Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Isolement et caractérisation d'enzymes lipolytiques par criblage d'une banque métagénomique

Par
Catherine Meilleur

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

Jury d'évaluation

Évaluateur interne	Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Martin Chénier, Université McGill
Directeur de recherche	François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Catherine Meilleur, 2009

RÉSUMÉ

La métagénomique permet le clonage et l'expression de gènes hétérologues de bactéries sans les cultiver en laboratoire. De nombreux clones contenant de larges inserts d'ADN sont ainsi criblés à la recherche d'une activité spécifique. Les enzymes lipolytiques telles que les lipases et les estérases représentent une classe d'enzymes ayant un potentiel industriel intéressant. Ces enzymes sont capables d'effectuer des réactions d'hydrolyse et de synthèse dans des conditions physico-chimiques attrayantes, telles qu'en présence de solvants, dans un milieu alcalin ou à de hautes températures. L'objectif de cette étude était l'identification, à partir de clones issus d'une banque métagénomique, de lipases présentant un profil industriel intéressant. L'approche expérimentale consistait à identifier des clones présentant une activité lipolytique grâce à un criblage fonctionnel pour ensuite isoler le gène responsable de cette activité. La banque métagénomique, préparée précédemment, provenait d'un bioréacteur à culture enrichie en gélatine dont la température d'incubation était élevée et le pH alcalin. Deux clones lipolytiques ont été retenus puis les gènes responsables de leur activité isolés par une série de délétions à l'aide d'endonucléases de restriction. Le premier clone présentait une activité intracellulaire et était apparenté à une carboxylestérase. Le second clone possédait un gène lipolytique ayant une homologie de séquence avec un gène codant pour une lipase d'un organisme thermophile. Ce gène a été cloné puis exprimé chez *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* puis ce dernier a servi d'hôte afin de purifier la lipase. L'enzyme purifiée, nommée LipIAF5.2, a été caractérisée lors de la détermination de son pH, température et substrat optimaux. L'attrait industriel que pouvait représenter cette lipase a été étudié en analysant la thermostabilité de l'enzyme ainsi que sa résistance aux solvants organiques. La lipase IAF5.2 a démontré une température optimale de 60 °C à un pH de 10,5 ainsi qu'une thermorésistance de quatre heures à 90 °C. L'enzyme présentait également une préférence pour les acides gras à longue chaînes et une tolérance à quelques solvants.

Directeur de recherche

Étudiant

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, François Shareck, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour les conseils et les discussions animées qui ont parsemé ces deux années d'études. Un énorme merci à Raymonde Jetté pour son support moral et sa perpétuelle bonne humeur, son sens pratique et sa curiosité vive. Je tiens également à remercier Amélie Côté, François-Xavier Lussier et Guillaume Brault pour leur aide et conseils ainsi que pour l'ambiance qu'ils ont créée dans le laboratoire. Ce fût un réel plaisir que de tous vous côtoyer.

Finalement, je tiens à souligner l'apport non négligeable de la Fondation Armand-Frappier pour son support financier tout au long de ma maîtrise. Merci à l'équipe du projet métagénomique pour son apport au soutien financier ainsi que pour ses conseils et commentaires judicieux lors des réunions.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé....ii
Remerciements....iii
Table des matières....iv
Liste des figures....viii
Liste des tableaux....xi
Liste des abréviations....xii
Introduction....1
1. Revue de littérature....3
1.1 La métagénomique....4
1.1.1 Définition et historique....4
1.2 Les étapes d'une étude de métagénomique....6
1.2.1 L'isolement de l'ADN....6
1.2.2 Construction d'une librairie métagénomique....7
1.2.3 Le criblage d'une banque métagénomique....8
1.2.3.1 L'homologie de séquences....8
1.2.3.2 Le criblage fonctionnel....9
1.2.3.3 Les bactéries hôtes....10
1.2.3.4 Les autres techniques de criblage....10
1.2.4 Les apports de l'approche métagénomique....13
1.2.5 La limite d'une étude métagénomique....13
1.3 L'enrichissement de bioréacteurs....14
1.4 Les enzymes industrielles....15
1.4.1 La superfamille des α/β hydrolases....18
1.4.2 Le mécanisme d'action des α/β hydrolases....20
1.4.2.1 Les enzymes lipolytiques....20
1.4.3 Les estérases....22
1.4.4 Les lipases....22
1.4.4.1 Généralités....22
1.4.4.2 Les réactions catalysées par les lipases....24
1.4.4.3 Cinétique d'une réaction catalysée par une lipase....26
1.4.4.4 Caractéristiques physico-chimiques des lipases et applications...27
1.4.4.5 Détection de l'activité lipolytique des lipases....30

1.4.4.6 Purification des lipases....31
2. Matériel et méthode....32
2.1 Milieux de culture....34
2.1.1 Les milieux liquides utilisés pour *Escherichia coli*....34
2.1.2 Les milieux liquides utilisés pour *Streptomyces lividans* 10-164....34
2.1.3 Les milieux solides utilisés pour *Escherichia coli*....34
2.1.4 Les milieux solides utilisés pour *Streptomyces lividans* 10-164....35
2.2 Conditions de culture....36
2.2.1 *E. coli*....36
2.2.2 *S. lividans*....36
2.3 Conservation des souches....36
2.3.1 *E. coli*....36
2.3.2 *S. lividans*....37
2.4 Analyse et manipulation de l'ADN....37
2.4.1 Extraction de cosmides et plasmides chez *Escherichia coli*....37
2.4.2 Extraction de plasmides chez *Streptomyces lividans*....38
2.4.3 Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction....38
2.4.4 Amplification par PCR....38
2.4.5 Électrophorèse sur gel d'agarose....39
2.4.6 Purification de l'ADN....39
2.4.7 Ligation....40
2.5 Transformation bactérienne....40
2.5.1 Préparation de cellules chimiquement compétentes *E. coli* DH11S....40
2.5.2 Transformation d'*E. coli*....41
2.5.3 Préparation de protoplastes de *S. lividans*....41
2.5.4 Transformation de protoplastes de *S. lividans*....42
2.6 Criblage des clones....42
2.6.1 Criblage par délétions....42
2.6.2 Analyse des séquences obtenues....43
2.7 Expression protéique....43
2.8 Purification des protéines....44
2.8.1 Préparation du surnageant....44
2.8.2 Purification par chromatographie à interaction hydrophobe....44
2.8.3 Dialyse et dosage des échantillons....45

2.8.4 Purification par tamis moléculaire....45
2.9 Analyse des protéines....46
2.9.1 Préparation des échantillons protéiques....46
2.9.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)....46
2.9.3 Zymogramme....47
2.9.4 Coloration des protéines au bleu de Coomassie....47
2.9.5 Révélation des protéines au nitrate d'argent....47
2.10 Tests enzymatiques....48
2.10.1 Généralités....48
2.10.2 Tests de substrats, pH, température et thermostabilité de l'enzyme....49
2.10.3 Tests des métaux et autres inhibiteurs....49
3. Résultats....51
3.1 Criblage fonctionnel de la banque métagénomique....52
3.1.1 Patron de restriction du clone F5-15....52
3.1.2 Ligation du vecteur F5-15 digéré par *Sph*I sur lui-même....53
3.1.3 Sélection des fragments du clone F5-15 Δ*Sph*I pour le séquençage....53
3.1.4 Identification du gène lipolytique du clone F5-15....56
3.1.5 Expression de la carboxylestérase du clone F5-15....59
3.1.6 Conclusions sur le clone F5-15....59
3.2 Le clone F5-2....61
3.2.1 Patron de restriction du clone F5-2....61
3.2.2 Ligation du vecteur du clone F5-2 digéré *Sph*I sur lui-même....61
3.2.3 Sélection de fragments du clone F5-2 Δ*Sph*I....64
3.2.4 Identification du gène lipolytique du clone F5-2....66
3.2.5 Mutations des histidines 229 et 253 de la lipase IAF5.2....70
3.2.6 Clonage du gène *lipIAF5.2* chez *E. coli*....74
3.2.7 Expression de la lipase du clone F5-2 chez *E. coli*....74
3.2.8 Clonage du gène *lipIAF5.2* chez *S. lividans* 10-164....77
3.2.9 Expression de la lipase du clone F5-2 chez *S. lividans*....79
3.2.10 Choix de l'hôte et du vecteur pour la purification de la lipase IAF5.2....79
3.2.11 Purification de la lipase IAF5.2....82
3.2.12 Détermination du substrat, du pH et de la température optimaux de LipIAF5.2....84
3.2.13 Détermination de la thermostabilité de LipIAF5.2....88

3.2.14 Effets de différents agents sur l'activité de la lipase IAF5.2.....88
4. Discussion.....91
4.1 Criblage fonctionnel de la banque métagénomique.....92
4.2 Le clone F5-15.....93
4.2.1 Identification du gène lipolytique du clone F5-15.....3
4.2.2 Expression protéique de la carboxylestérase IAF5.15.....94
4.3 Isolement du gène lipolytique du clone F5-2.....94
4.3.1 Identification du gène lipolytique du clone F5-2.....94
4.3.2 Mutations des résidus histidines 229 et 253 de la lipase IAF5.2.....96
4.3.3 Expression protéique de la lipase IAF5.2 chez *E. coli* et *S. lividans*.....97
4.3.4 Choix de l'hôte et purification de LipIAF5.2.....99
4.4 Propriétés physico-chimiques de LipIAF5.2.....100
4.5 Effets de différents agents sur la lipase IAF5.2.....102
5. Conclusion.....105
Bibliographie.....109
Annexe A.....120
Souches bactériennes.....120
Plasmides et cosmides.....120
Amorces utilisées.....121
Annexe B.....122
Publication.....122
Communications par affiches.....122
Annexe C.....123
Le bioréacteur.....123
Annexe D.....124
Carte physique du cosmide pIAFS2.....124
Liste des produits chimiques utilisés.....125

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schématisation d'une étude métagénomique.....5

Figure 2. Schématisation du criblage fonctionnel et du criblage par homologies de séquences.....12

Figure 3. Structure secondaire générale des protéines de la famille des α/β hydrolases.....19

Figure 4. L'hydrolyse d'un lien ester par une lipase.....21

Figure 5. Réactions catalysées par les lipases.....25

Figure 6. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de la digestion du cosmide du clone F5-15 par *Sna*BI et *Sph*I et *Sph*I après les délétions.....54

Figure 7. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de la carte de restriction par *Sph*I et *Bam*HI des bandes de 5000 et 12 000 pbs digérées par *Bam*HI et clonées dans pUC18.....55

Figure 8. Organisation génétique du voisinage de la carboxylestérase du clone F5-15.....57

Figure 9. Séquence de la carboxylestérase F5-15.....58

Figure 10. SDS-PAGE et zymogramme de *E. coli* DH11S et de *E. coli* DH11S avec pIAFS2 contenant l'ADN du clone F5-15 Δ*Sph*I.....60

Figure 11. Carte de restriction du clone F5-2 par plusieurs enzymes, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose.....62

Figure 12. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose du patron de restriction de quatre cosmides de colonies issues du clone F5-2 Δ*Sph*I digéré par *Sph*I ainsi que de deux cosmides provenant de colonies Δ*Sph*I n'hydrolysant pas la tributyrine.....63

Figure 13. Patron de restriction par *Pst*I du vecteur pUC18 contenant la bande de 2800 issue du cosmide F5-2 Δ*Sph*I digéré par *Sph*I, analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.....65

Figure 14. Organisation génétique du voisinage de la lipase IAF5.2.....67

Figure 15. Séquence du gène de la lipase IAF5.2.....68

Figure 16. Alignement de séquences de la lipase IAF5.2 avec la triacylglycérol de *Thermobifida fusca* YX, la lipase de *Streptomyces coelicolor* A3(2) et la dépolymérase de *Acidovorax delafieldii* 69

Figure 17. Schématisation de l'élongation par chevauchements.....71

Figure 18. Électrophorèse en gel d'agarose **A** des produits des PCR A, B, C et D et **B** du gène de la lipase IAF5.2 muté provenant de l'amplification des produits AB (mutation histidine 229) et CD (mutation histidine 253).....72

Figure 19. SDS-PAGE et zymogramme du surnageant de cultures en 2xTY de la lipase H229A et H253A.....73

Figure 20. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose **A** du produit de PCR de la lipase IAF5.2 et **B** digestion de pUC18 par *Eco*RI et *Hind*III issu de colonies blanches et bleues suite au clonage de la lipase.....75

Figure 21. SDS-PAGE et zymogramme suite à l'induction avec 0.5 mM d'IPTG de la lipase IAF5.2 chez *E. coli* DH11S.....76

Figure 22. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR générés lors de la mutation du site interne *Sph*I de la lipase IAF5.2 pour le clonage dans pIAFC109 chez *S. lividans*. **A** Amplification à l'aide des amorces mutSphFor et Lip3', amplification à l'aide des amorces Lip5' et mutSphRev et reconstitution du gène entier via l'amplification des produits de A et B purifiés à l'aide des amorces Lip5' et Lip3'.....78

Figure 23. Vérification de la présence de la lipase IAF5.2 dans pIAFC109 et pIAFD95A par électrophorèse sur gel d'agarose suite à la digestion par *Sph*I et *Sac*I.....80

Figure 24. SDS-PAGE et zymogramme du surnageant de cultures en M14 après 24, 48 et 72 heures de la lipase IAF5.2 clonée dans pIAFC109 et pIAFD95A chez *S. lividans*.....81

Figure 25. SDS-PAGE et zymogramme de la lipase IAF5.2 après le tamis moléculaire.....83

Figure 26. Activité relative de la lipase IAF5.2 envers différents substrats dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 9 + 0.05 % de $CaCl_2$ et à une température de 50 °C.....85

Figure 27. Activité relative de la lipase IAF5.2 à différents pH dans des tampons 50 mM contenant 0.05 % de $CaCl_2$, à une température de 50 °C avec le *p*-nitrophényl myristate comme substrat.....86

Figure 28. Activité relative de la lipase IAF5.2 à différentes températures (°C) dans le tampon NaOH-glycine 50 mM à pH 10.5 + 0.05 % $CaCl_2$ et le substrat *p*-nitrophényl myristate.....87

Figure 29. Absorbance à 405 nm du *p*-nitrophénol suite à sa libération par la lipase après avoir été incubée une, deux, trois et quatre heures à 90 °C.....89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples d'enzymes d'intérêt industriel et de leurs applications.....17

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques de quelques lipases.....29

Tableau 3. Activité relative de l'enzyme après une pré-incubation d'une heure à 37 °C en présence de divers composés.....90

Tableau 4. Souches bactériennes utilisées.....120

Tableau 5. Plasmides et cosmides utilisés.....120

Tableau 6. Description des amorces utilisées.....121

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2xTY	*tryptone yeast extract*
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
dNTPs	Désoxyribonucléosides triphosphates
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
EGTA	Acide éthylèneglycoltétracétique
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MOPS	Acide 3-morpholinopropanesulfonique
MUF-butyrate	4-méthylumbelliférone-butyrate
pb	Paire de base
PCR	Réactions en chaîne de la polymérase
PEG	Polyéthylène glycol
pmole	Picomole
PMSF	Phénylméthylsulphonyle fluoride
p/v	Poids/volume
rpm	Rotation par minute
SDS	Dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SOC	*Super Optimal Catabolite*
TBE	Tampon Tris borate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tétraméthyl-1, 2-diaminométhane
TES	Acide N-[tris(hydroxyméthyl)-méthyl]-2-aminoéthanesulfonique
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

TSB	*Tryptone Soya Broth*
Ufc	Unités formatrices de colonies
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

INTRODUCTION

Les enzymes d'origine bactérienne actuellement disponibles sur le marché proviennent majoritairement de microorganismes cultivés en laboratoire. Or, on estime à près de 5000 le nombre d'espèces de procaryotes qui auraient été étudiés en laboratoire, sur une population terrienne de 4 à 6 x 10^{30} individus. On sait aussi qu'un gramme de terre contiendrait jusqu'à dix milliards de microorganismes provenant de milliers d'espèces différentes mais qu'entre seulement 0,1 et 1 % des microorganismes présents dans un échantillon de sol sont cultivables en laboratoire (Rossello-Mora et Amann, 2001; Torsvik *et al.*, 1990; Whitman *et al.*, 1998).

En regard de toute cette ressource enzymatique inexploitée, il s'avère crucial d'utiliser d'autres méthodes permettant l'identification de nouvelles enzymes d'intérêt industriel. La métagénomique est une approche utilisée afin d'identifier de nouveaux gènes sans isoler en culture pure l'organisme duquel ils ont issus. Il s'agit de cloner l'ADN directement d'un milieu dans un vecteur puis de cribler la banque de clones par l'expression d'une fonction ou à la recherche d'une homologie de séquence.

Parmi les enzymes d'intérêt industriel se retrouvent les lipases, soit des enzymes appartenant à la famille des α/β hydrolases. Ces enzymes sont très versatiles quant à leurs fonctions; elles catalysent autant des réactions d'hydrolyse que de synthèse telle que les réactions de transestérification et d'interestérification. Les lipases sont utilisées dans les industries du textile, de l'alimentaire, des pâtes et papier, du pharmaceutique, etc. Ce sont des enzymes très spécifiques, qui agissent à des pH alcalins et dont certaines sont actives et stables à haute température en plus de résister aux solvants. Bref, ce sont des biocatalyseurs présentant une gamme de propriétés physico-chimiques dignes du plus grand intérêt de la part des industriels.

L'objectif de ce projet était d'identifier de nouvelles lipases alcalines et thermostables. Une approche métagénomique a été utilisée ici afin d'identifier ces enzymes. L'ADN a été extrait d'un bioréacteur dont la culture fût enrichie et dans lequel la température est demeurée élevée et le pH alcalin. Le criblage des clones issus de la banque métagénomique s'est effectué à l'aide de géloses contenant de la tributyrine. L'isolement de l'enzyme dans les clones positifs a été réalisé par une série de délétions à l'aide d'endonucléases de restriction. Un des gènes responsable de l'activité hydrolytique a été sous-cloné puis exprimé chez *Streptomyces lividans* d'où une enzyme

a été purifiée puis caractérisée. Le présent document fait état d'une revue de littérature sur la métagénomique ainsi que sur les lipases, puis présente la méthodologie utilisée afin d'isoler, exprimer, purifier et caractériser les enzymes. L'isolement de deux enzymes lipolytiques et la purification et caractérisation de l'une d'elles sont présentés sous la forme des résultats et ceux-ci sont discutés dans une dernière partie.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La métagénomique

1.1.1 Définition et historique

La métagénomique se définit comme l'analyse de séquences et de fonctions des génomes d'une communauté de microorganismes prélevée dans un échantillon environnemental (Riesenfeld *et al.*, 2004). Cette approche, qui consiste à cloner directement l'ADN d'un échantillon donné dans un vecteur, a été proposée en 1985 par Norman R. Pace de l'Université du Colorado (Pace *et al.*, 1985). Par contre, ce n'est qu'en 1991 que son utilisation fut rapportée pour la première fois lors de la construction d'une banque avec de l'ADN provenant d'un échantillon marin et de son criblage pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S (Schmidt *et al.*, 1991). L'avènement d'une telle technique a été possible grâce à la diffusion du procédé de réactions en chaîne de la polymérase (PCR) qui permet d'amplifier rapidement l'ADN présentant des séquences conservées ou des gènes entiers à l'aide d'amorces spécifiques.

