracellulaire, tout comme les déacétylases retrouvées chez *C. lindemuthianum* (Tsigos et Bouriotis, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996) et *A. nidulans* (Alfonso *et al.*, 1995) Le pH optimum de la protéine à l'étude (pH 9) semble comparable à ceux observés chez les déacétylases de ces deux derniers organismes variant de 7 à 11,5.

4.4.2 Protéine SC D95A.17c

La protéine SC D95A.17c comporte moins d'homologie avec l'AxeA de *S. lividans* que les deux autres protéines à l'étude, soit d'environ 14% (selon le logiciel Clone Manager), ce qui laisse présumer qu'elle n'agira peut-être pas sur les mêmes

substrats. Cette enzyme a été testée sur le DP6, mais n'a démontré aucune activité de déacétylation. Selon sa séquence, le gène coderait pour une déacétylase présomptive de *N*-acétyl-D-glucosamine-6-phosphate. Comme aucun résultat de déacétylation sur l'oligomère de chitine DP6 n'avait été observé, des tests ont été effectués sur un substrat plus court, le *N*-acétyl-D-glucosamine (monomère de chitine), ce qui ressemblait plus au présumé substrat de la protéine. Une activité faible, mais concluante, a été observée sur ce substrat (tableau IX). D'autres tests ont ensuite permis de démontrer que le pH optimal de la réaction était de 5 (figures 40). Cependant, il semblait se trouver deux pH optimaux (5 et 9). Cela peut être expliqué par le fait que la réaction de détection est effectuée à pH 8,4 (pH de la solution de tampon), et qu'il est recommandé d'ajuster le pH de l'échantillon à cette valeur avant le test de détection. Mais, comme les tests sont effectués avec de petites quantités d'échantillon et de solutions (pour permettre la lecture en plaques 96 puits), il était très difficile d'ajuster le pH de l'échantillon. Celui-ci (en tampon sodium-phosphate 0,02mM, Imidazole 100-200mM, pH≈6) pourrait donc influencer le pH du mélange obtenu pour la détection qui doit être de 8,4. Cela pourrait expliquer pourquoi les quantités d'acétate libérées semblent diminuer à mesure que le pH de l'échantillon diminue. Pour déterminer les meilleures conditions pour la réaction enzymatique effectuée par la protéine SC D95A.17c, la réaction a été effectuée à pH 5 et 9 à différentes températures. Les meilleurs résultats ont été obtenus à pH 5 et à 50°C (se référer à la figure 41). Comme dans le cas de la protéine SC H35.12c, les quantités d'acétate libérée semblent diminuer, et ce pour des conditions d'expérience identiques (ex. pH 9, 50°C, se référer au tableau XI). Il est probable que l'enzyme ait vu son activité diminuer dans le temps, car cette expérience a été effectuée suite à la précédente. Tout comme pour la protéine SC H35.12c, des tests enzymatiques ont été réalisés et arrêtés à différents temps pour vérifier si la réaction se terminait en deçà ou au-delà de 24h. Les résultats sont très semblables à ceux obtenus chez la protéine SC H35.12c, ce qui signifie que la réaction est très lente et continue probablement durant plusieurs jours (figure 42).

La protéine SC D95A.17c se comporte comme toutes les autres déacétylases connues en ce qui a trait à sa température optimale (50°C) (Tsigos *et al.*, 2000). Le pH optimum de cette enzyme est de 5,0, ce qui est très semblable aux résultats obtenus chez les déacétylases de *M. rouxii* (4,5) et *A. coerulea* (5,0). Son point isoélectrique (4,88) est

un peu plus élevé que la moyenne de ceux des autres déacétylases connues (≈ 3). Une caractéristique importante différencie cette enzyme des autres déacétylases connues : elle est exprimée dans la portion intracellulaire. Les autres déacétylases sont généralement extracellulaires. Par exemple, le pathogène de plante *Collitotrichum lindemuthianum* produit des déacétylases extracellulaires qui agissent sur des oligomères de chitine. Ces derniers font partie des mécanismes de défense de la plante, mais pas lorsqu'ils sont sous forme déacétylée (Kauss, 1989). Chez les zygomycètes en général, on retrouve de la chitine et du chitosane dans leur paroi cellulaire. Les déacétylases de chitine ont un rôle à jouer au niveau de la croissance de ces champignons et de la formation de chitosane dans la paroi. Chez *Mucor rouxii* (Araki et Ito, 1975; Martinou *et al.*, 1993; Katetzopoulos *et al.*, 1993) et *Absidia coerulea* (Gao *et al.*, 1995), deux zygomycètes, on retrouve effectivement leurs déacétylases au niveau du périplasme. Le fait que la protéine SC D95A.17c soit au niveau intracellulaire laisse présumer qu'elle agira sur de petites molécules de chitine, étant donné que ces dernières doivent se trouver à l'intérieur de la cellule. Ceci expliquerait le fait que l'enzyme SC D95A.17c a fonctionné sur le monomère de chitine et non sur le DP6 qui est l'hexamère et par le fait même plus gros.

4.4.3 Protéine SC M10.24c

Le gène correspondant à cette protéine codait au départ pour une déacétylase d'oligosaccharides présomptive. Sa séquence en acides aminés ressemble à 36% (selon NCBI) à celle de l'AxeA, ce qui pourrait signifier qu'elle agirait sur les mêmes substrats que celle-ci. La protéine a été testée sur le substrat DP6 et a démontré une très faible activité de déacétylation (se référer au tableau XII). D'autres tests ont permis de déterminer que le pH optimal de la réaction est 9 et que la température optimale est de 30°C (figures 43 et 44). Tout comme pour les enzymes SC H35.12c et SC D95A,17c, les valeurs d'acétate libérée par la réaction semblent diminuer dans le temps et ce, même pour des expériences faites dans des conditions identiques (se référer au tableau XIII). L'activité de l'enzyme pourrait donc avoir diminué dans le temps suite aux manipulations de laboratoire. Des tests aux conditions optimales ont été faits et arrêtés à différents

temps pour suivre la réaction dans le temps, comme dans le cas des autres protéines étudiées. Cependant, les quantités d'acétate libérée sont tellement faibles qu'il est difficile d'obtenir des résultats concluants, en raison de la trop grande variabilité à d'aussi petites valeurs.

Si on compare la protéine SC M10.24c aux autres déacétylases connues, on remarque qu'elle a une température optimale (30°C) beaucoup plus basse que celle des autres (50°C) (Tsigos *et al.*, 2000). Son pH optimum (pH 9) est semblable à celui des déacétylases retrouvées chez *A. nidulans* (Alfonso *et al.*, 1995) et *C. lindemuthianum* (entre pH7 et pH11.5) (Tsigos et Bouriotis, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996). Son point isoélectrique (6,72) est cependant plus élevé que celui des autres déacétylases connues. Sa masse moléculaire (22,8kDa) se rapproche des déacétylases retrouvées chez *A. nidulans* (27kDa) et *C. lindemuthianum* ATCC 56676 (24kDa) (Tsigos *et al.*, 2000). Tout comme la protéine SC D95A.17c, l'enzyme SC M10.24c se retrouve au niveau intracellulaire, ce qui la différencie beaucoup des autres déacétylases connues. Contrairement à la protéine SC D95A.17c, elle a fonctionné sur le DP6, mais très faiblement.

Il est probable que le substrat testé ne corresponde pas au véritable substrat de cette protéine, ce qui expliquerait les aussi petites quantités d'acétate obtenues lors des tests enzymatiques. Il faudrait éventuellement la tester sur d'autres substrats, en commençant par le monomère de chitine, pour vérifier si elle se comporte comme la protéine SC D95A.17c.

4.5 PERSPECTIVES

Les trois protéines purifiées ont été testées sur quelques substrats, mais nous ne savons pas si ce sont les substrats véritables de chacune d'elles, surtout dans le cas des protéines SC D95A.17c et SC M10.24c qui ont donné des niveaux de déacétylation plus faibles. Il faudrait donc éventuellement tester d'autres substrats pour évaluer si les résultats de déacétylation seraient meilleurs. Il faudrait logiquement se tourner vers des substrats qui se retrouvent dans l'habitat naturel de la bactérie d'origine, *S. coelicolor*, soit dans le sol. Une autre façon de connaître leur véritable substrat serait d'étudier à quel moment sont exprimés ces gènes (et aussi les autres gènes dont les protéines n'ont pas été observées) chez la bactérie d'origine. Il faudrait par conséquent faire croître la bactérie en présence de composés retrouvés dans son habitat naturel, d'extraits de terre, d'extraits de champignons, etc. Ensuite, une extraction d'ARN suivi d'une transcription inverse permettrait de savoir si les gènes sont exprimés et dans quelles conditions. Des études de microarrays pourraient aussi s'avérer utiles, en testant différentes conditions, différents substrats ou composition du milieu, et en évaluant à quel moment et dans quelles conditions chacun des gènes sont produits.

En ce qui concerne les trois protéines identifiées et purifiées, il serait intéressant d'effectuer des études de DNA shuffling ou de mutagénèse dirigée sur ces dernières pour tenter d'améliorer leur efficacité à déacétyler la chitine. Une fois une enzyme performante obtenue, il faudrait en produire en grande quantité et faire d'autres études permettant de développer un protocole de déacétylation de chitine pour éventuellement remplacer le traitement actuel thermochimique de conversion de la chitine en chitosane.

CONCLUSION

Dans cette étude, il était question d'effectuer le clonage, l'expression et la caractérisation de déacétylases de *Streptomyces coelicolor* M145. Le but était de découvrir de nouvelles déacétylases pour développer un procédé plus propre et mieux contrôlable pour convertir la chitine en chitosane et ainsi remplacer les procédés chimiques actuels qui sont plus agressifs. Dix gènes codant potentiellement pour des déacétylases ont été répertoriés au niveau du génome de *Streptomyces coelicolor* M145, dont un qui était déjà connu codant pour l'acétyl xylane estérase. Les neuf autres gènes ont été clonés dans le système d'expression *Streptomyces lividans* 10-164, soit dans le vecteur pIAFC109MCS ou le vecteur pIAF550MCSL. Trois protéines ont été exprimées et identifiées : les protéines SC H35.12c, SC D95A.17c et SC M10.24c. La protéine SC H35.12c avait été classée au départ comme une protéine intracellulaire suite au séquençage du génome de *S. coelicolor*. Cependant, l'analyse de la séquence du gène correspondant à cette protéine a permis de découvrir un autre codon de départ suivi d'une séquence codant pour un peptide signal. Cette protéine a effectivement été exprimée dans la portion extracellulaire. Les deux autres protéines ont été exprimées au niveau intracellulaire tel que prévu.

La purification de la protéine SC H35.12c a été effectuée par HPLC et par tamis moléculaire, et a permis de récolter 1,55mg de protéines. Les protéines SC D95A.17c et SC M10.24c ont été purifiées à l'aide de colonne Histrap, car une queue de polyhistidine leur avait toutes deux été ajoutée. Les quantités de protéines récoltées pour chacune d'elles sont respectivement de 2,14mg et 0,14mg.