Une étude métagénomique ne nécessite que trois étapes : l'extraction de l'ADN, son clonage dans un vecteur ainsi que le criblage des clones. L'extraction de l'ADN peut se faire de deux façons. Il est possible d'extraire directement l'ADN du milieu étudié pour ensuite le cloner dans un vecteur (figure 1, B), ou l'on peut également extraire la biomasse du milieu étudié, la cultiver pour ensuite en extraire l'ADN et le cloner aussi dans un vecteur (figure 1, A). Que l'ADN soit obtenu avec l'une ou l'autre des techniques, le spectre de la diversité demeure le même car même si la lyse directe permet le recouvrement de plus d'ADN, ce dernier se retrouve souvent contaminé par des acides humiques en particulier, ce qui nuit à sa manipulation subséquente. De l'autre côté, la première méthode permet le recouvrement de moins d'ADN mais ce dernier présente très peu de contamination (Courtois *et al.*, 2003). Dans les deux cas, l'ADN doit être représentatif de la communauté d'où il provient, il doit être exempt de contaminants et il faut éviter de le briser en de trop petits fragments. En fait, plus il y a de fragments, plus les chances d'en perdre sont élevées, engendrant ainsi une augmentation du nombre de clones à cribler (Schmeisser *et al.*, 2007). Le clonage de l'ADN est possible dans plusieurs types de vecteurs, selon le type de criblage désiré. En ce qui a trait au criblage, il peut se faire au niveau du génome, où l'on compare des séquences quant à l'homologie de domaines conservés (criblage par homologie de séquences). Aussi, on peut faire un criblage au niveau de la fonction, où l'on utilise des milieux réagissant à la présence de certaines enzymes (criblage fonctionnel). Ce sont les deux moyens de cribler les plus fréquemment utilisés parmi plusieurs autres.

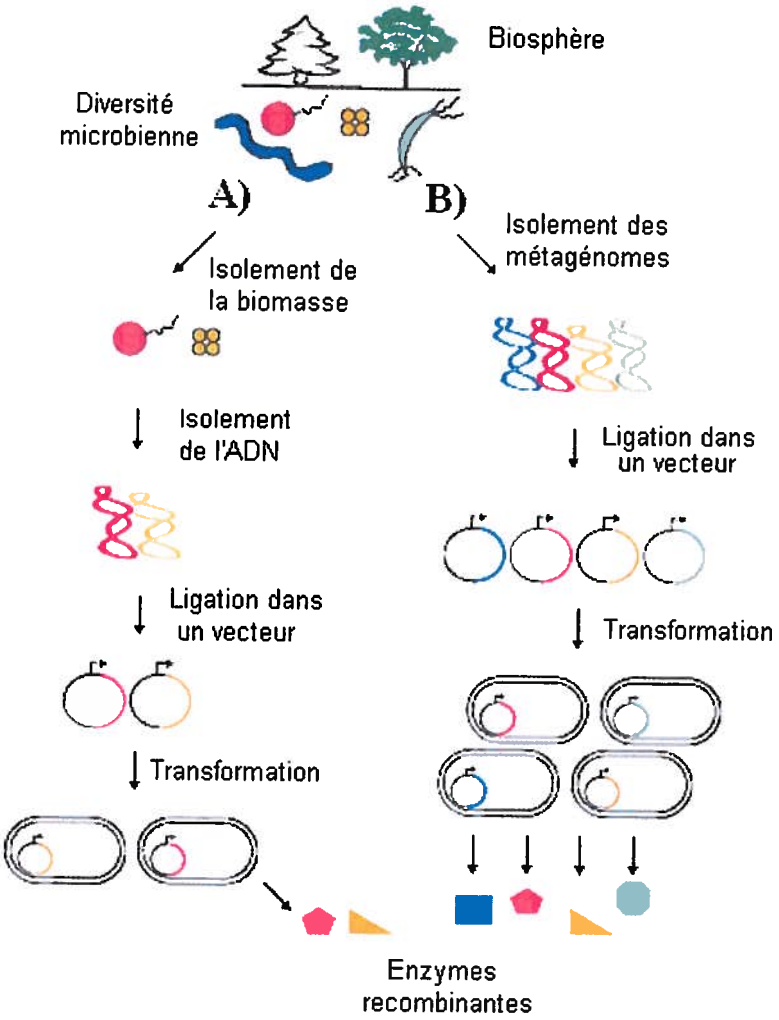


Figure 1 Schématisation d'une étude métagénomique (Lorenz *et al.*, 2002).

A) Extraction de la biomasse puis de l'ADN et **B)** Extraction de l'ADN directement de la biosphère.

1.2 Les étapes d'une étude métagénomique

1.2.1 L'isolement de l'ADN

Une des étapes les plus critiques d'une étude métagénomique est l'isolement de l'ADN d'un échantillon donné. Le clonage de fragments d'ADN de grande taille est souvent recherché car il permet d'identifier des opérons ou des voies métaboliques entières avec un seul clone (Sharma *et al.*, 2005). Parmi les deux façons d'extraire l'ADN, la première implique l'éclatement des bactéries directement dans l'échantillon à l'aide de tampon de lyse et de traitement avec des détergents et des enzymes (Lorenz et Schleper, 2002). Cette technique peut aussi impliquer une agitation mécanique vigoureuse à l'aide de billes de verre ou tout autre matériel pouvant favoriser l'éclatement des cellules (communément appelée « bead beating »). L'ADN est ensuite purifié par une série d'extractions au phénol et au chloroforme puis son intégrité vérifiée par migration sur gel d'agarose. Cette méthode permet le recouvrement de presque la totalité de l'ADN car l'agitation mécanique détruit les parois bactériennes les plus coriaces (Daniel, 2004). Par contre, cette même agitation a pour conséquence la fragmentation de l'ADN en petit fragments d'entre 1 à 50 kilobases (kb) (Lorenz et Schleper, 2002). Ces derniers augmentent considérablement le nombre de clones à cribler ainsi qu'ils diminuent la possibilité d'identifier un opéron ou une voie métabolique complets.

L'autre méthode pour extraire l'ADN demande la séparation physique des cellules bactériennes de la biomasse de l'échantillon, puis l'éclatement des cellules afin d'en libérer l'ADN. De cette façon, la lyse des bactéries est plus douce et peut s'effectuer par un traitement au lysozyme et quelques cycles de congélation et décongélation dans le but de fragiliser les parois et membranes. La purification de l'ADN se fait ensuite par plusieurs cycles d'extraction au phénol et au chloroforme. L'ADN extrait avec cette technique possède un plus haut poids moléculaire (entre 20 kb et plus de 500 kb) et contrairement à l'autre méthode, il présente peu de contaminants tels que protéines, acides humiques, etc. (Cowan *et al.*, 2005; Lorenz et Schleper, 2002; Schmeisser *et al.*, 2007). C'est donc par cette méthode que l'ADN est extrait lorsque le criblage se fait par homologie de séquences. Par contre, ce ne sont pas toutes les cellules qui sont séparées de leur milieu, et parmi les cellules extraites, ce n'est pas la totalité qui sera lysée par cette méthode douce, laissant ainsi une quantité d'ADN non analysée.

1.2.2 Construction d'une librairie métagénomique

Selon la méthode d'extraction de l'ADN utilisée ainsi que le type de criblage visé, l'ADN extrait sera réduit en fragments d'une taille appropriée par une digestion partielle à l'aide d'endonucléases de restriction. Cet ADN sera ligué dans un vecteur de clonage, soit un élément d'ADN capable de se répliquer dans un hôte bactérien de façon épisomale (indépendamment du chromosome). Les vecteurs de clonage les plus couramment utilisés dans une étude métagénomique sont les cosmides, les vecteurs navettes, les fosmides et les chromosomes bactériens artificiels (BAC) (Sharma *et al.*, 2005).

Les cosmides possèdent une séquence *cos* provenant du phage lambda, ce qui leur permet d'être encapsidés. Il s'agit de liguer les cosmides avec l'ADN (formation de concatémères) puis tout ce qui est compris entre deux sites *cos* peut être encapsidé dans une capside vide, le site *cos* étant reconnu par cette dernière. Une fois le cosmide encapsidé, une queue de phage préformée vient s'y accrocher puis l'unité phagique peut être transduite dans l'hôte via la protéine LamB, un récepteur du maltose, et y injecte le contenu de la capside (entre 35 et 45 kb) (Randall-Hazelbauer et Schwartz, 1973). Tout comme les plasmides, les cosmides possèdent une origine de réplication fonctionnelle chez l'hôte choisi, au moins un gène de résistance aux antibiotiques, un promoteur fort (souvent inductible) ainsi qu'un site de clonage multiple.

Les vecteurs navettes sont quant à eux des plasmides ou cosmides qui possèdent au moins deux origines de réplication pour divers hôtes, tandis que les fosmides sont des cosmides auxquels le facteur de fertilité (facteur F, provenant de *Escherichia coli*) a été ajouté. Ce facteur permet le transfert par conjugaison du fosmide via un pilus conjugatif formé à partir d'une bactérie F^+ vers une bactérie F^-, qui ne possède pas le facteur. Les fosmides possèdent également des gènes capables de réguler leur nombre de copies et de s'intégrer au chromosome bactérien. Finalement, les chromosomes artificiels bactériens, dérivés du facteur F, se maintiennent en une seule copie au sein de l'hôte (*E. coli*) et peuvent accueillir un insert d'une longueur de 300 kb.

Le choix d'un vecteur de clonage dépend de la taille des inserts que l'on désire (souvent déterminée par le type de criblage utilisé) ainsi que du nombre de copies désirées. Dans le cas d'un vecteur à copies multiples et d'un criblage fonctionnel, il est possible que l'insert contienne des gènes potentiellement toxiques, d'où l'utilisation de vecteurs inductibles afin de ne pas tuer les clones avant même la détection de l'activité qu'ils contiennent (Riesenfeld *et al.*, 2004).

1.2.3 Le criblage d'une librairie métagénomique

1.2.3.1 L'homologie de séquences

Le criblage par homologie de séquences implique le séquençage à grande échelle de l'ADN d'un échantillon cloné dans un vecteur (figure 2, partie de droite). L'identification de nouveaux gènes ne nécessite pas l'expression de ces derniers dans l'hôte hétérologue (Daniel, 2004). La recherche de gènes d'intérêt s'effectue en comparant les séquences obtenues aux banques de données existantes. Un logiciel de comparaison de séquences utilisé est le « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST), localisé sur le serveur du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Selon le type de comparaison demandé (acides nucléiques ou acides aminés), le serveur identifiera les gènes ou les domaines conservés existants dans les banques de données qui sont homologues à ceux de la séquence soumise.

Le criblage par homologie de séquences sous-entend l'amplification par PCR de l'ADN contenu dans des régions portant des marqueurs phylogénétiques, puis le séquençage subséquent du fragment entier d'où provient le marqueur afin d'identifier les gènes d'intérêt (Handelsman, 2004). Les marqueurs phylogénétiques les plus communément utilisés sont les ADN ribosomaux, surtout ceux codant pour l'ARNr 16S. Il existe plusieurs autres gènes qui contiennent de l'information phylogénétique, comme la gyrase d'ADN, la chaperonine 60, la sous-unité β de l'ARN polymérase et de l'ATPase, le facteur d'élongation TU, le facteur sigma δ^{70}, etc. (Riesenfeld *et al.*, 2004). Par contre, l'hôte utilisé pour la conservation de la banque métagénomique possède aussi ses propres marqueurs qui peuvent interférer (Riesenfeld *et al.*, 2004). Par ailleurs, une autre stratégie utilisée pour le criblage par homologie de séquences est le séquençage au hasard de l'ADN cloné et lors de l'identification d'un gène d'intérêt, la recherche d'un marqueur phylogénétique dans le reste du fragment s'effectue (Handelsman, 2004). Finalement, une voie prometteuse est l'utilisation de la technologie des biopuces afin d'identifier de nouveaux gènes (Daniel, 2004; Sebat *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001). Il s'agit d'attacher à la biopuce des séquences d'ADN conservées représentant soit une espèce recherchée (ex : l'ARNr 16S), soit une séquence ou un gène codant pour une fonction recherchée (ex : gènes impliqués dans le cycle du nitrate). Ensuite, l'ADN marqué issu du métagénome à étudier est ajouté sur la biopuce et l'hybridation est mise en évidence par l'apparition de la fluorescence.

Lorsque le criblage est complété par l'une ou plusieurs de ces méthodes, il y a assemblage des génomes et affiliation de l'ADN extrait à des espèces ou genres connus afin d'établir une abondance relative des genres ainsi qu'afin de construire un arbre phylogénétique. La distribution et la redondance des fonctions dans une communauté, l'organisation génomique ainsi que le

transfert horizontal des gènes sont quelques éléments qui peuvent venir interférer avec l'analyse des génomes (Handelsman, 2004). Par exemple, une espèce dont l'ADN s'extrait facilement et qui contient de nombreux marqueurs phylogénétiques sera peut-être identifiée comme une espèce abondante de l'échantillon, ce qui n'est pas nécessairement représentatif. Par contre, une espèce dont l'ADN cloné ne contient pas de marqueur restera inconnue, un facteur important si on considère par exemple que l'ARNr 16S des procaryotes n'est présent qu'à environ 0.05 % dans tout le génome (Rodriguez-Valera, 2002; Schloss et Handelsman, 2005). Aussi, la comparaison de séquences nucléiques ou protéiques à celles des banques de données peut sembler contradictoire au but même de la métagénomique, qui est la recherche de nouveaux gènes. En effet, cela suppose que la séquence soumise soit semblable aux séquences existantes et que ces séquences existantes soient incluses dans les banques de données. En effectuant un criblage par homologie de séquence, il est donc peu probable d'identifier un gène ou une séquence entièrement nouveaux ou très peu semblables aux séquences existantes. De plus, la comparaison des séquences avec les bases de données pour identifier des gènes intéressants (BLAST) ainsi que l'assemblage des génomes demande des ressources humaines, matérielles et temporelles non négligeables.

1.2.3.2 Le criblage fonctionnel

Le criblage fonctionnel pour sa part fait référence à la recherche d'une fonction codée par l'ADN exogène et exprimée chez un hôte hétérologue (figure 2, partie de gauche). Un des moyens préconisés pour le criblage est l'utilisation de milieux solides contenant des substrats dont l'hydrolyse par l'enzyme recherchée est facilement visualisable. La détection d'une activité visée ici sous-entend une bonne transcription de l'ADN puis traduction par la machinerie métabolique de l'hôte (Schloss et Handelsman, 2003). De plus, la protéine formée doit être repliée correctement, résistante aux protéases et dans certains cas, elle nécessite des cofacteurs spécifiques pour être exprimée (Gabor *et al.*, 2004). Afin de détecter une activité métabolique sur un milieu de criblage solide, il faut idéalement que le produit du gène soit sécrété ou attendre la diffusion passive du contenu cytoplasmique dans le milieu environnant qui arrive lors de la lyse cellulaire. Autrement, il est possible d'utiliser un vecteur capable d'induire une lyse cellulaire programmée. Cependant, lorsqu'il y a lyse, il est moins aisé de séparer les constituants cellulaires afin d'isoler la protéine d'intérêt. Contrairement au criblage par homologie de séquences, ce type de criblage permet de découvrir des gènes totalement nouveaux (donc sans marqueurs phylogénétiques connus ou sans domaines conservés). Par contre, la plus grande contrainte du criblage fonctionnel demeure l'expression chez un hôte hétérologue de la protéine recherchée.

1.2.3.3 Les bactéries hôtes

Une étude a démontré qu'environ 40 % des gènes d'une bactérie quelconque sont exprimés chez *Escherichia coli*, la bactérie hôte la plus communément utilisée (Gabor *et al.*, 2004). Cette bactérie possède plusieurs qualités, dont celle d'incorporer un vecteur facilement, par transformation, transduction ou conjugaison. Aussi, son génome est entièrement connu ce qui la rend aisément modifiable afin d'introduire des gènes exprimant d'autres facteurs sigma, des gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt) rares comme celui de l'isoleucine (AUA) ou de l'arginine (AGA, AGG, GGG), etc. (Lorenz *et al.*, 2002; Riesenfeld *et al.*, 2004). Ces modifications génétiques facilitent l'expression de plus de gènes hétérologues. Par ailleurs, c'est une bactérie communément employée pour la production à grande échelle de protéines hétérologues et dans la fermentation industrielle car son taux de croissance est rapide (Daniel, 2004). Par contre, comme c'est une bactérie Gram négative, elle possède un espace périplasmique dans lequel sont sécrétées les protéines possédant un peptide signal. Si l'on recherche une activité métabolique visible sur un milieu solide, il se peut que la protéine ciblée ne soit pas sécrétée de façon extracellulaire, ce qui rend difficile sa détection. Face à cette difficulté de sécrétion, d'autres hôtes sont utilisés seuls ou en combinaison avec *E. coli*.

Les bactéries Gram positif du genre *Streptomyces* sont aussi utilisées car ce groupe produit beaucoup de métabolites secondaires, tels que les antibiotiques (Daniel, 2004). De cette façon, il est possible que ce genre possède une machinerie métabolique plus propice à l'expression de protéines hétérologues. De plus, les protéines produites sont sécrétées dans le milieu environnant, ce qui les rendent plus aisément détectables à l'aide de milieux appropriés. La croissance des *Streptomycètes* est cependant plus laborieuse que celle de *E. coli* ou de *Bacillus*. Le genre *Bacillus* est lui aussi utilisé en tant que représentant des Gram positif, mais il sécrète plusieurs protéases ainsi que d'autres enzymes non désirables lors d'un criblage fonctionnel.

1.2.3.4 Les autres techniques de criblage

Il existe d'autres techniques outre le criblage fonctionnel et par homologie de séquences afin d'identifier de nouveaux gènes. L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) peut être utilisée où l'expression de l'ARNr 16S est détectée à l'aide de sondes spécifiques aux régions conservées de l'ARNr 16S de certaines espèces (Leveau *et al.*, 2004). Aussi, l'hybridation par suppression (« suppressive substractive hybridization ») où l'ADN de deux communautés de deux environnements semblables est hybridé en vue d'en déceler les différences représente un autre moyen de cribler une banque métagénomique (Galbraith *et al.*, 2004). Une autre technique fait

appel au criblage par induction de l'expression génique par un substrat à l'aide de la protéine fluorescente verte située dans le vecteur de clonage de la banque (Cowan *et al.*, 2004; Uchiyama *et al.*, 2004; Ward, 2006). Un premier criblage élimine les clones auto-fluorescents, puis les clones restants sont induits à l'aide d'un substrat déterminé où la fluorescence est recherchée, ce qui permet un criblage fonctionnel. Finalement, le criblage par complémentation a été utilisé à l'aide de souches mutées pour certains gènes et où les clones possédant des gènes homologues complémentaires ont été détectés par le rétablissement de la fonction perdue (Entcheva *et al.*, 2001; Majernick *et al.*, 2001).