La protéine SC H35.12c a démontré une activité de déacétylation sur le DP6 comparable à celle de l'acétyl xylane estérase, ce qui est très prometteur. Le pH optimal de la réaction est 9 et la température optimale est 40°C. La réaction est très lente et continue même après 48h d'incubation. Aucune activité de déacétylation n'a été observée sur le chitosane (80% déacétylé), le DP6.4 et le DP7.4. Pour sa part, la protéine SC D95A.17c a démontré une activité de déacétylase sur le *N*-acétyl-D-glucosamine, mais de niveau très inférieur à ce qui a été observé pour la protéine SC H35.12c sur le DP6. Le pH optimal de la réaction est de 5 et la température optimale est de 50°C. Aucune activité n'a été décelée sur le DP6. Finalement, la protéine SC M10.24c a démontré une très

faible activité sur le DP6. Le pH optimal de la réaction est de 9 et la température optimale est de 30°C.

Enfin, la protéine SC H35.12c semble avoir un avenir prometteur en tant que déacétylase, étant donné qu'elle a une activité comparable à celle de l'AxeA sur un oligomère de chitine, le DP6. Comme c'est une enzyme extracellulaire, elle est plus facile à récupérer. Dans l'éventualité du développement d'un procédé enzymatique pour remplacer les méthodes chimiques actuelles de conversion de la chitine en chitosane, il serait plus approprié de débiter par le traitement enzymatique à l'aide de la protéine SC H35.12c, et finaliser le tout avec un traitement chimique pour obtenir du chitosane. En effet, cette enzyme est active sur un substrat chitineux et non sur le chitosane, ce qui rend difficile la conversion complète de la chitine en chitosane. Pour leur part, les protéines SC D95A.17c et SC M10.24c ont démontré de très faibles résultats d'activité de déacétylation, ce qui fait en sorte qu'il est moins envisageable de les utiliser pour remplacer le traitement chimique de conversion de la chitine en chitosane. Les substrats testés ne devaient pas être les substrats réels de chacune d'elles; il faudrait donc faire d'autres tests pour les déterminer. Il serait intéressant d'effectuer des expériences de DNA shuffling sur les gènes correspondant à ces protéines, et aussi sur le gène SC H35.12c, pour ainsi tenter de produire des enzymes plus efficaces à déacétyler la chitine.

BIBLIOGRAPHIE

Alfonso, C., Nuero, O. M., Santamaria, F. et Reyes, F. (1995) Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* 30(1), 49-54.

Amorim, R. V. S., Ledingham, W. M., Fukushima, K. et Campos-Takaki, G. M. (2005) Screening of chitin deacetylase from mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 19-23.

Anné, J. et Van Mellaert, L. (1993) *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 121-128.

Araki, Y. et Ito, E. (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* : enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* 189, 249-253.

Baran, E. T., Mano, J. F. et Reis, R. L. (2004) Starch-chitosan hydrogels prepared by reductive alkylation cross-linking. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 759-765.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quall, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. et Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.

Bergmeyer, H. U. et Möllering, H. (1974) *Methods of enzymatic analysis* (2e édition anglaise), traduction de la 3e édition allemande, vol. 3, Verlag chemie, Weinheim, Allemagne, 1520.

Borzacchiello, A., Ambrosio, L., Netti, P. A., Nicolais, L., Peniche, C., Gallardo, A. et San Roman, J. (2001) Chitosan-based hydrogels : synthesis and characterization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12, 861-864.

Campbell, N. et Mathieu, R. (1995) *Les manipulations génétiques. Biologie* (version française), traduction de la 3e édition anglaise, Benjamin/Cummings publishing company inc., Chapitre 19, 390-419.

Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C. et Bouriotis, V. (2003) Carbohydrate esterase family 4 enzymes : substrate specificity. *Carbohydr Res.* 338, 687-692.

Damour, O., Gueugniaug, P. Y., Berthin-Maghit, M., Rousselle, P., Berthod, F., Sahuc, F. et Collombel, C. (1994) A dermal substrate made of collagen-GAG-chitosan for deep burn coverage : first clinical uses. *Clin. Mater.* 15(4), 273-276.

Deising, H. et Siegrist, J. (1995) Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-pabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 207-212.

Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. (1996) Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 319, 881-886.

Gao, X. D., Katsumoto, T. et Onodera, K. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.* 117(2), 257-263.

Goeddel, D. V. (1991) Gene expression technology, *Methods in enzymology* 185(1), 3-7.

Gusek, T. W. et Kinsella, J. E. (1992) Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* 18(4), 247-260.

Hekmat, O., Tokuyasu, K. et Withers, S. G. (2003) Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum* : an investigation using steady-state kinetic analysis and MS. *Biochem. J.* 374, 369-380.

Hopwood, A. D. (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces* : from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* 145, 2183-2202.

Isaccson, U. et Watermark, G. (1974) Chemiluminescence in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta.* 68, 339-362.

Jaworska, M., Sakurai, K., Gaudon, P. et Guibal, E. (2003) Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polym. Int.* 52, 198-205.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A. et Bouriotis, V. (1993) Bioconversion of chitin to chitosan : purification and characterization of chitin deaceylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2564-2568.

Kauss, H. (1989) The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determines its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplast of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178, 385-392.

Lammertyn, E. et Anné, J. (1998) Modification of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 1-10.

Lin, J. J., Smith, M., Jessee, J. et Bloom, F. (1992) DH11S : an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. *Biotechniques.* 12(5), 718-721.

Martinou, A, Koutsioulis, D. et Bouriotis, V. (2001) Expression, purification and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (*cda2p*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* 24(1), 111-116.

Martinou, A., Kafetzopoulos, D. et Bouriotis, V. (1993) Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.* 644, 35-41.

Matsuo, Y., Tanaka, K., Matsuda, H. et Kawamukai, M. (2005) *cda1⁺*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 579, 2737-2743.

Maw, T., Koon Tan, T., Khor, E. et Man Wong, S. (2002) Selection of *Gongronella butleri* strains for enhanced chitosan yield with UV mutagenesis. *J. Biotechnol.* 95, 189-193.