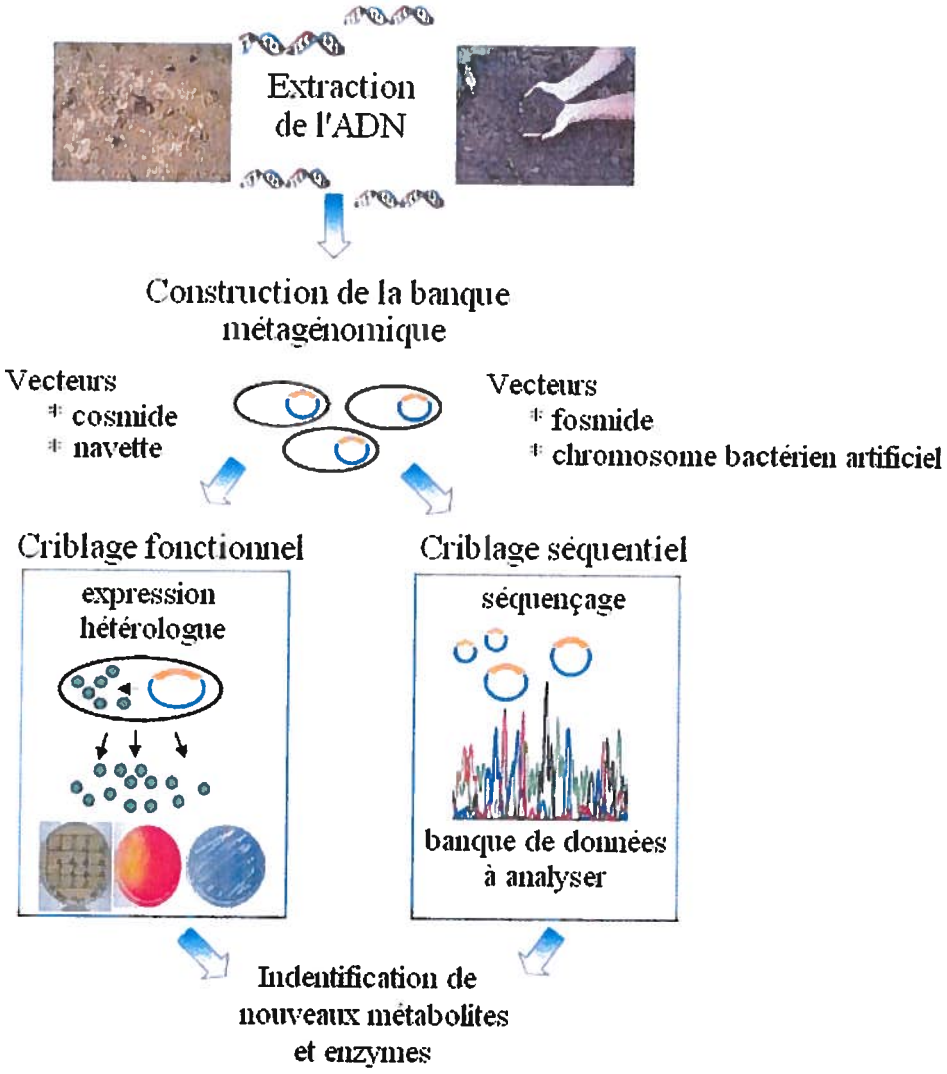


Figure 2 Schématisation du criblage fonctionnel et du criblage par homologies de séquences (Schmeisser *et al.*, 2007).

1.2.4 Les apports de l'approche métagénomique

Face au plafonnement de la découverte de nouvelles enzymes par l'isolement classique des microorganismes en culture pure, l'analyse métagénomique ouvre la voie à l'étude de nouveaux milieux et à l'identification de nouveaux gènes. Depuis, plusieurs environnements ont été étudiés via cette méthode, tels que le sol, les habitats aquatiques, la cavité orale, les fèces, les milieux hospitaliers, etc. (Breitbart *et al.*, 2003; Coque *et al.*, 2002; Diaz-Torres *et al.*, 2003; Schmeisser *et al.*, 2003). La métagénomique sert aussi à la construction d'arbres phylogénétiques qualifiant rapidement la diversité bactérienne d'une communauté dans un environnement donné. Aussi, elle permet de comparer la diversité d'un échantillon à un autre et d'établir l'abondance relative de chaque groupe taxonomique présent. Elle peut aussi être utilisée afin d'étudier les gènes un à un, des voies métaboliques (ex : synthèse d'antibiotiques), des organismes en entier ou l'ensemble d'une communauté (Riesenfeld *et al.*, 2004). Parmi les exemples les plus célèbres, l'étude d'un biofilm provenant de l'eau de drainage des mines de fer, soit un environnement hostile dans lequel le pH se situe entre 0 et 1, la température à 43 °C et où il y a beaucoup de métaux lourds tels que le fer, le zinc et le cuivre (Tyson *et al.*, 2004). L'étude de cette communauté précise a permis d'identifier l'espèce dite clé de voûte, soit celle dont dépendent tous les autres et qui est ici responsable de la fixation de l'azote. La métagénomique a aussi son utilité en archéologie, si l'on cite par exemple la comparaison de l'ADN d'ours contemporains à celui extrait d'une caverne où ils vivaient il y a 40 000 ans (Noonan *et al.*, 2005). Aussi, autrefois très difficiles à analyser dû à leur interdépendance, les symbiotes peuvent maintenant être étudiés à l'aide de la métagénomique (Abbot *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2003; Cannon, 2003; Hughes *et al.*, 1997; Piel, 2002; Preston *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'étude des communautés permet de mettre en évidence la communication inter-espèce via l'analyse des molécules du *quorum sensing* (Andersen *et al.*, 2001; Goh *et al.*, 2002). Finalement, la plus grande étude métagénomique est sans aucun doute celle de la communauté bactérienne de la mer des Sargasses où 1,045 milliard de paires de bases ont été séquencées, 1800 espèces ont été identifiées dont 148 appartenant à des nouveaux phylotypes, et 1,2 million de nouveaux gènes ont été découverts (Venter *et al.*, 2004).

1.2.5 La limite d'une étude métagénomique

Une étude métagénomique implique l'extraction de beaucoup d'ADN du milieu étudié et l'analyse de nombreux clones afin de couvrir tout le métagénome (Riesenfeld *et al.*, 2004). Le criblage résultant est donc fait à grande échelle et principalement de façon automatisée. Lors de la recherche d'une ou de plusieurs activités spécifiques, il faut cribler beaucoup de clones avant

d'obtenir des clones positifs. Statistiquement, pour une librairie contenant des inserts de moins de 10 kb, il faudrait cribler entre 10^5 et 10^6 clones afin d'avoir un clone positif (Henne *et al.*, 1999). Aussi, en utilisant *E. coli* comme hôte, le nombre de clones positifs a été identifié comme étant moins de 0,01 % par criblage (Cowan *et al.*, 2005). Afin d'augmenter le nombre de résultats positifs, il est intéressant non pas d'optimiser les méthodes de criblage mais plutôt d'enrichir une culture en vue de privilégier un métagénome contenant des bactéries présentant les gènes recherchés et exprimant les activités enzymatiques ciblées.

1.3 L'enrichissement de bioréacteurs

L'enrichissement de cultures en bioréacteur est une technique complémentaire à la métagénomique qui permet d'obtenir plus de clones positifs recherchés. Le principe de l'enrichissement peut s'expliquer comme suit : en fournissant une source de carbone à un inoculum bactérien initial, il y aura sélection des microorganismes possédant des gènes impliqués dans l'utilisation de ce substrat spécifique. Ainsi, l'enrichissement peut se faire dans un milieu fermé et contrôlé. Cela permet de créer des conditions variées de température et de pH dans le but de favoriser la croissance de microorganismes produisant des enzymes stables dans ces conditions. De cette façon, la banque métagénomique contiendra vraisemblablement plus d'ADN contenant les gènes recherchés.

Le premier enrichissement de culture en bioréacteur a été fait sur du gazon séché en laboratoire dans le but d'identifier de nouvelles cellulases (Healy *et al.*, 1995). Depuis, plusieurs autres types d'enrichissements ont été réalisés dont l'ADN extrait a servi à la création d'une banque métagénomique afin d'identifier de nouvelles enzymes. L'exemple de criblage par complémentation afin d'isoler des gènes impliqués dans la synthèse de la biotine a été fait à partir d'ADN issu d'une culture enrichie avec de l'avidine (Entcheva *et al.*, 2001). D'autres enzymes ont été identifiées par l'enrichissement, comme des β-agarases, des 4-hydroxybutyrate déshydrogénase, des diols déshydratases, des amidases, etc. (Knietsch *et al.*, 2003; Voget *et al.*, 2003; Ward, 2006).

L'inconvénient avec l'enrichissement de cultures est la perte de la diversité au profit des microorganismes à croissance rapide (Daniel, 2004). En revanche, une étude démontre que, pour avoir 20 clones positifs, il a fallu cribler 1 200 000 clones (culture enrichie) comparativement à 2 100 000 clones pour le même échantillon mais non enrichi, ce qui signifie une réduction de coûts substantielle (Daniel, 2004; Knietsch *et al.*, 2003). La perte de diversité est donc compensée

par le nombre réduit de clones à cribler afin d'obtenir les enzymes recherchées. Par contre, les difficultés rencontrées au niveau de l'extraction de l'ADN ainsi qu'au niveau du criblage demeurent identiques à celles d'une étude métagénomique standard.

La métagénomique est inéluctablement la voie à suivre afin d'identifier de nouveaux gènes sans cultiver en culture pure l'organisme duquel ils proviennent. Elle résout les problèmes de propriété intellectuelle car elle possède la capacité d'identifier des gènes vraiment inconnus (Langer *et al.*, 2006). C'est dans cette optique, combinée à celle de l'augmentation de la demande pour des produits écologiques, que les industries s'orientent afin d'offrir sur le marché des produits qui font parties des biotechnologies blanches, contribuant ainsi à une gestion durable de l'environnement. Elles sous-entendent des bénéfices substantiels pour l'environnement, les consommateurs et l'industrie. Les biotechnologies blanches peuvent réduire la pollution et la quantité de déchets, diminuer la consommation d'énergie, de matières premières et d'eau, conduire à une meilleure qualité des produits alimentaires, créer des matériaux nouveaux et des biocarburants à partir des déchets ainsi qu'apporter une alternative à certains procédés industriels chimiques (EuropaBio, 2008; Lorenz et Eck, 2005). La recherche d'enzymes pour les biotechnologies blanches se fait selon l'activité recherchée, la stabilité de l'enzyme, sa spécificité ainsi que son efficacité (Langer *et al.*, 2006).

1.4 Les enzymes industrielles

Les enzymes sont utilisées dans des procédés de fabrication depuis des milliers d'années. Que ce soit pour la préparation de la nourriture quotidienne comme le pain et le fromage ou afin d'améliorer notre santé comme pour la production d'insuline et d'antibiotiques, l'intérêt envers les enzymes ne cesse de grandir. En effet, ces biocatalyseurs offrent beaucoup d'avantages car ils sont spécifiques, ils réduisent la quantité de déchets générés en plus d'offrir un traitement doux et sont bien sûr biodégradables (Hasan *et al.*, 2006). La disponibilité de souches et de vecteurs d'expression ainsi que les récents progrès en mutagénèse dirigée et en fermentation industrielle permettent dorénavant la production d'enzymes à grande échelle (Kirk *et al.*, 2002). Les revenus liés au marché des enzymes industrielles en 2004 ont été estimés à deux milliards de dollars (Rajan, 2004). Les enzymes sont retrouvées chez les plantes, les animaux, les mycètes, les protistes et les procaryotes. L'attention sera portée ici sur les enzymes d'origine bactériennes dû à

leur grande diversité, à la facilité et la rapidité de leur production, au faible coût reliés à leur obtention, à leur stabilité ainsi qu'à leur innocuité (Hasan *et al.*, 2006).

La plupart des enzymes que l'on retrouve sur le marché possèdent une action hydrolytique. Les protéases demeurent les plus fréquemment utilisées et on les retrouvent entre autres dans l'industrie des détergents et dans celle des produits laitiers (Kirk *et al.*, 2002). Ensuite viennent les carbohydrases, représentées par les amylases et les cellulases, impliquées entre autres dans l'industrie de l'alimentation, des textiles et des détergents. Le tableau 1 présente plusieurs enzymes produites de façon industrielle ainsi que quelques applications dans lesquelles elles interviennent. Parmi les enzymes hydrolytiques, certaines font parties d'une famille spécifique partageant une structure définie et un mécanisme d'action similaire, la superfamille des α/β hydrolases.

Tableau 1 Exemples d'enzymes d'intérêt industriel et de leur applications

Enzymes	Quelques applications
α/β-amylase	Détergents, alimentaire, biocarburants, textile, pâtes et papier
Pullulanase	Biocarburants
Chitinase	Alimentaire, cosmétiques, agriculture, pâtes et papier
Xylanase	Biocarburants, alimentaire, agriculture, pâtes et papier
Cellulase	Détergents, textile, pâtes et papier
Nitrilase	Synthèse organique
Phytase	Agriculture
Protéase	Détergents, biocarburants, alimentaire, pâtes et papier
Lipase	Détergents, alimentaire, pâtes et papier
Mannase	Détergents, alimentaire
Lactase	Alimentaire
Pectate lyase	Textile, alimentaire
Phospholipase	Dégommage, alimentaire
Laccase	Alimentaire, textile
Transglutaminase	Alimentaire
Peroxidase	Textile, antimicrobiens

Tableau inspiré de Cowan *et al.* (2005), Haki et Rakshit (2003) et Kirk *et al.* (2002)

1.4.1 La superfamille des α/β hydrolases

La superfamille des α/β hydrolases est composée de diverses enzymes bactériennes qui ont toutes en commun une structure précise. Les lipases et certaines protéases, estérases, déhalogénases, peroxydases ainsi que certaines hydrolases d'époxides font parties de cette famille (Nardini et Dijkstra, 1999). La structure commune aux α/β hydrolases (figure 3) comprend au minimum cinq feuillets β, tous parallèles sauf le feuillet β2, cernés de part et d'autre par des hélices α (Ollis *et al.*, 1992). La forme globale est de type canonique, et seule l'hélice αC est conservée à travers la famille des α/β hydrolases. Les enzymes inclus dans cette famille ont une taille variant entre 197 et 582 résidus d'acides aminés (Nardini et Dijkstra, 1999). Le site catalytique des enzymes de cette famille est constitué d'une triade conservée composée d'un résidu nucléophile, d'un résidu acide ainsi que d'une histidine (Heikinheimo *et al.*, 1999; Nardini et Dijkstra, 1999; Ollis *et al.*, 1992). Le résidu nucléophile qui est, par définition, attiré envers les charges positives peut être une sérine, une cystéine ou un acide aspartique. Ce résidu est toujours situé à l'extrémité C-terminale du feuillet β5 dans ce qu'on appelle l'arc nucléophile. Il est inclus dans une séquence consensus Pt-X-**Nu**-X-Pt, où Pt signifie petit résidu (comme la glycine), X, n'importe quel résidu et Nu pour résidu nucléophile (Nardini et Dijkstra, 1999). Le résidu acide est quant à lui l'acide aspartique ou l'acide glutamique et on le retrouve après le feuillet β7. L'histidine est le seul acide aminé absolument conservé chez toutes les enzymes de cette famille et il est situé après le dernier feuillet β. On retrouve aussi deux autres résidus impliqués dans l'activité hydrolytique, formant une poche oxanion (ou anneau oxyanion) qui stabilise les intermédiaires tétraédriques formés pendant la réaction. Le premier résidu de cette poche est situé entre le feuillet β3 et l'hélice αA, tandis que le second résidu est situé juste après le résidu nucléophile (feuillet β5) (Heikinheimo *et al.*, 1999; Nardini et Dijkstra, 1999).

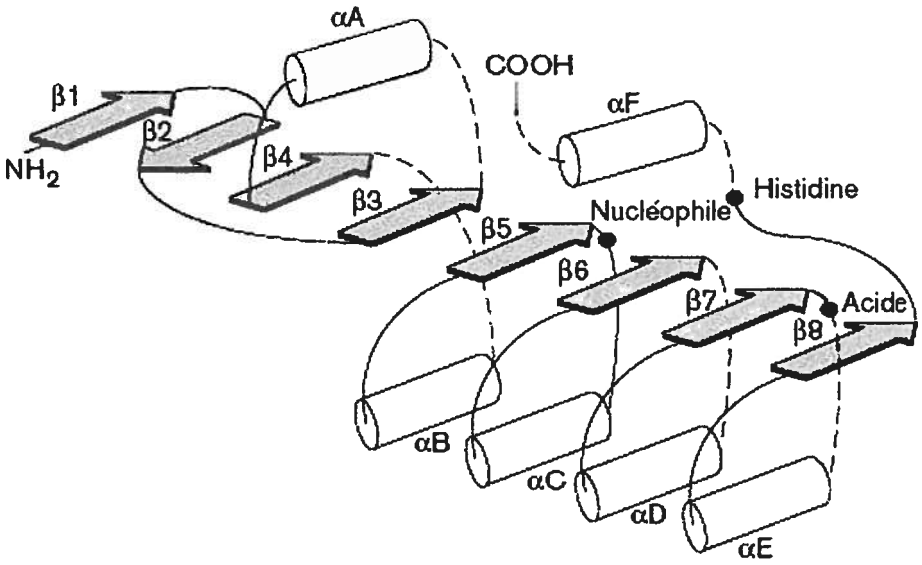


Figure 3 Structure secondaire générale des protéines de la superfamille des α/β hydrolases (Ollis *et al.*, 1992)

1.4.2 Le mécanisme d'action des α/β hydrolases

Peu importe l'enzyme de la famille des α/β hydrolases, la séquence de déroulement de l'action hydrolytique est toujours la même. Les résidus acide et nucléophile du site catalytique sont liés par des ponts hydrogènes à l'histidine. Lors de l'hydrolyse d'un lien ester par une lipase, l'oxygène du résidu nucléophile attaque le carbone impliqué dans le lien ester, ce qui mène à la formation d'un intermédiaire tétraédrique (figure 4, réaction 1). L'histidine a pour rôle d'augmenter la nucléophilicité de l'oxygène du résidu nucléophile, ce qui mène à la protonation de l'anneau imidazole de l'histidine qui devient chargée positivement. Cette nouvelle charge positive est stabilisée par la charge négative du résidu acide (figure 4, réaction 2). L'intermédiaire tétraédrique est stabilisé par les ponts hydrogènes fait avec les liens amines provenant des résidus des anneaux oxanions. Cette cascade de réactions mène à la libération d'un alcool (figure 4, réaction 3) puis par l'attaque d'un ion hydroxyle, l'acide gras est libéré et l'enzyme régénérée (figure 4, réaction 4).

1.4.2.1 Les enzymes lipolytiques

Parmi les membres de la superfamille des α/β hydrolases, les enzymes lipolytiques (E.C. 3.1.1) constituent une classe dont le potentiel enzymatique est d'un grand intérêt pour les industries. La majorité des estérases et toutes les lipases font partie de cette superfamille (Fojan *et al.*, 2000). Leur résidu nucléophile est une sérine et elles hydrolysent les triglycérides en acides gras et en glycérol. Les lipases et les estérases bactériennes peuvent être classifiées en huit familles et en plusieurs sous-groupes (Arpigny et Jaeger, 1999). Le classement s'effectue selon l'homologie des séquences et non selon le genre et l'espèce. Aucun genre n'a pu être associé à une famille spécifique. Certaines familles possèdent un motif non-conventionnel, tel que le motif G-D-S-L (famille II) ainsi que le motif A-X-S-X-G (famille I, genre *Bacillus*). Le motif le plus couramment répandu chez les enzymes lipolytiques est de type G-X-S-X-G. La masse moléculaire de ces enzymes est variable et certaines ont besoin de chaperonne afin d'être repliées correctement. Finalement, quelques lipases et estérases (familles IV et VII) présentent une séquence d'acides aminés similaire à celles d'organismes eucaryotes.

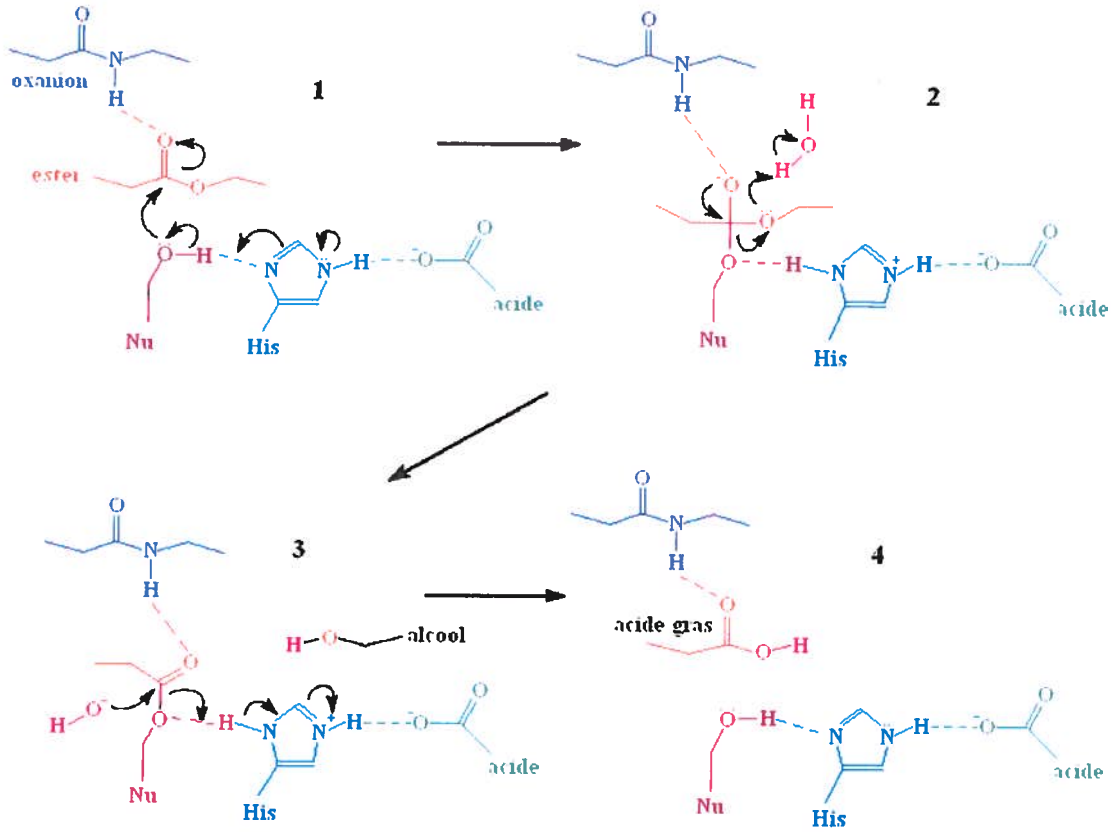


Figure 4 L'hydrolyse d'un lien ester par une lipase, adaptée de Jaeger *et al.*, 1994

1.4.3 Les estérases

Les estérases (E.C. 3.1.1.1) ont une préférence marquée envers les triglycérides ayant de courtes chaînes latérales d'acide gras. Les substrats de ces enzymes sont donc relativement solubles dans l'eau et se distribuent de façon homogène, ce qui signifie que la cinétique d'une réaction catalysée par une estérase répond aux équations de Michaelis-Menten. Outre leur spécificité de substrat, les estérases présentent des motifs permettant de les différencier des lipases. Tout d'abord, la sérine active est souvent située au sein de la séquence G-E-S-A-G, mais cette séquence peut aussi être retrouvée chez certaines protéases et lipases. Cependant, ce même motif est inclus dans une large séquence consensus unique aux estérases : F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G (Cygler *et al.*, 1993; Fojan *et al.*, 2000).

1.4.4 Les lipases

1.4.4.1 Généralités

Tout comme les estérases, les lipases (E.C. 3.1.1.3) possèdent une séquence dans lequel est inclus un motif de type G-X-S-X-G. Cette séquence consensus se lit comme suit : [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-X-G-[GSTAC] (Chapus *et al.*, 1988; Fojan *et al.*, 2000). Globalement, une lipase se définit comme faisant partie de la superfamille des α/β hydrolases avec au moins cinq feuillets β, dont la triade catalytique conservée est composée d'une sérine, d'un acide et d'une histidine et où la sérine est souvent incluse dans le motif G-X-S-X-G (Schmid et Verger, 1998; Villeneuve *et al.*, 2000).

Les lipases agissent sur de longues chaînes d'acide gras au sein d'un triglycéride. Les triacylglycérols sont des lipides non chargés et ils sont peu solubles. En deçà de la concentration micellaire critique du substrat, c'est-à-dire à une concentration trop faible de triglycérides pour qu'il y ait émulsion, la vitesse d'hydrolyse des lipases est très faible. Par contre, au dessus de cette concentration, les molécules du substrat se regroupent et forment des micelles, ce qui créé une interface lipide-eau. L'activité des lipases, favorisée par cette émulsion, augmente drastiquement à ce point. C'est le phénomène de l'activation interfaciale (Sarda et Desnuelle, 1958). L'activité lipolytique des lipases s'effectuant à cette interface, la vitesse de l'hydrolyse est directement proportionnelle à la concentration de molécules de substrat à cette interface (Jaeger *et al.*, 1994). Comme la concentration de molécule de substrat présentes à cette interface n'est pas la même que la concentration de substrat dans le mélange réactionnel, on ne peut définir la cinétique d'une réaction catalysée par une lipase avec le modèle de Michaelis-Menten. L'utilisation de ce modèle n'est possible que dans un milieu homogène tandis que les lipases agissent en fait dans un milieu

en équilibre entre une phase monomérique, micellaire et émulsifiée du mélange réactionnel (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger et Reetz, 1998). Les estérases, ne requérant pas cette activation interfaciale pour être actives, sont donc sujettes aux lois de Michaelis-Menten. Cette particularité, unique aux lipases, souligne l'importance que certains résidus de la poche catalytique soient hydrophobes afin de pouvoir interagir avec le substrat.

C'est dans cette optique que la région catalytique de plusieurs lipases est protégée par une structure agissant comme un couvercle et qui se retire lorsque la lipase se trouve en présence de son substrat. Ce couvercle, unique aux lipases, ne se retrouve pas chez toutes les lipases. Il est composé d'une hélice α amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui, lorsqu'il recouvre le site actif (forme fermée de l'enzyme), présente sa surface hydrophobe orientée vers le site tandis que sa surface hydrophile est pointée vers l'eau (Derewenda *et al.*, 1992; Grochulski *et al.*, 1994; Schrag *et al.*, 1991). La résolution de structures cristallographiques des lipases de *Geotrichium candidum* et de la lipase pancréatique humaine a permis de mettre en évidence l'existence de cette hélice amphiphile (Miled *et al.*, 2000; Schrag *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 1990). Lorsque la lipase se retrouve en présence d'une interface lipide-eau, un changement de conformation de l'enzyme a lieu où l'hélice α se déplace et expose le site actif de l'enzyme (forme ouverte de l'enzyme). En se déplaçant, l'hélice expose aussi sa surface hydrophobe, auparavant enfouie dans la poche catalytique, permettant ainsi son interaction avec l'interface également hydrophobe, ce qui accentue les interactions entre l'enzyme et son substrat (Overbeeke *et al.*, 1999). Finalement, le déplacement de l'hélice permet la formation de ponts d'hydrogène entre les résidus de l'anneau oxanion et ceux des intermédiaires tétraédriques (Beer *et al.*, 1996; Bocca *et al.*, 2003; Derewenda *et al.*, 1994).

Cependant, certaines lipases sont capables d'hydrolyser un triglycéride même si ce dernier se retrouve en deçà de sa concentration micellaire critique. De même, lorsque la concentration micellaire critique est atteinte, la vitesse d'hydrolyse du substrat n'augmente pas de façon aussi brusque que lorsqu'on observe le phénomène de l'activation interfaciale (Nini *et al.*, 2001). Une hypothèse invoquée est la présence, en solution aqueuse, d'un équilibre entre la forme ouverte et fermée de l'enzyme. Cet équilibre pourrait s'expliquer par la démonstration que même en dessous de la concentration micellaire critique, les molécules d'un substrat ont tendance à former de petits agrégats qui permettent une étroite interface lipide-eau (Entreeeangles et Desnuelles, 1968). D'autre part, certaines lipases possèdent un couvercle mais ne démontre pas d'activation interfaciale, comme c'est le cas de la lipase de *Pseudomonas glumae* et de celle de *Candida antartica* (type B) (Noble *et al.*, 1993; Uppenberg *et al.*, 1994). La présence d'un couvercle et l'activation interfaciale ne sont donc pas des critères absolus afin de déterminer si

une enzyme appartient à la famille des lipases. La capacité d'une enzyme à hydrolyser des triglycérides contenant de longues chaînes d'acide gras demeure le moyen le plus sûr d'identifier une lipase (Verger, 1997).

1.4.4.2 Réactions catalysées par les lipases

Les lipases catalysent des réactions d'hydrolyse ainsi que de synthèse (figure 5). La réaction d'hydrolyse est celle d'un lien ester, en présence d'eau, afin de libérer un alcool (le glycérol) et un acide gras (acide carboxylique, réaction commune à la superfamille des α/β hydrolases). La lipase s'attaque aux triacylglycérols, soit des molécules qui possèdent deux groupements hydroxyles primaires (carbones 1 et 3) et un groupement hydroxyle secondaire (situé sur le carbone 2). Les lipases peuvent être classifiées en trois groupes selon leur spécificité de réaction. Le premier groupe effectue une réaction non-spécifique, c'est-à-dire que le triglycéride est clivé au hasard (lien ester sur le carbone 1, 2 ou 3 du glycérol). La plupart des lipases bactériennes appartiennent à ce groupe car elles ont une préférence pour le clivage des liens primaires mais peuvent aussi cliver les liens secondaires. Certaines lipases, celles du deuxième groupe, peuvent hydrolyser seulement les liens esters dits primaires (1,3-spécifiques), ce qui libère de l'acide gras, du 1,2(2,3)-diacylglycéride et du 2-monoacylglycéride (Gupta *et al.*, 2004). Finalement, aucune lipase d'origine bactérienne n'appartient au troisième groupe, soit celui composé de lipases ayant une spécificité unique pour un seul type de liens. Par exemple, la lipase de *Penicillium roqueforti* est spécifique par rapport aux acides gras à courtes chaînes (Egloff *et al.*, 1995). Parmi les autres types de réactions catalysées par les lipases se retrouvent celles de synthèse, possibles uniquement en absence de molécules d'eau (Saxena *et al.*, 2003). Les réactions de synthèse sont composée de l'estérification (figure 5, iia) et de la transestérification, elle-même divisée en trois réactions, soit l'interestérification (figure 5, iib), l'alcoolyse (figure 5, iic) et l'acidolyse (figure 5, iid).

(i) Hydrolyse

$$RCOOR' + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + R'OH$$

(ii) Synthèse

(a) Estérification

$$RCOOH + R'OH \Leftrightarrow RCOOR' + H_2O$$

(b) Interestérification

$$RCOOR' + R''COOR^* \Leftrightarrow RCOOR^* + R''COOR'$$

(c) Alcoolyse

$$RCOOR' + R''OH \Leftrightarrow RCOOR'' + R'OH$$

(d) Acidolyse

$$RCOOR' + R''COOH \Rightarrow R''COOR' + RCOOH$$

Figure 5 Réactions catalysées par les lipases (Gandhi, 1997).

1.4.4.3 Cinétique d'une réaction catalysée par une lipase

La réaction enzymatique catalysée par une lipase sur un substrat insoluble se déroule au niveau d'une interface lipide-eau. Le milieu réactionnel est biphasique et il en résulte une cinétique d'hydrolyse particulière. Un modèle en deux étapes a été proposé par Verger et de Haas en 1976 afin de décrire ce type de réactions (Verger et de Haas, 1976). La première étape consiste en l'adsorption de l'enzyme à l'interface lipide-eau, ce qui permet l'activation de l'enzyme via le déplacement de l'hélice recouvrant son site actif, communément appelée activation interfaciale. Lorsque l'enzyme est activée, il y a formation d'un complexe entre cette dernière et son substrat. Ce complexe est soumis au modèle de Michaelis-Menten « interfacial », c'est-à-dire que les paramètres cinétiques peuvent être calculés en utilisant ce modèle mais la concentration du substrat doit être exprimée en moles par unités de surface et non par unités de volume. En effet, dans le cas d'une réaction en milieu homogène, la concentration du substrat dans le mélange réactionnel est uniforme et se calcule dans le volume total de la réaction. Dans le cas d'une réaction en milieu biphasique, les molécules du substrat ne sont pas distribuées de façon homogène dans le milieu donc il faut tenir compte uniquement de la surface interfaciale, soit sur laquelle sont distribuées uniformément les molécules du substrat. Ce modèle a été contre-vérifié à l'aide du modèle cinétique de la double-réciproque de Lineweaver et Burk. En utilisant deux types d'émulsions d'huile d'olive, l'une fine et l'autre grossière, deux pentes différentes ont été calculées lorsque l'activité était exprimée en fonction de la quantité de substrat (donc du volume) dans le milieu. Or, lorsque l'activité fut exprimée en fonction de l'aire interfaciale de l'émulsion, les droites étaient confondues (Benzonana et Desnuelle, 1965).

Le mécanisme décrivant le mieux la cinétique d'une réaction catalysée par une lipase est celle du système à double déplacement Bi Bi (ping-pong Bi Bi) (Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001; Chulalaksananukul *et al.*, 1990; Paiva *et al.*, 2000). Ce système implique deux substrats ainsi que deux produits lors de la réaction (appellation Bi Bi). Si l'on prend le cas de l'hydrolyse d'un triacylglycérol par une lipase, les deux substrats sont le triglycéride et l'eau (précision : le substrat d'une lipase est le triglycéride mais la réaction demande l'interaction d'une molécule d'eau) et les produits formés, un acide gras et un alcool. La réaction se trouve en équilibre entre les substrats et les produits; elle est donc réversible. Le mécanisme de ping-pong réfère au principe que le départ du premier produit de la réaction est forcé par l'arrivée du second substrat qui lui, va être transformé en un second produit qui sera libéré lors de l'arrivée d'une autre molécule de substrat, et ainsi de suite. Chaque liaison d'un substrat permet la fixation du substrat suivant grâce aux nouvelles liaisons disponibles après le relâchement d'un produit (le produit étant une version

modifiée du substrat initial, certains atomes ou groupements restent temporairement au sein du site actif).

1.4.4.4 Caractéristiques physico-chimiques des lipases et applications

Les lipases sont utilisées dans les détergents, les dégraissants, dans l'industrie de l'alimentation et du textile, dans les pâtes et papier, dans les secteurs pharmaceutique et cosmétique, etc. (Gandhi, 1997; Jaeger *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001). De façon naturelle, les organismes vivants utilisent les lipases afin de transformer la nourriture et les lipides en source d'énergie (Schmid et Verger, 1998). Les utilisations variées que les lipases offrent sont possibles grâce à leurs propriétés physico-chimiques uniques. En effet, les lipases sont stables dans les solvants organiques, elles ne requièrent pas de cofacteurs, elles possèdent une action spécifique et sont énantiosélectives (Jaeger et Reetz, 1998). Le tableau 2 présente quelques lipases et leurs caractéristiques physico-chimiques.

De façon générale, les lipases d'origine bactérienne agissent dans un large spectre de pH (4 à 11) mais leur pH optimal demeure neutre ou légèrement alcalin (Lawrence, 1967). Les lipases agissant à des pH alcalins sont très recherchées par les industries car elles peuvent être utilisées dans les détergents. Environ 1000 tonnes de lipases sont ajoutées dans les 13 milliards de tonnes de détergents approximativement produits chaque année (Jaeger et Reetz, 1998). Les lipases utilisées à cette fin doivent rencontrer certains critères, dont la faible spécificité de substrat afin de pouvoir dissoudre divers types de gras. Aussi, elles doivent être résistantes à des pH alcalins, à des températures élevées et doivent être actives en présence de divers surfactants (Sharma *et al.*, 2001). De façon générale, les températures optimales d'activité des lipases connues sont situées entre 30 et 60 °C mais certaines agissent à des températures près des points de congélation et d'ébullition (Gupta *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2001). Certaines enzymes offrent des profils de thermostabilité surprenants, présentant une résistance de plusieurs heures à 100 °C (Salameh et Wiegel, 2007). La thermostabilité présente beaucoup d'avantages car les réactions catalysées par des lipases thermostables peuvent s'effectuer à des températures élevées. Il en découle une augmentation des vitesses de réactions ainsi qu'une meilleure solubilisation du substrat ce qui diminue la viscosité du mélange réactionnel. Cela diminue aussi les risques de contamination et permet une augmentation de la vitesse de diffusion (Hasan *et al.*, 2006; Mozhaev, 1993). Les lipases n'ont généralement pas besoin de cofacteurs, mais certains ions divalents tels le calcium ont été rapportés comme stimulant l'activité des enzymes, tandis que les métaux lourds ont plutôt tendance à les inhiber (Gupta *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2001). Les

lipases seraient relativement stables dans les solvants organiques ce qui est souhaitable car l'utilisation de solvants en milieu industriel est courante. En fait, comparativement à un milieu réactionnel composé d'eau, un milieu contenant du solvant ne demande pas l'estérification préalable d'un mélange racémique d'un alcool ou d'un acide avant d'être résolus en énantiomères. De plus, les lipases, les substrats et les produits réactionnels sont plus stables dans les solvants que dans l'eau et comme elles sont insolubles dans les solvants, les lipases peuvent être récupérées facilement afin de les réutiliser (Saxena *et al.*, 2003).