Middleditch, B. S. (1979) *Practical mass spectrometry, a contemporary introduction*, Plenum Press, New York, 1-24.

Mishra, C., Semino, C. E., McCreath, K. J., de la Vega, H., Jones, B. J., Specht, C. A. et Robbins, P. W. (1997) Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(4), 327-336.

Morosoli, R., Shareck, F. et Kluepfel, D. (1997) Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 146, 167-174.

Motsenbocker, M. A. (1988) Sensitivity limitations encountered in enhanced horseradish peroxidase catalysed chemiluminescence. *J. Biolum. Chemilum.* 2, 9-16.

Mulawarman, Hallmann, J., Bell, D., Kopp-Holtwiesche, B. et Sikora, R. A. (2001) Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. Meded rijksuniv gent fak landbouwkde toegep Biol. Wet. 66(2b), 609-617.

Nahar, P., Ghormade, V. et Deshpande, M. V. (2004) The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae* : possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. J. Invertebr. Pathol. 85, 80-88.

Onsoyen, E. et Skaugrud, O. (1990) Metal recovery using chitosan. J. Chem. Technol. Biotechnol. 49, no. 4, 359-404.

Percot, A., Viton, C. et Domard, A. (2003) Optimization of chitin extraction from shrimp shells. Biomacromolecules 4, 12-18.

Porath, J. et Flodin, P. (1959) Gel filtration : a method for desalting and group separation. Nature 83, 1657-1659.

Prescot, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2003) Microbiologie, 2^e édition, De Boeck Université, Bruxelles, 539-547, 333-336.

Puchart, V., Gariépy, M.-C., Shareck, F. et Dupont, C. (2006) Identification of catalytically important amino acid residues of *Streptomyces lividans* acetylxylan esterase A from carbohydrate esterase family 4. Biochem. Biophys. Acta. 1764, 263-274.

Roberts, G. A. F et Wood, F. A. (2001) A study of the influence of structure on the effectiveness of chitosan as an anti-felting treatment for wool. J. Biotechnol. 89, 297-304.

Rosewell, D. F. et White, E. H. (1978) Methods in enzymology 57, Deluca, M. A., (Éd.) Academic Press, New York, 409-423.

Scopes, R. K. (1987) Protein purification, principles and practice, 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 1-20.

Senel, S. et McClure, S. J. (2004) Potential application of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1467-1480.

Simunek, J., Tishchenko, G., Rozhetsky, K. Bartonova, H, Kopecny, J. et Hodrova, B. (2004) Chitinolytic enzymes from *Clostridium aminovalericum* : activity screening and purification. *Folia Microbiol.* 49(2), 194-198.

Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K. et Mori, Y. (2000) Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylases from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* 39, 8837-8843.

Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M. et Hayashi, K. (1996) Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1598-1603.

Tokuyasu, K., Ohnishi-kameyama, M., Hayashi, K. et Mori, Y (1999) Cloning and expression of chitin deacetylase gene from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biosci. Bioeng.* 87(4), 418-423.

Tsigos, I. et Bouriotis, V. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* 270, 26286-26291.

Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. et Bouriotis, V. (2000) Chitin deacetylases : new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18, 305-312.

Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. et Thorpe, G. H. (1979) Analytical luminescence : its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25, 1531-1546.

Wu, F.-C., Tseng, R.-L. et Juang, R.-S. (2000) Comparative adsorption of metal and dye on flake- and bead-types of chitosans prepared from fishery wastes. *J. Hazard. Mater. B73*, 63-75.

Zhao, L. et Chang, J. (2004) Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 625-629.

ANNEXES

ANNEXE 1 : SÉQUENCE DU GÈNE SC M10.24c

```

1  atgcgagcgc agccgatcct gcgcatgacg gggcgggggc gcaccatgct gctcaccttc
   M R S E P I L R M T G R G R T M L L T F

61  gacgacggac cccaccccga gtacaccccg aagatcctgg acaccctggc gaagtacgag
   D D G P H P E Y T P K I L D T L A K Y E

121  gtgcgggcga ccttcttcgt gtgcggggag atggcggact acaaccggga cctgctgacc
   V R A T F F V C G E M A D Y N R D L L T

181  cggatggccg acgagggaca cgtggtcggc aaccacacct ggtcccaccc gctgctgacc
   R M A D E G H V V G N H T W S H P L L T

241  aaactcaccc ggcggcgcac ccgctccgag atggaacgca ccagcgagggt cgtcgagcag
   K L T R R R I R S E M E R T S E V V E Q

301  gcctacgggg aggcgccccg ctggttccgg gccccgtacg gcgcgtggaa cggggccgcc
   A Y G E A P R W F R A P Y G A W N R A A

361  ttccagctcg gctcggaact cggcatggag ccgctcgctt ggaccgtgga caccctggac
   F Q L G S E L G M E P L A W T V D T L D

421  tggacgactc cgggcaccgg caccatcgtc gaccgggtcg aggaaggcgc ggccccgggt
   W T T P G T G T I V D R V E E G A A P G

481  gtcgtggtgc tctcgcacga cgccgggggc gaccgttcgc agagtgtccg cgccctgcgg
   V V V L S H D A G G D R S Q S V R A L R

541  cgctatctgc ccgaactgct cgactccggc taccacctca ccgtcccccg gggcgccctg
   R Y L P E L L D S G Y H L T V P R R R L

601  atctga
     I -

```

ANNEXE 2 : SÉQUENCE DU GÈNE SC H35.12c

1 gtggtccccg acgcgacggg gaccggcggc gagcaactac gcgaaggcgg ggcggcggac
 V V P D A T G T G G E Q L R E G G A A D

61 atggcgcggc acggtggtgg acggggctgg tacggcaagg tggtcggggc ggcgctcggt
 M A R H G G G R G W Y G K V V G A A L G