Certaines lipases sont stéréospécifiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent distinguer des énantiomères. Elles sont d'ailleurs utilisées afin de résoudre des mélanges racémiques (Chen *et al.*, 1981; Martin *et al.*, 1981). Aussi, elles clivent les liens esters situés autant dans les triglycérides que dans les composés comportant des esters aliphatiques, alicycliques, bicycliques et aromatiques (Schmid et Verger, 1998). Lors de l'hydrolyse d'un triglycéride, les intermédiaires formés (diacylglycérol et monacylglycérol) ne s'accumulent normalement pas dans le milieu car ils sont hydrolysés à leur tour par la lipase (Saxena *et al.*, 2003). Dans certains cas, l'hydrolyse partielle peut être souhaitable lorsque le but visé est l'obtention de ces deux intermédiaires, notamment utilisés comme additifs dans la nourriture. La direction de la réaction est favorisée par la présence d'eau; l'absence d'eau ou sa présence en faible quantité favorise la formation de triacylglycérol à partir d'acides gras et de glycérol. Par contre, lorsqu'il y a accumulation de molécules d'eau dans le milieu réactionnel, le sens de la réaction est inversé vers la dégradation des triacylglycérols en acides gras et en glycérol. Afin de favoriser l'un ou l'autre des réactions, il s'avère important, en milieu industriel, de pouvoir modifier à souhait le contenu du milieu réactionnel (Brockerhoff et Jensen, 1974).

Tableau 2 Propriétés physico-chimiques de quelques lipases. Inspiré de Gupta *et al.*, 2004.

Source	pH et température optimaux	Thermostabilité	Référence
Alcaligenes sp.	pH 9.0, 50 °C	65 % d'activité résiduelle après 10 minutes à 60 °C	Brune et Gotz, 1992
Bacillus sp. souche 398	pH 8.2, 65 °C	50 % d'activité résiduelle après 30 minutes à 65 °C	Kim *et al.*, 1994
Bacillus sp. souche ATC-C53841	pH 5.0-9.5, 60 °C	50 % d'activité résiduelle après 8 heures à 70 °C	Wang *et al.*, 1995
B. alcalophilus	pH 10.6, 60 °C	Stable pour une heure à 60 °C	Ghanem *et al.*, 2000
B. licheniformis strain H1	pH 10.0, 55 °C	100 % d'activité après 15 minutes à 70 °C	Khyami-Horani, 1996
B. thermocatenulatus	pH 8.0-9.0, 60-80 °C	48.5 % d'activité résiduelle après 30 minutes à 60 °C	Schmidt-Dannert *et al.*, 1996
B. thermoleovorans	pH 7.5, 75 °C	50 % d'activité résiduelle après 30 minutes à 70 °C	Lee *et al.*, 1999
Burkholderia sp.	pH 11.0, 90-100 °C	50 % d'activité résiduelle après plus de 12 heures à 90-100 °C	Braddo *et al.*, 2002; Rathi *et al.*, 2000 et 2001
P. aeruginosa EF2	pH 9.0, 50 °C	50 % d'activité résiduelle après 2 minutes à 70 °C	Gilbert *et al.*, 1991
P. aeruginosa LP 602	pH 8.0, 55 °C	50 % d'activité résiduelle après 2 heures à 55 °C	Dharmsthiti et Kuhasuntisuk, 1998
P. fluorescens NS2W	pH 9.0, 55 °C	70 % d'activité résiduelle après au moins 2 heures à 60 °C	Kulkarni et Gadre, 2002
P. fragi 22.39B	pH 9.0, 65 °C	Stable 24 heures à 51 °C à pH 9.0	Brune et Gotz, 1992

1.4.4.5 Détection de l'activité lipolytique des lipases

Afin d'identifier une activité lipolytique, plusieurs substrats peuvent être utilisés, dont les trois suivants. Le substrat le plus commun est la tributyrine qui, lors de son ajout à un milieu de culture solide, peut être facilement émulsifié à l'aide d'un mélangeur. En contact avec une activité lipolytique, il y aura hydrolyse du substrat qui se traduira par la présence d'un halo clair autour de la colonie. Cependant, la tributyrine est hydrolysée autant par les estérases que par les lipases. C'est le cas aussi des Tweens qui sont non spécifiques et qui peuvent aussi être facilement incorporés aux milieux solides avec du calcium. L'hydrolyse du Tween produit un alcool et un acide gras, ce dernier précipite lorsqu'il est en contact avec le calcium (Lonon *et al.*, 1988; Plou *et al.*, 1998). L'activité hydrolytique se visualise donc par l'apparition d'un précipité autour de la colonie positive. Un substrat spécifique aux lipases est l'huile d'olive pure émulsifiée couplée à la rhodamine B. L'activité lipolytique, détectée sous les ultra-violets, révèlera un halo orange fluorescent autour du clone positif car la rhodamine B forme un complexe avec les acides gras libres (Gupta *et al.*, 2003).

Il existe aussi des substrats qui peuvent être utilisés afin de détecter l'expression hétérologue d'une protéine au sein des protéines issues de l'hôte. Parfois, l'expression extracellulaire d'une enzyme lipolytique ne peut être associée directement au profil protéique visible sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium (SDS-PAGE). Afin de détecter sa présence, le 4-méthylumbelliférone-butyrate (MUF-butyrate) peut être utilisé (Diaz *et al.*, 1999). Ce substrat fluorogénique est ajouté au gel SDS-PAGE duquel le SDS a été retiré à l'aide d'un autre détergent, le Triton X-100. La fluorescence émise par l'hydrolyse du substrat est ensuite visible sous les rayons ultra-violets. Comme le substrat était le MUF–butyrate (chaîne latérale de quatre carbones), il est hydrolysé autant par les lipases que les estérases. Il est également important d'avoir un témoin protéique qui ne contient pas l'enzyme lipolytique hétérologue car les hôtes utilisés expriment eux aussi ce type d'enzymes.

La détection de l'activité lipolytique s'effectue aussi dans le but de quantifier cette activité, par exemple afin de déterminer les caractéristiques optimales d'une enzyme purifiée. Parmi ces méthodes, la titration de l'acide libéré est une possibilité mais comme l'activité de l'enzyme est fonction du pH, il est important de garder ce dernier constant (Jaeger *et al.*, 1994). Une méthode largement utilisée est celle de l'utilisation de substrats synthétiques tels que les *p*-nitrophényls couplés à des acides gras (Thomson *et al.*, 1999). L'hydrolyse du substrat libère le *p*-nitrophénol qui est absorbé à une longueur d'onde de 405 nm donc quantifiable en spectrophotométrie. De plus, plusieurs substrats sont disponibles sur le marché, allant du petit

triglycéride (4 carbones, *p*-nitrophényl butyrate) jusqu'à de longs triglycérides (18 carbones, *p*-nitrophényl stéarate, comparable à l'huile d'olive). Par contre, ces substrats demeurent synthétiques et ne représentent pas un mélange complexe d'huiles.

1.4.4.6 Purification des lipases

La purification est nécessaire lors de la caractérisation de l'enzyme afin d'attribuer les caractéristiques physico-chimiques observées à la lipase uniquement. Aussi, la purification peut être nécessaire à des fins industrielles telles que l'incorporation d'une enzyme dans une formulation. Dans ce cas précis, les stratégies de purification doivent être efficaces, ce qui sous-entend une bonne rapidité d'exécution à un faible coût ainsi qu'une application à grande échelle (Gupta *et al.*, 2004).

La purification des lipases s'effectue souvent à l'aide de techniques non spécifiques, telles que la précipitation, les chromatographies à interactions hydrophobes et ioniques et les tamis moléculaires (Sharma *et al.*, 2001). L'utilisation de l'une ou plusieurs de ces méthodes peut être précédée par une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium afin de les concentrer dans un volume réduit (Harlow et Lane, 1988). Ces techniques ne font pas appel à la structure unique aux lipases mais plutôt aux propriétés communes qu'elles partagent en tant qu'enzymes. Par exemple, le point isoélectrique est important pour les chromatographies à interactions ioniques tandis que la taille revêt son importance dans les tamis moléculaire. Par contre, les lipases possèdent un site actif présentant des résidus hydrophobes. L'utilisation d'une colonne à interactions hydrophobes serait donc un moyen potentiel afin de purifier ce type d'enzyme. Par contre, cette région hydrophobe est parfois protégée par un couvercle autant qu'elle peut être enfouie dans le corps de la protéine, ce qui la rendrait inaccessible.

Il existe trois techniques qui ont été utilisées avec succès pour la purification des lipases. La première est le système de deux phases aqueuses (Saxena *et al.*, 2003). Il s'agit d'une bioséparation à l'aide de deux polymères incompatibles dans l'eau ou dans une solution salée. Les protéines y seront séparées selon leur hydrophobicité, leur charge et leur taille. Afin d'affiner la purification, il est possible de changer les polymères utilisés, le pH de la solution ainsi que d'ajouter des sels ou des détergents. Par exemple, le polyéthylène glycol (PEG) est souvent utilisé car les groupements hydrophobes des lipases interagissent aisément avec les groupements éthylènes du polymère (Bradoo *et al.*, 1999). La deuxième technique fait appel aux micelles inversées, qui sont des gouttes d'eau emprisonnées dans un solvant, stabilisés par une mince couche de molécules issues d'un surfactant (Castro et Cabral, 1988). Cette couche se forme lors

du contact d'un solvant organique contenant un surfactant avec une phase aqueuse. Dans un premier temps, les micelles inversées vont solubiliser le mélange protéique puis les protéines seront libérées en changeant les interactions entre les micelles et ces dernières. Cette technique requiert un bon contrôle du pH et de la force ionique de la phase aqueuse car ces facteurs influencent les interactions électrostatiques entre les têtes polaires des groupements du surfactant et les protéines. Finalement, l'immunopurification demeure une technique qui peut être utilisée due à sa grande spécificité pour tous les types de protéines (Harlow et Lane, 1988). Cette technique demande des anticorps spécifiques à la protéine à purifier, ce qui rend la purification extrêmement efficace. Par contre, la fabrication d'anticorps est très coûteuse donc cette technique est peu utilisée de façon industrielle.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Milieux de culture

2.1.1 Les milieux liquides utilisés pour *Escherichia coli*

Le milieu deux fois *tryptone yeast extract* (2xTY) est le milieu liquide utilisé pour la croissance de *E. coli*. Il s'agit de 16 g de tryptone mélangés à 10 g d'extrait de levures et à 5 g de chlorure de sodium dans un litre d'eau distillée. Le milieu *Super Optimal Catabolite* (SOC) est utilisé pour la croissance de *E. coli* après les transformations. Il est composé de 20 g de tryptone, de 5 g d'extrait de levures, de 4 g de glucose ainsi que de 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$ et 5 mM de $MgSO_4$ pour un litre d'eau distillée. Tous les milieux sont divisés à raison de 250 mL par bouteille de 500 mL puis stérilisés 20 minutes à 121 °C.

2.1.2 Les milieux liquides utilisés pour *Streptomyces lividans* 10-164

Le milieu *Tryptone Soya Broth* (TSB) est le milieu riche qui a été utilisé pour les pré-cultures de la souche 10-164 de *S. lividans*. Il est constitué de 27,5 g de poudre de TSB mélangé à un litre d'eau distillée puis autoclavé 20 minutes à 121 °C.

Le milieu minimal M14 est le milieu minimal qui a été utilisé en vue d'exprimer les protéines. Ce milieu est constitué de 1,4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 5 g de K_2HPO_4, 1 g de KH_2PO_4, 2 mL de Tween 80 et 1 mL d'une solution de sels de Mandels (140 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 ml d'eau distillée). Le volume est complété à 1 litre avec de d'eau distillée puis le pH ajusté à 7,4 à l'aide du KH_2PO_4 ou du K_2HPO_4. Le milieu est stérilisé 20 minutes à 121 °C puis avant de l'utiliser, 4 mL de la source de carbone à 25 % [(poids/volume, p/v); xylose, glucose, concentration finale de 1 %] est ajoutée pour chaque 100 mL de milieu, ainsi que 0,6 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 % (p/v), 1 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3 % (p/v) et l'antibiotique requis (déterminé par la souche et/ou le vecteur utilisés) sont ajoutés.

2.1.3 Les milieux solides utilisés pour *Escherichia coli*

Les géloses 2xTY sont utilisées pour la croissance de *E. coli*. À la préparation liquide de 2xTY, on ajoute 1.5 % (p/v) d'agar avant de stériliser 20 minutes à 121 °C. Les antibiotiques sont ajoutés au besoin. Lors du criblage sur milieu solide pour l'activité lipolytique, un milieu de base de 2xTY auquel nous avons ajouté 1 % (volume/volume, v/v) de tributyrine a été utilisé. Avant de couler les géloses, les antibiotiques requis ont été ajoutés et l'émulsion du milieu a été pratiquée

deux fois 30 secondes à l'aide d'un mixeur. L'émulsion permet de distribuer uniformément la tributyrine sous la forme de fines gouttelettes, devenant ainsi accessible comme substrat aux enzymes lipolytiques. Lors des transformations bactériennes où le vecteur utilisé exprimait la β-galactosidase, des géloses contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) et d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) ont été utilisées. Quelques heures (2-3) avant l'étalement des transformants, 50 µL de X-Gal (20 mg par mL de diméthylformamide, DMF) et 10 µL d'IPTG (100 mM, filtré 0,2 µm) ont été ajoutés à 40 µL d'eau distillée stérile, puis cette solution a été étalée à l'aide de 3 ou 4 billes de verre sur une gélose.

2.1.4 Les milieux solides utilisés pour *Streptomyces lividans* 10-164

Le milieu R5 a été utilisé lors de la transformation des protoplastes de *S. lividans*. Il s'agit de 103 g de saccharose, 0,25 g de K_2SO_4, 10,12 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 g de glucose, 0,1 g de Casamino acids, 5 g d'extrait de levures, 5,73 g d'acide N-[tris(hydroxyméthyl)-méthyl]-2-aminoéthanesulfonique (TES), 20 g d'agar et 2 mL d'une solution d'éléments traces (40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, compléter à un litre d'eau distillée, stériliser). Le volume a été complété à un litre puis stérilisé 20 minutes à 121 °C. Lorsque la température a atteint 55 °C, 10 mL de KH_2PO_4 0,5 % (p/v) autoclavé a été ajouté, ainsi que 4 mL de $CaCl_2$ 5 M stérile, 15 mL de L-proline 20 % (stérilisée par filtration) et 5 mL de NaOH 1 N (stérilisé par filtration). Une fois les Pétri coulés, ils ont été laissés sécher à la température de la pièce jusqu'à ce qu'ils perdent 15 % de leur poids (6-7 jours) car la croissance de *S. lividans* est défavorisée par la présence d'humidité.

Le milieu Bennett a été utilisé en vue de favoriser la sporulation de *S. lividans*. Il est constitué de 1 g d'extrait de levures, de 1 g d'extrait de bœuf, de 2 g de NZ amine A, de 10 g de maltose et de 20 g d'agar. Une fois le volume compété à un litre avec de l'eau distillée, le pH a été ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH puis le milieu stérilisé 20 minutes à 121 °C. Les antibiotiques requis ont été ajoutés avant de couler les Pétri.

Un milieu Bennett avec 1 % de tributyrine a aussi été utilisé. Il s'agissait d'ajouter 2,5 mL de tributyrine à 250 mL de milieu Bennett (en même temps que les antibiotiques) puis de pratiquer une émulsion de deux fois 30 secondes à l'aide d'un mixeur.

2.2 Conditions de culture

2.2.1 *E. coli*

La description des souches utilisées est disponible à l'annexe A. Toutes les cultures liquides des différentes souches de *E. coli* utilisées ont été incubées à 37 °C avec agitation à 240 rotations par minute (rpm) en présence d'antibiotiques selon le cas. Les milieux solides avec ou sans antibiotiques pour les souches de *E. coli* ont été incubées à 37 °C pour une période d'au moins 16 heures. Les milieux 2xTY avec 1 % de tributyrine servant à révéler de l'activité lipolytique ont aussi été incubés à 37 °C pour 16 heures, puis laissés à la température de la pièce jusqu'à l'apparition de l'hydrolyse (4-5 jours).

2.2.2 *S. lividans*

Pour cultiver les Streptomycètes en milieu liquide, il faut faire une préculture en milieu riche d'au moins 48 heures dans un petit volume (entre 5 et 10 mL) puis prendre cette préculture afin d'ensemencer un plus grand volume (entre 25 et 100 mL) de milieu riche (extraction du plasmide) ou de milieu minimal (expression protéique). À l'atteinte d'une croissance adéquate (48 ou 72 heures), 8 % de la culture en milieu riche ont servi à ensemencer le milieu minimal pour l'expression protéique.

Les cultures de *S. lividans* 10-164 liquides ou les milieux solides ont été incubés à 34 °C. En milieu liquide, le volume de culture représentait un cinquième du volume de l'Erlenmeyer utilisé afin de favoriser l'aération. Aussi, trois billes de verre ont été ajoutées dans les précultures de 5 et 10 mL afin d'empêcher la formation d'amas de mycélium.

2.3 Conservation des souches

2.3.1 *E. coli*

Tous les clones intéressants ont été conservés par lyophilisation. Une culture de 25 mL de 2xTY contenant les antibiotiques requis a été ensemencée avec la souche de *E. coli* à lyophiliser. Après une incubation de 16 heures à 37 °C avec une agitation de 240 rpm, la culture a été transférée dans un tube de 50 mL stérile et centrifugée à 1000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant a été retiré et le culot resuspendu dans 5 mL de lait écrémé 10 % (p/v). La préparation bactérienne a été transférée à raison de 0,5 mL dans des ampoules de verre puis ces ampoules

placées dans un bain de méthanol et de glace sèche dans le but de congeler rapidement les bactéries. La préparation contenue dans les ampoules a été lyophilisée pendant 16 heures puis les ampoules ont été scellées à la flamme.

2.3.2 *S. lividans*

Pour ce qui est de la lyophilisation de *S. lividans*, les spores formées à la surface de huit Pétri Bennett après 7 jours d'incubation à 34 °C ont été grattées puis mises en suspension dans du lait écrémé 10 % (p/v) stérile. La lyophilisation s'est déroulée tel que décrit pour les souches de *E. coli*.

2.4 Analyse et manipulation de l'ADN

2.4.1 Extraction de cosmides et plasmides chez *E. coli*

La description des cosmides et plasmides se trouve à l'annexe A. À partir d'une culture ayant été incubée toute la nuit, 1,5 mL a été culotté puis le surnageant retiré. Le culot a été resuspendu dans 100 µL de solution EI (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris)-HCl 50 mM pH 8.0, acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) 10 mM) à l'aide d'un vortex. Puis, 200 µL de la solution EII ont été ajoutés (NaOH 1 M, SDS 1 %) et les tubes ont été inversés 10 fois. Ensuite, 150 µL de la solution EIII (CH_3CO_2K 3 M, ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique glacial) ont été ajoutés et les tubes inversés 5 fois. Après une centrifugation de 5 minutes à 13 000 x g, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes auxquels 200 µL de phénol et 200 µL de chloroforme ont été ajoutés. Les tubes ont été agités 2 minutes avant d'être centrifugés à nouveau 5 minutes. Les phases supérieures ont été transférées dans de nouveaux tubes puis 600 µL d'isopropanol ont été ajoutés. Après avoir inversé les tubes, ils ont été incubés 10 minutes sur la glace puis centrifugés 5 minutes à 13 000 x g. Le culot a été lavé avec 200 µL d'éthanol 70 % (v/v) pour ensuite être séché 5 minutes à l'air. Le culot a finalement été resuspendu dans 50 µL d'eau distillée stérile.

2.4.2 Extraction de plasmides chez *S. lividans*

À partir d'une culture en milieu TSB, environ 100 mg de mycélium a été récupéré par centrifugation. Le culot a été lavé à l'aide de 500 µL de la solution SI (Tris-HCl 25 mM pH 8,

saccharose 10,3 %, EDTA 25 mM) puis resuspendu dans 400 µL de la solution SI supplémentée de 2 mg/mL de lysozyme. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, 250 µL de la solution SII (NaOH 0,3 M, SDS 2 %) ont été ajoutés puis le tout mélangé à l'aide d'un vortex 10 secondes. Après une incubation de 15 minutes à 70 °C, 100 µL de la solution SIII (5 g de phénol, 5 mL de chloroforme, 1 mL d'eau et 5 mg d'hydroxyquinoline) ont été ajoutés avant de mélanger par vortex. Après 10 min de centrifugation, le surnageant transféré auquel ont été ajoutés 50 µL d'acétate de sodium 3 M et 450 µL d'isopropanol a été mélangé par inversion. Après 10 minutes de centrifugation, le surnageant a été retiré puis le culot séché à l'air 10 minutes pour ensuite être resuspendu dans 50 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), auquel ont été ajoutés 25 µL de phénol. Une fois mélangé, le tout a été centrifugé 5 minutes puis la phase supérieure transférée dans un autre microtube auquel 50 µL d'isopropanol ont été ajoutés. Après un mélange par inversion et une incubation de 5 minutes à la température ambiante, le tout a été centrifugé puis le surnageant éliminé. Le culot a été remis en suspension dans 50 µL d'eau distillée stérile à l'aide d'un agitateur mécanique pendant une minute, puis conservé à -20 °C.

2.4.3 Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction

Les digestions de l'ADN par des endonucléases de restriction se sont déroulées à 37 °C dans un volume total de 20 µL. La quantité d'ADN (entre 0,2 et 1 µg) à digérer a été calculée selon le type d'ADN (vecteur ou produit de PCR) et selon sa provenance (par exemple, environ 1 µg correspond à 17 µL pour une extraction d'un vecteur chez *S. lividans* et à 1-5 µL pour un vecteur isolé de *E. coli*). Les enzymes utilisées provenaient de la compagnie GE Healthcare et les digestions se sont déroulées selon les recommandations du fabricant. Les enzymes pouvaient ensuite être inactivées par une incubation de 15 minutes à 65 °C ou de 30 minutes à 85 °C, selon l'enzyme utilisée.

2.4.4 Amplification par PCR

L'ADN a été amplifié par réactions en chaîne de la polymérase dans un volume total de 50 µL. Le mélange réactionnel était constitué de 5 µL de tampon 10 X (Tris-HCl 100 mM pH 8,85, KCl 250 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 50 mM, $MgSO_4$ 20 mM, Roche), 2 µL de $MgSO_4$ 25 mM (Roche), 4 µL de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) 10 mM, 3 µL de chacune des amorces diluées à 10 picomole/µL (pmole/µL), 4 µL de propionamide 50 % (v/v), 0,5 µL de Tween 20 5 % (v/v), 50 ng d'ADN et 0,5 µL de la polymérase Pwo (5 U/µL, Roche). Le programme utilisé comportait une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C, puis 30 cycles de dénaturation

(94 °C, 45 sec), hybridation (température déterminée selon les amorces utilisées, 45 sec) et élongation (72 °C, 90 sec). Après les cycles, une élongation finale de 5 minutes à 72 °C a eue lieu. La description des amorces utilisées se situe à l'annexe A.

2.4.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

Afin d'analyser l'ADN, les produits d'extraction de plasmides (entre 1 et 5 µL pour *E. coli*, 17 µL pour *S. lividans*) ou de PCR (5 µL) ont été migrés sur un gel d'agarose. Les gels de 15 x 20 cm ont été préparés en dissolvant 0,7 % d'agarose dans du tampon Tris borate EDTA (TBE) 1 X (provient de la dilution 1/10 dans l'eau du tampon TBE 10 X : 108 g de Tris, 55 g d'acide borique, 40 mL d'EDTA 0,5 M à pH 8, compléter à 1 litre avec de l'eau distillée). Après avoir chauffé la solution pour dissoudre l'agarose, du bromure d'éthidium a été ajouté à une concentration de 0,5 µg/mL lorsque la température de la solution avoisinait 50 °C. Une fois le gel solidifié, il a été placé dans une cuve *DNA Sub Cell* de Bio-Rad et recouvert de tampon TBE 1 X. Entre 20 et 25 µL complétés avec de l'eau ont été chargés sur gel, dont 5 µL provenaient d'un tampon d'échantillon 6 X [0,25 % (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25 % (p/v) de xylène cyanol, 15 % (p/v) de Ficoll 400]. Le marqueur 1 *Kb Plus DNA* de Invitrogen a été utilisé à raison de 5 µL par puits (10 µL de 1 Kb+ à 1 µg/µL, 10 µL de TBE 10 X, 16,7 µL du tampon d'échantillon 6 X et 6,3 µL d'eau). Ce marqueur génère 19 bandes allant de 100 paires de bases (pb) à 12 000 pb, dont celle de 1650 pb qui correspond à 40 ng d'ADN. La migration du gel a été effectuée à 30 V pour une durée de 16 heures puis l'ADN a été révélé en utilisant un transilluminateur à rayons ultra-violets et le logiciel AlphaImager de la compagnie Alpha Innotech.

2.4.6 Purification de l'ADN

L'ADN contenu dans certaines bandes présentes dans les gels d'agarose a dû être purifié avant d'être utilisé pour une ligation. La technique qui a été utilisée est celle du GFX d'Amersham Biosciences. Les bandes contenant l'ADN d'intérêt ont été découpées à l'aide d'un scalpel stérile puis 10 µL/mg de tampon de capture (contient de l'acétate et un agent chaotrope) ont été ajoutés aux bandes. Le mélange a été vortexé et l'agarose a été dissout en incubant entre 5 et 15 minutes dans un bain-marie à 60 °C. Après une brève centrifugation, le mélange a été transféré dans une colonne puis après une minute d'attente, la colonne a été centrifugée 30 secondes. Le liquide a été jeté puis 500 µL de tampon de lavage (10 mM de Tris à pH 8, 1 mM d'EDTA, 80 % (v/v) d'éthanol absolu) ont été ajoutés. Après 30 secondes de centrifugation, la

colonne a été transférée dans un tube de 1,5 mL stérile puis 50 µL d'eau ont été ajoutés. Après une attente d'une minute, le tube a été centrifugé une minute afin d'éluer l'ADN dans l'eau.

Avant d'envoyer séquencer des fragments d'ADN contenus dans des vecteurs, ces derniers ont été purifiés sur une colonne de silice à l'aide d'un kit de Qiagen, tel que décrit dans le guide d'utilisation. L'ADN était élué dans de l'eau distillée stérile puis dosé afin d'envoyer 100 ng/µL pour faire séquencer à la plate-forme de Génome Québec.

2.4.7 Ligation

Lorsqu'il y avait ligation entre un vecteur et un insert, environ 2,5 ng/µL de vecteur ont été mélangés à 5 ng/µL d'insert (ratio 1:2 pour le vecteur:insert) dans un total de 20 µL. Dans les ligations d'un vecteur sur lui-même, entre 1 et 10 ng/µL de vecteur digéré étaient utilisés dans un total de 50 µL. Le volume restant des ligations était complété avec de l'eau distillée, du tampon OPA 10 X (2 ou 5 µL afin d'avoir une concentration finale de 1 X), 2 µL d'adénosine triphosphate (ATP) 10 mM et 1 µL de ligase T4. La réaction a été incubée à la température de la pièce pour un minimum de quatre heures ou toute la nuit. La réaction a été arrêtée en incubant 10 minutes à 65 °C.

2.5 Transformation bactérienne

2.5.1 Préparation de cellules chimiquement compétentes *E. coli* DH11S

À partir d'une préculture de 5 mL de 2xTY incubée à 240 rpm toute la nuit, 2,5 mL ont servi d'inoculum à 250 mL de 2xTY. La culture a été incubée à 37 °C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 600 nm ($D.O._{600nm}$) de 0,4. La culture a ensuite été transférée dans une bouteille de 500 mL froide pour être incubée 15 minutes sur la glace. Après une centrifugation à 2500 rpm de 15 minutes à 4 °C, le surnageant a été jeté et le culot resuspendu dans 83 mL (1/3 du volume initial) de tampon I froid (100 mL d'eau distillée, 20 mL de KCl 1 M, 1,2 mL d'acétate de potassium 5 M, 12 mL de $CaCl_2$ 1 M, 30 mL de glycérol ultra pur, ajuster le pH à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2 M, compléter le volume à 200 mL avec de l'eau distillée, stériliser par filtration sur membrane 0,22 µm). Après une incubation d'une heure sur glace, les cellules ont été centrifugées à 3000 rpm 15 minutes à 4 °C. Le surnageant a été retiré puis le culot resuspendu doucement dans 10 mL de tampon II (100 mL d'eau distillée, 4 mL d'acide 3-morpholinopropanesulfonique (MOPS) 0,5 M, 2 mL de KCl 1 M, 15 mL de $CaCl_2$ 1 M, 30 mL de

glycérol ultra pur, ajuster le pH à 6,8 avec du NaOH 0,5 M, compléter le volume à 200 mL avec de l'eau distillée, stériliser par filtration sur membrane 0,22 µm). Après 15 minutes d'incubation sur glace, les cellules ont été aliquotées à raison de 100 µL par microtube stérile puis congelées rapidement en utilisant un bain de méthanol et de glace sèche. Les cellules sont conservées à -80 °C.

2.5.2 Transformation d'*E. coli*

Pour transformer avec un produit de ligation, le total de la ligation (20 ou 50 µL) a été ajouté à 100 µL de cellules chimiquement compétentes DH11S. Pour la transformation avec un plasmide intact (contrôle positif), entre 1 et 2 µL du plasmide a été mélangé aussi à 100 µL de cellules. Le mélange a été incubé 30 minutes sur glace puis deux minutes dans un bain-marie à 42 °C et ensuite deux minutes sur glace. Un volume de 450 µL de SOC a été ajouté puis le mélange incubé 45 minutes à 37 °C avec agitation. Après l'incubation, 100 µL de la transformation ont été étalés à l'aide de quatre billes de verre sur une gélose 2xTY avec les antibiotiques permettant la sélection des bactéries.

2.5.3 Préparation de protoplastes de *S. lividans*

À partir d'une préculture en TSB, 50 mL ont servi à ensemencer 100 mL de milieu R5 liquide (idem milieu R5 solide, sans l'agar). Après une incubation de 24 à 48 heures à 34 °C, le mycélium récupéré a été lavé deux fois dans une solution de saccharose 10,3 % (p/v). Ensuite, le mycélium lavé a été resuspendu délicatement dans 40 mL de tampon P [103 g (p/v) de saccharose, 250 mg (p/v) de K_2SO_4, 2 mL (v/v) d'éléments traces 2,02 g (p/v) de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, volume complété à 800 mL avec de l'eau distillée] supplémenté avec 1 mg/mL de lysozyme et le tout incubé 30 minutes à 37 °C. Après l'incubation, les protoplastes ont été filtrés sur laine de verre afin d'éliminer le mycélium restant. Les protoplastes filtrés ont été centrifugés puis, après l'élimination du surnageant, resuspendu délicatement dans le volume résiduel auquel 40 mL de tampon P ont été ajoutés. Une autre centrifugation a été pratiquée puis le culot lavé une fois dans 40 mL de tampon P, pour finalement être resuspendu dans 5 mL de tampon P. Du tampon P est ajouté afin d'obtenir une concentration entre 10^8 et 10^9 protoplastes/mL. La concentration a été calculée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm. Les protoplastes préparés ont été aliquotés en microtubes de 220 µL puis conservés à -80 °C.

2.5.4 Transformation des protoplastes de *S. lividans*

La totalité d'un produit de ligation a été mélangée avec 50 µL de protoplastes. Ont ensuite été ajoutés 200 µL de PEG 1500 25 % (4 mL de PEG 1500 et 4 mL de tampon T (25 mL de saccharose 10,3 % (p/v), 75 mL eau distillée, 0,2 mL d'une solution d'éléments traces, 1 mL de K_2SO_4 2,5 % (p/v), stériliser à l'autoclave et à 9,3 mL de tampon T, ajouter 0,2 mL de $CaCl_2$ 5 M et 0,5 mL de tampon Tris-acide maléique 1 M à pH 8)) et la mixture mélangée. Après 90 secondes de délai, 10 et 50 µL ont été étalés à l'aide de billes de verre sur deux géloses R5. Après une incubation de 16 heures à 34 °C, 1,5 mL d'eau stérile contenant 10 µL de thiostrepton (50 mg par mL de diméthylsulfoxide, DMSO) a été ajoutée afin de couvrir le Pétri. Une fois l'eau absorbée dans la gélose, le Pétri a été remis à 34 °C jusqu'à l'apparition des colonies.

2.6 Criblage des clones

2.6.1 Criblage par délétions

Le criblage par délétions a été fait en digérant un clone positif pour l'hydrolyse de la tributyrine par une ou plusieurs enzymes de restriction ne coupant pas dans le vecteur pIAFS2. Une fois le vecteur digéré, le patron des digestions a été observé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 %. Une enzyme coupant l'insert entre cinq et dix fois a été retenue puis la digestion par cette enzyme a été faite à nouveau. Une ligation a été effectuée afin que les fragments se referment sur eux-mêmes, créant ainsi une copie du cosmide original (~ 40 kb) mais avec un insert de taille réduite (< 40 kb). Le produit de la ligation a été transformé par choc thermique dans *E. coli* DH11S puis les transformants ont été repiqués sur un milieu 2xTY contenant 1 % de tributyrine. Les cosmides des transformants hydrolysant encore la tributyrine ont été extraits puis digérés par une nouvelle enzyme, et ainsi de suite. Cette méthode de criblage par délétions a été poursuivie jusqu'à l'obtention d'un patron de digestion présentant de courts fragments (< 2 kbs). Ces courts fragments ont été purifiés par la méthode GFX suite à leur migration sur un gel d'agarose de 0,7 %. Les fragments ont ensuite été clonés dans le vecteur pUC18 digéré par les mêmes enzymes puis envoyés séquencer à Génome Québec.

2.6.2 Analyse des séquences obtenues

Les résultats du séquençage ont été obtenus sous la forme de chromatogrammes lisibles avec le logiciel Chromas. Les chromatogrammes ont été corrigés puis à partir de Chromas, une analyse de type BLAST a été lancée en connexion avec le serveur NCBI. L'analyse demandée était de type Blastx, ce qui signifie que la séquence nucléotidique a été traduite dans tous les cadres de lecture possibles puis comparée à ceux de la banque de données protéiques disponible sur le serveur. Suite aux résultats obtenus, les séquences fournies par Génome Québec ont été reconstituées par chevauchement avec le logiciel Clone Manager afin de recréer les fragments séquencés. Lorsque le chevauchement était impossible, des amorces dessinées à partir des fragments disponibles ont été utilisées avec ces fragments pour un nouveau séquençage afin de combler les séquences manquantes. Une fois tous les fragments possibles obtenus, une nouvelle analyse de type Blastx a été pratiquée à chaque 500 nucléotide. L'organisation génique des fragments ainsi que l'affiliation de chaque gène a été notée. Ensuite, pour les gènes ayant une activité lipolytique, la recherche d'un peptide signal a été faite avec le logiciel SignalP 3.0 Server disponible sur internet à l'adresse http://protfun.net/services/SignalP/. La recherche au sein de la traduction du gène d'une séquence consensus de type G-X-S-X-G associée aux lipases a été effectuée dans le but de confirmer l'identification d'un nouveau gène lipolytique ainsi que déterminer à quelle famille de lipases il pourrait appartenir.

2.7 Expression protéique

Les gènes séquencés possédant une activité lipolytique intéressante ont été clonés individuellement dans le vecteur pUC18 pour l'expression chez *E. coli* et dans les vecteurs pIAFC109 et pIAFD95A pour l'expression chez *S. lividans*.

L'expression protéique chez *E. coli* s'est faite à l'aide de l'induction du promoteur de l'opéron *lac* à l'IPTG. Une culture de 1,25 mL en 2xTY de 16 heures a servie à inoculer 25 mL de milieu frais contenant 400 µL de glucose 25 % (p/v), 100 µg/mL d'ampicilline ainsi que 12,5 µL d'IPTG 1 M afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 mM. L'induction a eu lieue toute la nuit et la production protéique intra et extra cellulaire a été analysée par migration sur gel d'électrophorèse.

L'expression chez *S. lividans* commence par l'inoculation de 10 mL de milieu TSB dont 8 % provient d'un culot d'un stock en glycérol. Le milieu TSB est supplémenté avec 1 % de glycérol en plus de 5 µg/mL de thiostrepton. Après 48 ou 72 heures (selon la croissance), la

culture a été centrifugée puis le culot homogénéisé au potter a servi à ensemencer un nouveau 100 mL de TSB avec 1 % de glycérol. Lorsque la croissance est adéquate, le mycélium a été récupéré par centrifugation puis lavé avec du M14 pour ensuite être homogénéisé au potter. Le mycélium a ensuite été divisé en deux afin d'ensemencer deux fois 500 mL de M14 supplémenté. Lors d'essais d'optimisation de la production protéique, une préculture de 5 mL a été faite dont 800 µL du culot lavé et homogénéisé au potter ont servis à ensemencer 10 mL de milieu M14 supplémenté. Des aliquots de culture en M14 sont prélevés après 24, 48 et 72 heures en vue d'être analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.8 Purification des protéines

2.8.1 Préparation du surnageant

Une culture de 72 heures d'un litre en M14 a été filtrée par aspiration à l'aide d'un filtre Whatman de qualité 3. Le surnageant recueilli a été filtré à nouveau à l'aide d'un pré-filtre Millipore AP20 puis d'un filtre Whatman de 0,22 µm. Dans 600 mL de filtrat ont été ajoutés 131 g de sulfate d'ammonium, 100 mL d'un tampon potassium phosphate 0,5 M à pH 7 (solutions de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4 concentrés à 0,5 M puis mélangés jusqu'à l'obtention du pH désiré) et le volume complété à 1000 mL avec le restant du surnageant filtré. La solution de surnageant est donc tamponnée à 50 mM et à pH 7, avec 1 M de sulfate d'ammonium, soit les conditions choisies afin d'effectuer une chromatographie à interactions hydrophobes. Cette solution a été filtrée à l'aide d'un filtre Whatman de 0,22 µm afin d'enlever les particules pouvant endommager la colonne de purification.