121 gtgacgatgc tcgcccgcgg cgcctcggtg tggaccgcgc aggccgactc cgtcggcggc
 V T M L A V G A S V W T A Q A D S V G G

181 ggccccgacgc cgcggggcgtc cgcgtcggcc acgccgggcg gcgaggccaa gcccgtcgac
 G P T P R A S A S A T P G G E A K P V D

241 gtcagcatcg cgcacgcctc ggacgcggga ccgaacggcg tgaacatcac catcgacgac
 V S I A H A S D A G P N G V N I T I D D

301 ggccccgacc ccgcctggac gcctcaagtg ctcgacctgc tggaggagta cggcgtgaag
 G P D P A W T P Q V L D L L E E Y G V K

361 gccacettct gcatgacggg ccttcaggcc gaggcccacc cggacctcgt gaaggacgtc
 A T F C M T G L Q A E A H P D L V K D V

421 gtcgcgggccg ggcaccggct gtgcgaccac acggtgtcgc acgacaccgc catggacaag
 V A A G H R L C D H T V S H D T A M D K

481 aagtccgagg cctaccaggc caaggagatc ctcgacgcgc agcgcgatgat catcgaggcg
 K S E A Y Q A K E I L D A E R M I I E A

541 tccggggggcg tgcgtcccgt gtactaccgg gccccggcg gggcgttcac ccctacagc
 S G G V R P V Y Y R A P G G A F T P Y S

601 cgcaagctcg ccgcctccca cggcatgcgc ccgctgggct ggaacgtgga caccaaggac
 R K L A A S H G M R P L G W N V D T K D

661 ttcgagcggc cgggctcgga cgccatcgtc gccaccgtca agcgggagct gtccaacggc
 F E R P G S D A I V A T V K R E L S N G

721 ccgaccatcc tcttccacga cgccgggggc gaccgcaccc agaccgtcga agccctcggg
 P T I L F H D A G G D R T Q T V E A L R

781 caggctctgc cctggctgaa ggagcagggc cgcaccttcg ggttcccggg gcgctga
 Q V L P W L K E Q G R T F G F P V R -

ANNEXE 3 : SÉQUENCE DU GÈNE SC E59.21c

1 atgcgctcca gcacccgccg tcacggggcc gcgcgagcgc cccgtgaggg ctcccgcct
 M R S S T R R H G A A R S A R E G S R R

61 cgcctgcct tgcgctgct gcttccgctg ctcgctctgg tcgccctggt ggcgatgctc
 R L P L R L L L P L L V L V A L V A M L

121 atgctgcgcg gatacgtgca cagcgagatc ctcgccgacc accgctgcca gccgcccgcc
 M L R G Y V H S E I L A D H R V Q P P A

181 gccaccgaca aggtgccgca gaagatcctc gagggcggcc cggtcacgca cgtgcgcgcc
 A T D K V P Q K I L E G G P V I D V R G

241 ggccgcaccg agagcctgag cgtgcccgac caccggctcg tcctcacctt cgacgacggc
 G R T E S L S V P D H R L V L T F D D G

301 ccggaccgga cctggacccc gcgggtcctc gacgtgctca agaagcacga cgcgcacgcg
 P D P T W T P R V L D V L K K H D A H A

361 gtcttcttcg tcaccggcac catggcctcc cgctaccccg acctcgctga gcgcatggtc
 V F F V T G T M A S R Y P D L V E R M V

421 gacgagggcc acgaggtggg cctgcacacc ttcaaccacc cggacctctc cttccagtcc
 D E G H E V G L H T F N H P D L S F Q S

481 gagaagcgca tcgactggga gctgtcgcag aaccagctgg cgatcaccgg tgcggccggg
 E K R I D W E L S Q N Q L A I T G A A G

541 gtgcgcacct cgctgttccg gccgcccgtac tcctccttcg ccgacgccat ggacaacaag
 V R T S L F R P P Y S S F A D A M D N K

601 tcctggcccg tcaccgagta catcgggcgc cggggctacc tcgtcgtcgt caacaacacc
 S W P V T E Y I G G R G Y L V V V N N T

661 gacagcgagg actggaagaa gcccggcgtc gacgagatca tccgccgcgc cccccgaag
 D S E D W K K P G V D E I I R R A T P K

721 ggcggaaggg gcgcatcgt cctgatgcac gactccggcg gcgaccgcca ccagaccgtg
 G G K G A I V L M H D S G G D R H Q T V

781 cagggcctgg acaggttccct gcccgacctg aagaagaagg gctacgagtt cgacaacctc
 Q A L D R F L P D L K K K G Y E F D N L

841 accgaggccc tggacgcgcc cggcgccatg agccccgtga
 T E A L D A P G A M S P -

ANNEXE 4 : SÉQUENCE DU GÈNE SC D16A.29c

1 atgcgcacgc ccacctcacc cccacccccg cccgcgcggg gccgcgctcg tgccccctcc
 M R T P T S P P T P P A R G R R R A P S

61 cggatggaac gggccgcccg ccgggcccgc gcgctgcaac gcccgcgct cctgctcgcc
 R M E R A A G R A A A L Q R P R V L L A

121 ctgctcctcc tgctcgcgct gacctgcgtg atgctcctcg acggctatct gcgcgcgagg
 L L L L L A L T C V M L L D G Y L R A E

181 gtcggcggcg accagcgcgt acgcaccggg gcctcggcga gcgacgtccc cgacgacgtg
 V G G D Q R V R T G A S A S D V P D D V

241 ctcgacggcg gaccgatcct gtccttcccc ggccgacagg ccaccaccgt ctccgtccct
 L D G G P I L S F P G G Q A T T V S V P