2.8.2 Purification par chromatographie à interaction hydrophobe

Pour la première étape de purification, des colonnes à interactions hydrophobes Butyl HP, Phenyl FF et Octyl FF (GE Healthcare) de 1 mL ont été utilisées. Afin de retirer l'éthanol présent dans la colonne, 5 volumes du tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM pH 7) ont été chargés sur la colonne. La colonne a ensuite été équilibrée avec 10 volumes du tampon de départ (Tris-HCl 50 mM pH 7 avec 1 M de $(NH_4)_2SO_4$). Les 1000 mL de surnageant tamponné ont été chargés sur la colonne toute la nuit avec un débit de 0,8 mL/min à 4 °C. Le lendemain, la colonne a été lavée avec 20 volumes du tampon de départ à un débit de 1 mL/min. L'élution s'est faite par étapes composées de fractions de 2 mL avec du tampon d'élution contenant 0,9 M de $(NH_4)_2SO_4$ puis 0,8

M, 0,7 M, jusqu'à l'étape d'élution avec le tampon de départ sans sels. Dans le but de retirer les protéines fortement hydrophobes qui seraient restées accrochées dans la colonne, des fractions de 2 mL ont été recueillies en utilisant une solution d'éthylène glycol de 10, 20, 30, 40 et 50 %. Afin de vérifier dans quelle fraction la protéine à purifier a été éluée, des puits ont été percés dans des géloses 2xTY contenant 1 % de tributyrine où 25 µL de chacune des fractions ont été mis.

2.8.3 Dialyse et dosage des échantillons

Le surnageant brut ainsi que les fractions post purification ont toutes été dialysées dans le but de retirer les sels et autres composés pouvant interférer avec le dosage des protéines ou avec les purifications subséquentes. Selon le volume à dialyser, des cassettes de 0,5 à 3 mL ou de 3 à 12 mL d'une porosité de 3,5 kilodaltons (kDa) ont été utilisées (Pierce). La cassette choisie a été hydratée une minute dans l'eau milli-Q puis l'air retiré avant d'injecter l'échantillon. La dialyse s'est faite dans un litre d'eau milli-Q à raison de trois cycles d'une heure puis toute la nuit à 4 °C. La solution protéique dialysée a été dosée selon la méthode de Bradford en utilisant la γ-globuline comme standard.

2.8.4 Purification par tamis moléculaire

La colonne utilisée pour le tamis moléculaire était une Protein Pak 125 de 7,8 mm par 30 cm (Waters) pouvant prendre jusqu'à un milligramme de protéines. De l'eau a été chargée sur la colonne afin d'enlever le méthanol qui servait à sa conservation. Ensuite, du tampon sodium phosphate 0,2 M à pH 7 a circulé dans la colonne afin de l'équilibrer à raison de 15 mL pour un débit de 0,5 mL/min. Une quantité de 500 µg de l'échantillon protéique a été concentrée à l'aide d'un tube Nanosep d'une porosité de 3 kDa (PALL) et réduit à un volume inférieur à 100 µL. Ce volume a été filtré avec un filtre Acrodisc de 0,45 µm avant d'être injecté dans le tamis moléculaire. Les fractions ont été recueillies lorsque la densité optique à 280 nm était plus grande que zéro puis 25 µL de celles-ci ont été mis dans des puits percés dans des géloses 2xTY contenant 1 % de tributyrine.

2.9 Analyse des protéines

2.9.1 Préparation des échantillons protéiques

À partir d'une culture de 2xTY, TSB ou M14, 1,5 mL ont été centrifugés puis 500 µL du surnageant ont été transférés dans un nouveau microtube. Le surnageant est mélangé à l'aide d'un vortex à deux volumes d'acétone froid et incubé une heure sur glace ou peut être conservé à -20 °C pour plusieurs jours. Après une centrifugation de dix minutes à 13000 x g, l'acétone est retirée et le culot séché trois minutes au speed-vac. Le culot protéique séché est ensuite resuspendu dans un volume variant de 30 µL à 50 µL (selon la taille du culot protéique obtenu) de tampon d'échantillon 1 X [4 mL d'eau distillée, 1 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,8 mL de glycérol, 1,6 mL de SDS 10 % (p/v), 40 µL de bleu de bromophénol 0,25 % (p/v)].

Le culot bactérien initial de la culture de 1,5 mL a été lavé deux fois avec du tampon phosphate de sodium 0,02 M à pH 7 puis, selon la grosseur du culot, resuspendu dans 200 à 1000 µL de tampon d'échantillon 1 X. Avant d'en charger 20 µL sur gel, tous les échantillons ont été bouillis 10 minutes.

Pour ce qui est des fractions issues des purifications (hydrophobe ou par tamis), 10 µL ou moins de la fraction était mélangée avec du tampon de chargement puis de l'eau dans le but d'avoir un total de 15 µL à une concentration de 1 X. Parfois, une dénaturation totale des échantillons protéiques des fractions était nécessaire. Dans ce cas, à 15 µL des fractions ont été ajoutés 6,25 µL de tampon de chargement 4 X, 2,5 µL de dithiothréitol (DTT) 1 M et 1,25 µL d'iodoacétamide 400 mM. Avant d'être chargés sur gel, tous les échantillons ont été bouillis 10 minutes.

2.9.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les gels qui ont servi à faire migrer des échantillons protéiques étaient constitués d'un gel d'empilement et d'un gel de séparation. Le gel de séparation de 12 % consistait en 100 µL de SDS 10 %; 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M à pH 8,8; 4 mL d'acrylamide 30 % et 3,35 mL d'eau distillée. Ont été ajoutés ensuite pour la polymérisation 50 µL de persulfate d'ammonium 10 % et 5 µL de N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,2-diaminométhane (TEMED). Un volume de 3,7 mL par gel a été coulé entre deux vitres préalablement lavées et insérées dans le montage. Une fine couche de *n*-butanol saturée d'eau est ajoutée par-dessus le gel afin d'éliminer l'air et d'ainsi favoriser la polymérisation. Une fois le gel polymérisé et rincé à l'eau distillée, le gel d'empilement de 4 % était préparé et coulé avec le peigne (10 ou 15 puits) par-dessus le gel de séparation. Ce gel est

constitué de 25 µL de SDS 10 %, 625 µL de Tris-HCl 0,5 M à pH 6,8; 333 µL d'acrylamide 30 %, 1,53 mL d'eau distillée, 12,5 µL de persulfate d'ammonium 10 % et 3 µL de TEMED. Après un minimum de 15 minutes pour la polymérisation, entre 15 et 25 µL des échantillons à faire migrer ont été chargés dans les puits. Un puits est réservé au marqueur de poids moléculaire Broad Range de Bio-Rad (aprotinine : 6,5 kDa; lysozyme : 14,4 kDa; inhibiteur de la trypsine : 21,5 kDa; anhydrase carbonique : 31 kDa; ovalbumine : 45 kDa; albumine de sérum bovin : 66,2 kDa; phosphorylase B : 97,4 kDa; β-galactosidase :116,25 kDa; myosine : 200 kDa). Les puits ne contenant pas d'échantillons ont été comblés avec 20 µL de tampon de chargement afin de favoriser une migration égale. Les échantillons ont migré à 160 V pendant environ 75 minutes.

2.9.3 Zymogramme

Les gels SDS-PAGE peuvent être utilisés en vue de faire un zymogramme, qui détecte l'activité lipolytique de l'échantillon protéique. Dans ce cas, un tampon d'échantillon sans β-mercaptoéthanol a servi pour resuspendre les protéines. Après la migration, le gel a été lavé avec agitation 30 minutes dans 50 mL de Tris-HCl 50 mM avec 2,5 % (v/v) de Triton X-100. Le gel a été rincé à l'eau distillée et 50 mL de Tris-HCl 50 mM contenant 200 µL d'une solution de butyrate (3,1 mg de 4-méthylumbelliféryl butyrate dans 500 µL d'isopropanol) ont été ajoutés. Suite à une incubation de 5 minutes avec agitation à la noirceur, la révélation de l'activité lipolytique s'est faite sous ultraviolets. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent.

2.9.4 Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Après la migration ou le zymogramme, le gel a été coloré pendant 30 minutes dans une solution de coloration (0,1 % (p/v) de bleu de Coomassie R-250 dans 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique) puis décoloré de une à trois heures dans une solution de décoloration (méthanol 40 % et acide acétique 10 %).

2.9.5 Révélation des protéines au nitrate d'argent

Cette coloration a été utilisée pour sa plus grande sensibilité de détection des protéines. Après la migration ou le zymogrammme, les protéines ont été fixées pendant une heure dans une solution de méthanol 50 % et d'acide acétique 5 %. La solution a été retiré puis le gel incubé 10 minutes dans du méthanol 50 %, pour ensuite être rincé deux fois 10 minutes dans de l'eau

distillée. Le gel a été incubé une minute dans une solution de 0,02 % de thiosulfate de sodium puis rincé deux fois une minute dans de l'eau distillée. Ensuite, une solution de nitrate d'argent de 0,2 % a été ajoutée pour une incubation de 20 minutes et le gel a été rincé deux fois une minute dans de l'eau distillée. Afin de révéler les protéines, le gel a été incubé dans une solution de carbonate de sodium 2 % contenant 0,1 % de formaldéhyde 37 % (v/v) puis cette solution a été changée autant de fois que désiré, jusqu'à l'obtention de la coloration voulue. La réaction de révélation a été arrêtée en ajoutant une solution d'acide acétique 5 %.

2.10 Tests enzymatiques

2.10.1 Généralités

Les réactions enzymatiques se sont déroulées dans des cuvettes placées à l'intérieur d'un spectrophotomètre Cary 300 Win/UV dans lequel la température infusée aux cuvettes peut varier. La lecture de l'absorbance s'est faite à une longueur d'onde de 405 nm. Des substrats synthétiques de types *p*-nitrophényls esters ont été utilisés. Lors de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme, le *p*-nitrophénol libéré est quantifié par le spectromètre. De cette absorbance est soustraite celle émise dans une cuvette témoin qui contient du substrat mais pas d'enzyme. Chaque cuvette contenait du tampon à une molarité de 50 mM supplémenté de 0,05 % de $CaCl_2$ et au pH voulu, 30 µL de substrat dilué dans l'isopropanol (concentration finale de 0,3 mM) ainsi qu'une quantité d'enzyme purifiée calculée de façon à ce que la réaction enzymatique soit linéaire le plus longtemps possible (la vitesse de la réaction d'hydrolyse correspond à la pente de la droite (la dérivée) de l'absorbance en fonction du temps. Plus la pente est constante, plus l'incertitude sur la dérivée sera faible). Le volume final du mélange réactionnel était d'un millilitre et les cuvettes étaient préchauffées à la température choisie avant que le substrat et l'enzyme ne soient ajoutés. Afin de s'assurer que l'émulsion du substrat était la même pour la cuvette témoin et celle où avait lieu la réaction enzymatique, le tampon et le substrat pour deux réactions étaient pipetés dans la même cuvette. Après l'émulsion du substrat, la moitié de la cuvette était transférée dans une autre cuvette vide à laquelle l'enzyme était ajoutée. Cette procédure permettait la quantification de l'activité générée par l'enzyme et annulait celle provenant de l'hydrolyse spontanée du substrat. Les réactions se sont déroulées pour une durée de 5 minutes avec des prises de données toutes les 10 secondes. Une unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole de *p*-nitrophénol par minute en utilisant le *p*-nitrophénylmyristate comme substrat.

2.10.2 Tests de substrats, pH, température et thermostabilité de l'enzyme

Les principales caractéristiques à déterminer en présence d'une nouvelle enzyme sont le substrat, le pH et la température optimaux, sans ordre prédéfini. Ici, le substrat optimal a été déterminé en utilisant un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 9 avec 0,05 % de $CaCl_2$ et à une température de 50 °C. Ces conditions ont été choisies en lien avec la provenance des enzymes, soit de la biomasse d'un fermenteur où la température variait entre 50 et 70 °C et le pH entre 7 et 8,5. Les substrats qui ont été testés sont le *p*-nitrophényl butyrate (C4), le *p*-nitrophényl valérate (C5), le *p*-nitrophényl caprate (C10), le *p*-nitrophényl laurate (C12), le *p*-nitrophényl myristate (C14), le *p*-nitrophényl palmitate (C16) et le *p*-nitrophényl stéarate (C18).

Une fois le substrat préférentiel déterminé dans ces conditions, le pH optimal a été déterminé en utilisant ce substrat à 50 °C. Tous les tampons présentaient une molarité de 50 mM avec 0,05 % de $CaCl_2$. L'intervalle des pH analysés était situé entre 7,0-9,0; 8,0-10,0; 9,0-11,0 et les tampons correspondants étaient le Tris-HCl, le H_3BO_3-KCl-NaOH et le NaOH-glycine.

La température optimale a été déterminée à l'aide du tampon et du substrat préférentiels déterminés préalablement. L'intervalle de température testé variait entre 30 et 70 °C. Une fois le pH et la température optimaux déterminés, les substrat ont été testés à nouveau dans ces nouvelles conditions afin de vérifier si le pH ou la température avaient un effet sur la spécificité de l'enzyme.

La thermostabilité de l'enzyme est un autre facteur qui a été déterminé. L'enzyme mélangée à de l'eau a été incubée à plusieurs températures élevées (de 60 à 90 °C) jusqu'à quatre heures avec des prélèvements toutes les heures. L'aliquot ainsi prélevé était placé sur la glace pour en tester l'activité résiduelle dans les conditions optimales de pH, température et substrat. Un autre tube contenant de l'enzyme dans l'eau incubé le même temps sur la glace a servi de témoin.

2.10.3 Tests des métaux et autres inhibiteurs

L'effet de certains inhibiteurs sur la stabilité de l'enzyme a été analysé. Les ions métalliques (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, K^{+}), le sulfate d'ammonium comme agent oxydant, l'EDTA et l'acide éthylèneglycoltétracétique (EGTA) comme chélateurs, le phénylméthylsulphonyle fluoride (PMSF) comme inhibiteur de la sérine ainsi que des détergents (SDS, Triton X-100, Tween 20 et 80) ont été testés. Dans un tube ont été mélangés l'enzyme puis entre 1 et 10 mM d'inhibiteurs (sauf pour les détergents, entre 0,1 et 1 %) et après une incubation d'une heure à 37 °C dans l'eau, l'activité résiduelle a été analysée en utilisant les conditions

optimales de substrat, pH et température. Un tube contenant de l'enzyme dans l'eau mais sans inhibiteur a été incubé une heure à 37 °C et a servi de témoin.

L'effet des alcools et des solvants a aussi été analysé sur la lipase. L'acétone, l'acétonitrile, le DMF, le DMSO et l'hexane ont été utilisés comme solvants. L'éthanol, le méthanol, le glycérol, l'hexanol, le 1-butanol, le 2-butanol, le 1-propanol, l'isopropanol et l'isopentyl alcool ont constitué les alcools. L'enzyme a été pré-incubée avec 30 % de ces composés pendant une heure à 37 °C puis l'activité résiduelle a été analysée dans les conditions optimales.

3 RÉSULTATS

3.1 Criblage fonctionnel de la banque métagénomique

La banque métagénomique utilisée contenait l'ADN extrait de la biomasse d'un bioréacteur à cuvée séquentielle enrichi avec de la gélatine (Annexe C). Après 30 cycles de 72 heures pendant lesquels le pH et la température ont varié, l'ADN a été extrait de la biomasse et ligué avec le vecteur pIAFS2 (Annexe D). Les concatémères de vecteur et d'ADN ont été encapsidés dans des têtes du phage lambda puis une partie de ces phages a été utilisée afin d'infecter *E. coli* LE392MP.

Les transductants obtenus après l'infection ont été criblés sur un milieu nutritif contenant 1 % de tributyrine. Le premier criblage de 10 000 clones a mis en évidence une dizaine de colonies hydrolysant la tributyrine, parmi lesquels les clones F5-15 et F5-2. La terminologie employée utilise F pour fermenteur (ou bioréacteur), ainsi que 5 parce que l'ADN provient du cinquième fermenteur (sur un total de sept). Les chiffres suivants le tiret associent le clone à la colonie identifiée comme hydrolysant la tributyrine. À partir de ces clones positifs, l'objectif à court terme était d'en isoler l'enzyme responsable de l'activité lipolytique. La procédure employée visait à réduire par l'action d'endonucléases de restriction l'insert d'environ 40 kbs provenant de la banque métagénomique à une taille permettant de séquencer les fragments présentant encore une activité hydrolytique.

3.1.1 Patron de restriction du clone F5-15

Le clone F5-15 a été le premier dont l'identification de l'enzyme responsable de l'activité hydrolytique a été entreprise. Une culture liquide en milieu 2xTY a permis l'extraction du cosmide pIAFS2 contenant l'insert du clone F5-15. Le cosmide a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Sna*BI et *Sph*I, soit deux enzymes ne coupant pas au sein du vecteur pIAFS2. Les produits des digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 6A). La digestion du clone par *Sph*I a permis l'obtention de sept fragments d'ADN variant de 5000 à 12 000 pbs (figure 6A, puits 3).

3.1.2 Ligation du vecteur F5-15 digéré par *Sph*I sur lui-même

Afin de réduire la taille du fragment de 40 kbs, l'enzyme *Sph*I a été retenue. Le clone F5-15 a été digéré à nouveau par cette enzyme puis a été ligué sur lui-même. Le produit de la ligation inactivé a été introduit par choc thermique dans *E. coli* DH11S et les transformants ont été sélectionnés par l'ampicilline et la tributyrine. Les colonies présentant une zone d'hydrolyse ont été numérotées et sont suivies du suffixe Δ*Sph*I, qui signifie qu'elles ont perdues des fragments suite à la digestion par cette enzyme. Les cosmides de deux colonies ont été extraits puis digérés à nouveau par *Sph*I. L'observation de fragments d'ADN résiduels pour les colonies Δ*Sph*I par rapport au patron de restriction du cosmide original permettait d'évaluer quels fragments étaient essentiels à l'activité lipolytique du clone. Les produits des digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 6B). Les clones F5-15 Δ*Sph*I possédant toujours une activité lipolytique présentent un fragment à 5000 pbs et un autre à 12 000 pbs.

3.1.3 Sélection de fragments du clone F5-15 Δ*Sph*I pour le séquençage

Les fragments de 5000 et 12 000 pbs étant trop longs pour être séquencés en entier, ils ont été découpés du gel, purifiés puis réduits en de plus petits fragments par l'enzyme *Bam*HI. Le vecteur pUC18 a aussi été digéré par *Bam*HI ainsi que par *Sph*I. La ligation de pUC18 et des fragments digérés a été pratiquée et le produit résultant introduit par choc thermique dans *E. coli* DH11S. Les transformants ont été sélectionnés sur des géloses 2xTY contenant de l'ampicilline, de l'IPTG et du X-Gal, les colonies blanches étant celles ayant incorporé des fragments. Le plasmide d'entre 12 et 15 colonies blanches pour chaque fragment a été extrait puis digéré par *Sph*I et *Bam*HI afin de déterminer la taille de l'insert. Les produits des digestions ont été analysés sur électrophorèse en gel d'agarose (figure 7). Les fragments des puits 9 (située à 1200 pbs, provient du fragment initial de 5000 pbs) et 17 (située à 2000 pbs, provient du fragment initial de 12 000 pbs) ont été choisis pour le séquençage. Ils ont été découpés, purifiés, clonés dans pUC18 puis les vecteurs transformés dans *E. coli* DH11S. Le succès du clonage a été confirmé en extrayant des plasmides de colonies blanches pour chaque clonage puis le patron de digestion par *Sph*I et *Bam*HI a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les plasmides ont ensuite été purifiés, dosés par spectrophotométrie puis séquencés par le service de séquençage de Génome Québec.