301 gacaagacga tcgtgctgac cttcgacgac ggccccgacc ccacctggac gccccagggtg
 D K T I V L T F D D G P D P T W T P Q V

361 ctggacatcc tggagaagta cgacgtgccc ggcacgttct tcctggctcg ctcgatggtc
 L D I L E K Y D V P G T F F L V G S M V

421 tcgcgccacc cggggatcgt gcgggacatg gtcgagcagg gcaacgaggt aggcgtccac
 S R H P G I V R D M V E Q G N E V G V H

481 accttcaccc acgtcgacct ctctaccag agccaggccc gcgtcacccg cgagatcgag
 T F T H V D L S Y Q S Q A R V T R E I E

541 cagaccacgc tcgccctggc gggcgcggcc ggcatcacca gcacgctggt cggggcgccg
 Q T Q L A L A G A A G I T S T L F R A P

601 tactcctccc agacggacgc catcgacaac tacagctggc ccgtctacga gacccctcggc
 Y S S Q T D A I D N Y S W P V Y E S L G

661 gcggacggct acaccagcgt cttcatcgac accgacagcg acgactggaa acggcccggc
 A D G Y T S V F I D T D S D D W K R P G

721 gtctcgaaga tcgtcgagtg ggccacgccc gaggacgacg agggggcctc cgtcctcttc
 V S K I V E W A T P E D D E G A S V L F

781 cagcagccc ggggcgagcg gtcgcagacg atcgaggcgc tgccgaagta catcgagaag
 H D A G G E R S Q T I E A L P K Y I E K

841 atgaaggcga aggggtacac cttcaccacg gtcagcgggtg tcatggccga tcagcagtca
 M K A K G Y T F T T V S G V M A D Q Q S

901 catcagccac agcagtcgtg a
 H Q P Q Q S -

ANNEXE 5 : SÉQUENCE DU GÈNE SC 2G38.22

1 atgcgcagac cggaggcacc acggacgcgt catgggtttc ccaccggacg ggcggtgtac
 M R R P E A P R T R H G F P T G R A V Y
 61 gccgtcgtc cggtcgtcgc ggccgcgctg gccacatcg gtccggccgc gacctggctg
 A V A P V V A A A L A H I G P A A T W L
 121 ccggaactgc gccgccggcg gttcccgggc ctggccggcc ggggcagccc cggccacgtc
 P E L R R R R F P G L A G R G S P G H V
 181 gcgctcacct tcgacgacgg cccggacccg gcgtccacgc cgcggttctc cgacacgctg
 A L T F D D G P D P A S T P R F L D T L
 241 gacggactcg gactacgggc cacgttcttc gtcctgggcg agaacgcctc gcgccatccg
 D G L G V R A T F F V L G E N A L R H P
 301 gcgctgaccc gtgagctggt ccggcgcgga catgaactcg ccgtccacgg ctggacgcac
 A L T R E L V R R G H E L A V H G W T H
 361 gaccgcccct ggtggccgtc gccggcgcgg gacacgcgcg agttgctgcg tgccgtccgg
 D R P W W P S P A R D T R E L L R A V R
 421 gtggtggacg aggtgtccgg acgtgcgccg cgctgggtacc ggccgcccta cgggatacctc
 V V D E V S G R A P R W Y R P P Y G I L
 481 acctccggtc gctgggcggc cgcccggcgg gccgggctgc ggcccgtgct gtggacggcg
 T S G R W A A A R R A G L R P V L W T A
 541 tggggcaagg actggcggca cgacgccacg cccgcctcgg tacgcgcgac cgtcgcggcc
 W G K D W R H D A T P A S V R A T V A A
 601 gatctgtgcg ggggtggcac ggtcctctc cacgacaccg accacgcctc cgccccgggc
 D L C G G G T V L L H D T D H A S A P G
 661 agctggcggg ctacgctcgg cgcgctgccg gacatcgtgc gcgactgccg cgaggcgggg
 S W R A T L G A L P D I V R D C R E A G
 721 ctggcggtgg gcccgtggg cgagcacggc gcgggtgggg ccacgggaac gccgggaacg
 L A V G P L G E H G A G G A T G T P G T
 781 gcagcgggtg cggggaccgc ggggacggcg gggacggcgg cgtcgtttcg gtcaccggcg
 A A V A G T A G T A G T A A S F R S P A
 841 ccgggatag
 P G -

ANNEXE 6 : SÉQUENCE DU GÈNE SC 6G4.37

1 gtgtcccggg cctctcgtgc caccaccgcc ctgcgccgtcg ccgccctcgc cgccggctgt
 V S R A S R A T T A L A V A A L A A G C

61 gcgcagggcg aggaccaaag cgtgcggggc gccccgggtc agcaggcacc cccggccccg
 A Q G E D Q S V R G A P G Q Q A P P A R

121 gcggtcgacg gcgcggcgaa ggctcgcgag gccccgggcy ccctggccgc cgccggccaag
 A V D G A A K A R E A R A A L A A A A K

181 cgctggaaac tcgacaaggt cccgctgacg gccccgcgc cccccgcgaa gaagccggag
 R W K L D K V P L T A P A P P A K K P E

241 atcgaggccc gcgagggctt cgaggtggac ggccaggagg aggacggcct cccgcccgtc
 I E A R E G F E V D G Q E E D G L P P V

301 ttcaccacgg tccccaccaa ggagaaggct gtcttctca ccatcgacga cggcgccgag
 F T T V P T K E K V V F L T I D D G A E

361 aaggaccggy cgttcctgag gatgatgagc gaactgaaga tcccgtacac cgtcttctc
 K D P A F L R M M S E L K I P Y T V F L

421 accgacgagg agatcaagga cgactacggc tacttcaaga agatgcaggc ccgcccgcac
 T D E E I K D D Y G Y F K K M Q A R G I

481 accctcaaca accacaccct cagccacccc tacctccccg gcctctccta cgaggaccag
 T L N N H T L S H P Y L P G L S Y E D Q

541 aagcgggaga tctgcggcat gcaggacgtg atggagaagc actacggcaa gcgccccgtc
 K R E I C G M Q D V M E K H Y G K R P V

601 ctcttccgcc cgccgtacgg caactacaac cgcgacacc tgcgcgccgc caagtctctc
 L F R P P Y G N Y N R D T L R A A K S C

661 gggatcaagt acgccccgat ctggagcgag gaggtgtacg tcgaccactg ggagtaccga
 G I K Y A P I W S E E V Y V D H W E Y R

721 gagtgggacc aggacctgca ccccggcgac atcgtcctca cccacttccg gggcgagaac
 E W D Q D L H P G D I V L T H F R G E N

781 gactgggacg gcacatgac cgacatggct cgccgcttcc tggaccggat caccgcccgc
 D W D G T M T D M V R R F L D R I T A D

841 ggatacgcgg tggccccgct ggaggactac ctgtga
 G Y A V A R L E D Y L -

ANNEXE 7 : SÉQUENCE DU GÈNE SC 6G4.38

1 atgcgcccag ggcgggtccc tccggccggc gccgccccgg ccgcccctcct gtccccgttg
 M R R G R S R P A G A A P A A L L L P L
 61 ctctgctgc tcccgtcac cggctgcgac cggctcgccg ccgccccgc cgaacacgcg
 L L L L P L T G C D R L A A A P A E H A
 121 gcggcggccg gggacccccgc ccaggacgcg gaccggggcc gtcgcctgcc gcccgctcgtg
 A A A G D P A Q D A D R G R R L P P V V
 181 gaccacgtcc gcaccgacga cccggtcgtc ttctcacct acgacgacgg cggcagcgc
 D H V R T D D P V V F L T Y D D G A E R
 241 gacccccct tgcgcgcct gatccgcgaa cggcggctcc cggtcaccct gttcctcacc
 D P A F V G L I R E R R L P V T L F L T
 301 gacaccgtcg ccggaccggc gtaccggcag ctcgccccgc tgcgcccgtt cggcgcgagc
 D T V A G P A Y G D L A R L R P F G A S
 361 ctgcagaacc acaccctcga ccaccgtcc ctgcgcccgc tgcgcacgc cggccagcgc
 L Q N H T L D H R S L R G L P H A G Q R
 421 gccgagatct gcggccagca gaccaagctc aggtcccgtc tcggcgtccg cgcccacctc
 A E I C G Q Q T K L R S R F G V R A H L
 481 ttccgccccgc cgcacggcac gtaccgacacc acgaccctgc gcgcccgcgc cgactgcggc
 F R P P H G T Y D T T T L R A A A D C G
 541 atcacggccc tggctcctgtg gcgcgccacc ctcgacgccg acggcgcctt cacctacacc
 I T A L V L W R A T L D A D G A L T Y T
 601 cgcgccgacc accgcctgca ccccgccgac atcgtggccg tggacccgga ccaccgacg
 R G D H R L H P G D I V A V D P D H P T
 661 gccgcgaacc tggccgcccc cacggagcgt ttgctggaga cgatcgagga gcaggggctg
 A A N L A A R T E R L L E T I E E Q G L
 721 aggggtggca acttgagaaa ctaccttag
 R V G N L E N Y L -

ANNEXE 8 : SÉQUENCE DU GÈNE SC C61A.31

1 atgcgccact ccgtcggcga ccgctcggac gaccctgtacc gcatcacggt cacgcccgac
 M R H S V G D R S D D P Y R I T V T P D

61 cggctggacg cccagctggg ctggetgagg cggcgcgggc tgcgcggtgt gccggtcggc
 R L D A Q L G W L R R R G L R G V P V G

121 gagctgctgg ccgcccgcgc ccggggcggc ggcggggacc tggggggct gaccttcgac
 E L L A A R A R G G G G D L V G L T F D

181 gacgggtacg ccgacttcgt cgagcacgcg ctgccgtgcc tgcggcgcca cggctgcggg
 D G Y A D F V E H A L P C L R R H G C G

241 gcgacctctt tcgtgctgcc ggggcggctc ggcggcgctc actcctggga cccgctgggc
 A T L F V L P G R L G G V N S W D P L G

301 ccgcgcaagc cgctgctgac cgccgacggc atccggcggg ccgcccgcga gggcgtcgag
 P R K P L L T A D G I R R A A A E G V E

361 atcggctcgc acggcctcac ccacgtcgc acgtaccacgg cggacgacac cacgctgacc
 I G S H G L T H V D L T T A D D T T L T

421 gccgagaccg ccgaaagccg ggcgctgctc tcggagctgg ccggtgctcc ggtcaccggc
 A E T A E S R A L L S E L A G A P V T G

481 ttctgctatc cgtacggcac ggtcgcgccc cgcgcccggc acgcccgtgcg cgcccgggg
 F C Y P Y G T V D A R A A D A V R A A G

541 tacacctacg cctgcgccat cgaccccggc ccgctgaccg gcccgtagc cctgccgcgc
 Y T Y A C A I D P G P L T G P Y A L P R

601 gtgcacgtgg gccagaacga cacaccgta cggctggtgc tgaagaccgg gctgcaccgc
 V H V G Q N D T P V R L L L K T R L H R

661 ctgcgcccgc gggccgcggc gggggtgtga
 L R R R A A A G V -

ANNEXE 9 : SÉQUENCE DU GÈNE SC D95A.17c

1 atgcgcccaa gcaaggttct cgccggtgcc cgggtggtac tgcccaccgg gaccgtggac
 M R P S K V L A G A R V V L P T G T V D
 61 gacggccgcg tgatcgtcga cggcgcgcg atcgcggaca cggctcccc gcaggccgag
 D G R V I V D G A R I A D T A P P Q A E
 121 accgtcgacc tggcgggcca ctgggtggtc cccggcttcg tcgacatcca caaccacggc
 T V D L A G H W V V P G F V D I H N H G
 181 ggcggcggag cctccttcgc cggcggcacc gccgaggaga tcctggccgg cgtcgagacc
 G G G A S F A G G T A E E I L A G V E T
 241 caccgccggc acggcaccac cacggtggtc gcctccgccg tcaccggcga tctggacttc
 H R R H G T T T V V A S A V T G D L D F
 301 ctggcccggc acgccgggat gctcgccgag ctggcgcagc agggcgacat cgttggcatc
 L A R H A G M L A E L A Q Q G D I V G I
 361 cacttcgagg ggccgttcat ctcgccgtgc cgcaagggcg cgcacgacga gcagctgctg
 H F E G P F I S P C R K G A H D E Q L L
 421 cgcgacccgg acccggccga ggtgcgcaag ctggtcgacg cggcgcacgg gcacgcgaag
 R D P D P A E V R K L V D A A H G H A K
 481 atgatgacgc tggcgaccga gctgccgggc ggcctggact ccgtacggct gctggtcgag
 M M T L A T E L P G G L D S V R L L V E
 541 cacggcgtga tcgcggccgt cgggcacacc gacgcgacgt acgagcagac cgtgcaggcc
 H G V I A A V G H T D A T Y E Q T V Q A
 601 atcgacgcgg gcgccaccgt cgccacgcac ctcttcaacg cgatgccgcc ggtcggtcac
 I D A G A T V A T H L F N A M P P V G H
 661 cgtgcgccgg gtccgatcac ggcgctcctc gaggacgagc ggatcacctg cgagctgatc
 R A P G P I T A L L E D E R I T V E L I
 721 aacgacggca cgcacctgca tccggccgcg ctccaactgg ccttccacca cgcgggtgcc
 N D G T H L H P A A L Q L A F H H A G A
 781 gcccggtcgc cttcatcac cgacgcgatg gacgcggcgg gcttcggcga cggccactac
 A R V A F I T D A M D A A G F G D G H Y
 841 ctgctcggcc cgctggaggt cgaggtcgcg gacggcgtgg cccggctggt ggagggcggc
 L L G P L E V E V A D G V A R L V E G G
 901 tcgatcgcgg gctccacgct caccctggac cgcgccttca agcgggcggg gacggtggac
 S I A G S T L T L D R A F K R A V T V D
 961 cggctgcccg tcggggacgt cgtcgcggcg atctccgcca acccggcggc gctcctcggg
 R L P V G D V V A A I S A N P A R L L G

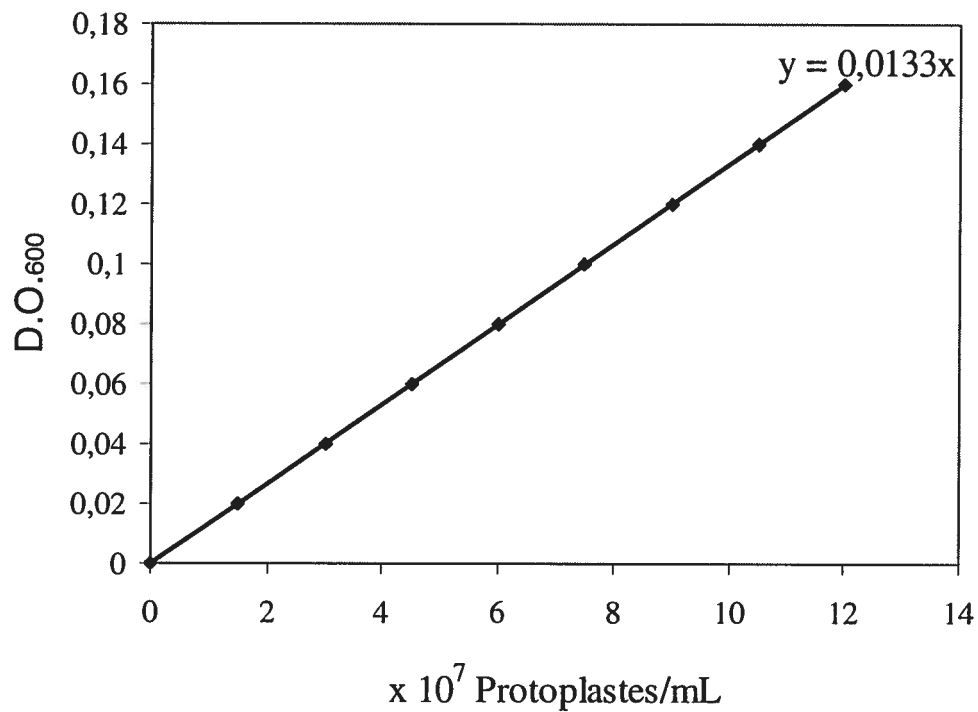
1021 ctcgacgacc ggatcggctc gctggagccc ggcaaggacg cgcacctggt cgtcctggac
L D D R I G S L E P G K D A D L V V L D

1081 gacgccttcg acctggtggg cgtgatgcgc cggggcgaat ggggtggtcga tccccacctg
D A F D L V G V M R R G E W V V D P H L

1141 ggctga
G -

ANNEXE 10 : Courbe* de référence pour la préparation de protoplastes

Densité optique₆₀₀ en fonction du nombre de protoplastes de *Streptomyces lividans* 10-164



*Courbe de référence élaborée à partir des expériences réalisées par la technicienne de laboratoire Liette Biron.