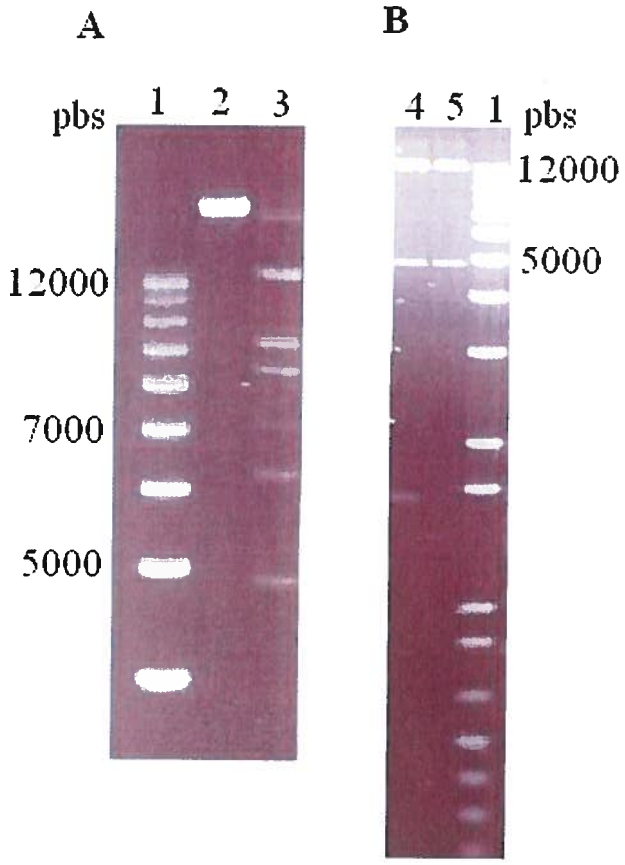


Figure 6 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de la digestion du cosmide du clone F5-15 par **A** *Sna*BI et *Sph*I et **B** *Sph*I après les délétions. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) patron de restriction par *Sna*BI, (3) patron de restriction par *Sph*I et (4-5) cosmides F5-15 Δ*Sph*I de 2 colonies hydrolysant la tributyrine digérés par *Sph*I.

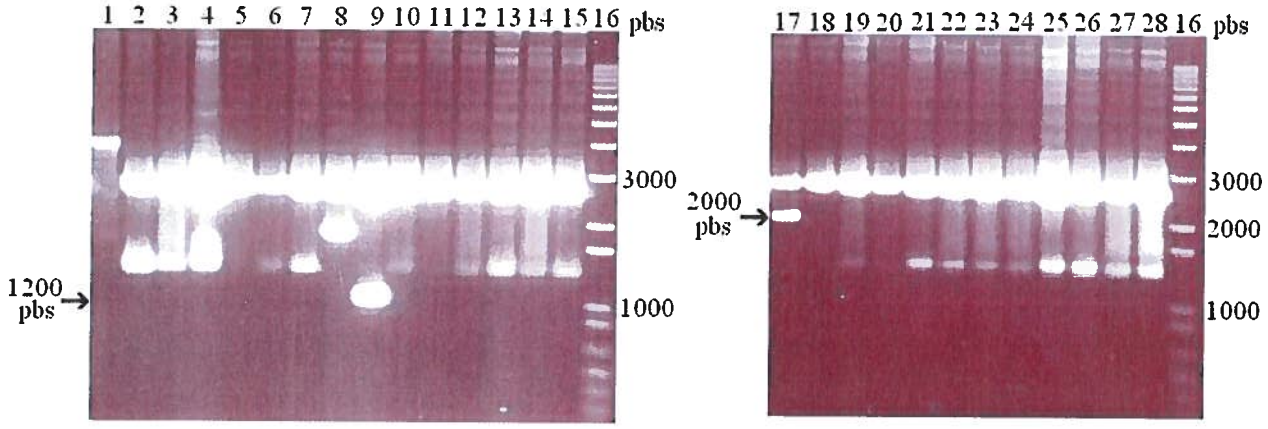


Figure 7 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de la carte de restriction par *Sph*I et *Bam*HI des fragments de 5000 et 12 000 pbs digérés par *Bam*HI et clonés dans pUC18. (1-15) Plasmides pUC18 des colonies blanches 1 à 15 ayant incorporé des fragments *Bam*HI/*Sph*I du fragment initial de 5000 pbs, (16) marqueur de poids moléculaire et (17-28) plasmides pUC18 des colonies blanches 1 à 12 ayant incorporé des fragments *Bam*HI/*Sph*I du fragment initial de 12 000 pbs.

3.1.4 Identification du gène lipolytique du clone F5-15

Les séquences reçues de Génome Québec ont mis en évidence un gène de carboxylestérase au sein d'une partie du fragment initial de 12 000 pbs (figure 8). La reconstitution génique autour de l'estérase a été possible grâce à l'envoi du vecteur pIAFS2 du clone F5-15 pour le séquençage de l'insert. En aval de l'estérase se retrouve un gène incomplet codant pour une méthylase à ARN qui possède 61 % d'homologie avec celle de *Burkholderia sp.* Le gène de la carboxylestérase possède 40 % d'homologie avec celle de *Deinococcus geothermalis* et celui du récepteur TRAP, 58 % avec *Myxococcus xanthus*. La protéine de surface cellulaire partage un faible 23 % de ressemblance avec celle de *Bacillus cereus* tandis que la protéine Bpro et le régulateur de transcription de la famille TetR sont affiliés à ceux de *Polaromonas* dans une proportion de 65 et 67 % respectivement. Finalement, la glycolate oxydase possède 81 % d'homologie avec celle de *Pseudomonas stutzeri*.

Le gène de la carboxylestérase (figure 9) mesure 1624 pbs et il encode pour une protéine de 541 acides aminés avec un poids moléculaire théorique de 58 kDa. Son pI théorique est de 4,8 et le pourcentage en G + C du gène est de 67,2 %. Le codon d'initiation est précédé sept bases en amont par la séquence gagga qui est typique d'une séquence de fixation des ribosomes (Shine-Dalgarno). Le gène possède aussi une séquence G-X-S-X-G située à 223 acides aminés après le début du gène, inclus dans le motif F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G (souligné à la figure 9) qui est associé aux estérases. Une analyse avec le logiciel SignalP 3.0 n'a pas permis d'établir un site de clivage potentiel pour un peptide signal, autant chez les bactéries Gram négatives que chez les Gram positives.

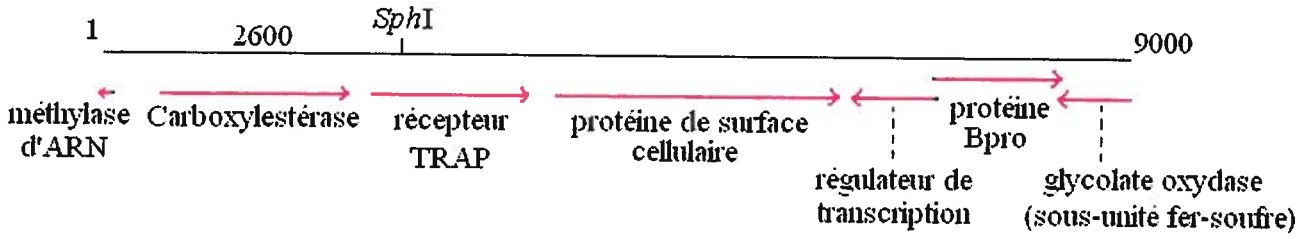


Figure 8 Organisation génétique du voisinage de la carboxylestérase du clone F5-15.

séquence Shine-Dalgarno

```
   1  aaacatcaag gaggaaattt catgaagcct cagtcgggac atcgcttcgc cgctggtgtg gcggcgctgt tgctggccgc cgggctcggc
       K  H  Q   G  G  N   F  M  K  P   Q  S  G   H  R  F   A  A  G  V   A  A  L   L  L  A   A  G  L  G
```

méthionine de départ

```
  91  acgggctgtt cgtccgactc caagtccagc agcgagcaac cccgcgaacc ggatccgctg gtccgcaaga ccgagcaagg cgaggtgcgc
       T  G  C   S  S  D   S  K  S  S   S  E  Q   P  R  E   P  D  P  L   V  R  K   T  E  Q   G  E  V  R

 181  ggcttcgcct ctgaatccgg cgacacactg gtgttccgcg gcattcccta tgccgcgccg ccggtcgggg agctgcgctt cgcgccgccg
       G  F  A   S  E  S   G  D  T  L   V  F  R   G  I  P   Y  A  A  P   P  V  G   E  L  R   F  A  P  P

 271  caaccgcccg cggtccgctc gaagatcttc gaagccacca ggttcgggcc cgactgcgcg caggccggcg gcgtcatggg tgctgccagc
       Q  P  P   A  V  R   S  K  I  F   E  A  T   R  F  G   P  D  C  A   Q  A  G   G  V  M   G  A  A  S

 361  ctcaacgaag actgcctgta cctgaacatc tacgcgcccg cctccggtga caaccatccg gtgatggtgt ggattcacgg cggcgcgttc
       L  N  E   D  C  L   Y  L  N  I   Y  A  P   A  S  G   D  N  H  P   V  M  V   W  I  H   G  G  A  F

 451  atcggcggct ccggcggcac caactatgat ccgacccggt tggtcgccga gggcgtggtg ttggtgacca tcaactaccg gctgggcgcg
       I  G  G   S  G  G   T  N  Y  D   P  T  R   L  V  A   E  G  V  V   L  V  T   I  N  Y   R  L  G  A

 541  ttcggcttcc tcgcccaccc ggcgctgacc gccgagcagg gcggcgtgtc cggcgcctac ggcctgctcg accagaaggc ggcgctggag
       F  G  F   L  A  H   P  A  L  T   A  E  Q   G  G  V   S  G  A  Y   G  L  L   D  Q  K   A  A  L  E
```

séquence consensus

```
 631  tgggtacagg ccaacatcgc caacttcggc ggcgacccga acaacgtcac catcttcggc gagtcggccg gcggccacag cgtgctggcg
       W  V  Q   A  N  I   A  N  F  G   G  D  P   N  N  V   T  I  F   G  E  S  A   G   G  H   S  V  L  A

 721  ttggtcgctt cgccgatcac cggtgggctg ttccacaagg ccatcgtcca gagcggttcg ctgctgcccg agcagcagtc gctggaggaa
       L  V  A   S  P  I   T  G  G  L   F  H  K   A  I  V   Q  S  G  S   L  L  P   E  Q  Q   S  L  E  E

 811  gcggagcggc tcggccaggc agtgttcgcc gagtgcgaga acaccgcctg cctgcgctcg ctcagcgtcg agaaggtgct ggagctgcag
       A  E  R   L  G  Q   A  V  F  A   E  C  E   N  T  A   C  L  R  S   L  S  V   E  K  V   L  E  L  Q

 901  gccgggttga gcaacggcat cggcctggtg gtgaactacg gttcggcgct gcagccgcag cactcgatca agagcgcgct cgaggccggc
       A  G  L   S  N  G   I  G  L  V   V  N  Y   G  S  A   L  Q  P  Q   H  S  I   K  S  A   L  E  A  G

 991  gaattccagc gcgtgccgat cctggccggc accaacgccg acgagtacac gctgttcttg ggcatccagg cgctcgaccc caccaagagt
       E  F  Q   R  V  P   I  L  A  G   T  N  A   D  E  Y   T  L  F  L   G  I  Q   A  L  D   P  T  K  S

1081  ccgccggcgc cggagttcta caagccggcc atcgccagcc tcatcggcca gccggtcgac agcctggcgg tctccatcgt cgccgaggct
       P  P  A   P  E  F   Y  K  P  A   I  A  S   L  I  G   Q  P  V  D   S  L  A   V  S  I   V  A  E  A

1171  taccccctgt ccagctataa cgacaatgtc tggcaggcac tgggcgccat cggcaccgac gcggcgttcg cctgcaacgc cttgacccag
       Y  P  L   S  S  Y   N  D  N  V   W  Q  A   L  G  A   I  G  T  D   A  A  F   A  C  N   A  L  T  Q

1261  gcgcagacct tggcgcgcca caacgtcccg gtctacgcct acgagttcgc cgatcgcaac gcgccggtga cgctgctgcc gacgcggccg
       A  Q  T   L  A  R   H  N  V  P   V  Y  A   Y  E  F   A  D  R  N   A  P  V   T  L  L   P  T  R  P

1351  gaccccgcga agatcgagct gggcgcctcg cacgccttcg agctccccta catcttcggc agcgaatcgt tgttccgcgc ccgcggcgcc
       D  P  A   K  I  E   L  G  A  S   H  A  F   E  L  P   Y  I  F  G   S  E  S   L  F  R   A  R  G  A

1441  agcgaggagc aggtggagct gtcgcaaacg atgatcaggt actggacccg cttcgccaag aacggcgacc ccaacggcga cgacgatctg
       S  E  E   Q  V  E   L  S  Q  T   M  I  R   Y  W  T   R  F  A  K   N  G  D   P  N  G   D  D  D  L

1531  cgttggccgg agttcaattt ggacgaggaa ctgatgcagt tcagaacgcc cctgccgaga cgcatcggca gcgcgagctt cgacatctcg
       R  W  P   E  F  N   L  D  E  E   L  M  Q   F  R  T   P  L  P  R   R  I  G   S  A  S   F  D  I  S

1621  caccattgca tgatctggaa tcactga
       H  H  C   M  I  W   N  H  ⊖
```

fin du gène

Figure 9 Séquence de la carboxylestérase F5-15. On y retrouve une séquence Shine-Dalgarno, la méthionine de départ, la séquence consensus **G-X-S-X-G** ainsi que le codon de terminaison.

3.1.5 Expression de la carboxylestérase du clone F5-15

L'expression de la carboxylestérase a été mise en évidence par un zymogramme fait sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions non dénaturantes. Les fractions intracellulaires et extracellulaires de cultures liquides d'une colonie Δ*Sph*I et de *E. coli* DH11S (comme référence) ont été chargées sur le gel. Suite à la migration, un zymogramme a été pratiqué puis le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie (figure 10). Une protéine correspondant à une bande d'intensité moyenne dans le zymogramme est visible vers 60 kDa (poids attendu de 58 kDa) pour la fraction intracellulaire du clone F5-15 Δ*Sph*I et plus faiblement pour la fraction extracellulaire. La coloration au bleu de Coomassie ne met pas en évidence cette protéine précisément. Aucune réaction pour le zymogramme au niveau de la culture de DH11S seule n'a été détectée.

3.1.6 Conclusions sur le clone F5-15

L'homologie des séquences d'acides aminés a identifiée le gène lipolytique du clone F5-15 comme étant associé à celui d'une carboxylestérase. Ce résultat est renforcé par la présence d'une séquence de type G-X-S-X-G intégré dans un motif propre aux estérases. Aussi, le zymogramme pratiqué indique une plus grande présence intracellulaire de la carboxylestérase. Dans l'optique où la découverte de nouvelles lipases de préférence extracellulaires était le but visé, l'enzyme du clone F5-15 a été mise en suspens et l'isolement de l'enzyme lipolytique d'un autre clone, le clone F5-2, a été entamée.

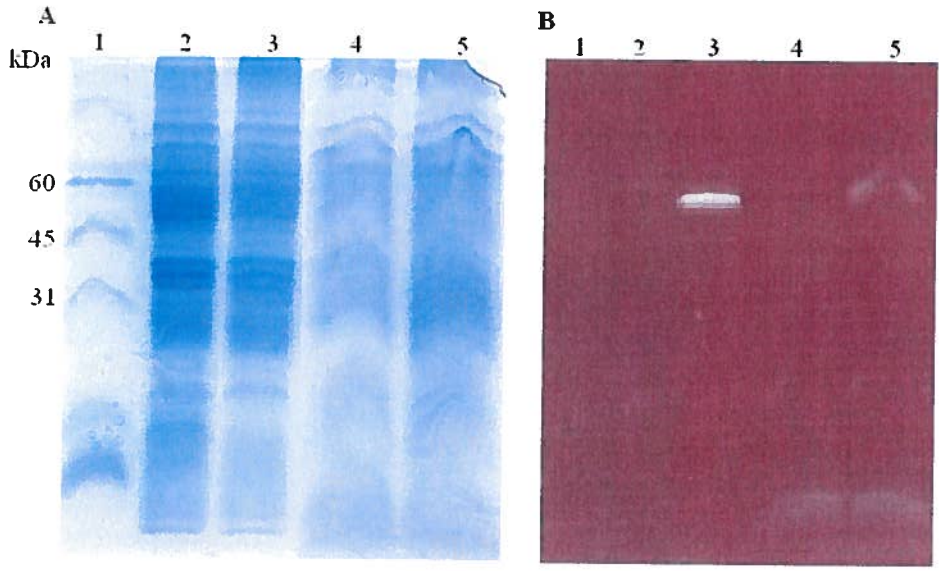


Figure 10 A SDS-PAGE et **B** zymogramme de *E. coli* DH11S et de *E. coli* DH11S avec pIAFS2 contenant l'ADN du clone F5-15 Δ*Sph*I. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) *E. coli* DH11S intracellulaire, (3) *E coli* DH11S avec le clone F5-15 Δ*Sph*I intracellulaire, (4) *E. coli* DH11S extracellulaire et (5) *E coli* DH11S avec le clone F5-15 Δ*Sph*I extracellulaire.

3.2 Le clone F5-2

3.2.1 Patron de restriction du clone F5-2

Le clone F5-2 est un autre clone isolé de la banque métagénomique dont l'ADN provient du fermenteur 5. La première étape a été d'isoler le cosmide du clone puis de le digérer avec plusieurs enzymes de restriction. Les enzymes *Bgl*II, *Hind*III, *Hpa*I, *Kpn*I, *Nde*I, *Pst*I, *Sph*I, *Xba*I et *Xho*I ont été utilisées. Le patron de digestion a été analysé sur un gel d'agarose (figure 11). Les enzymes *Hpa*I, *Nde*I et *Xba*I n'ont produit aucun fragment d'ADN, tandis que *Bgl*II et *Hind*III ont générées chacune trois fragments. Les enzymes *Kpn*I, *Pst*I, *Sph*I et *Xho*I ont généré entre quatre et une dizaine de fragments.

3.2.2 Ligation du vecteur du clone F5-2 digéré *Sph*I sur lui-même

Suite à l'analyse de la carte de restriction (figure 11), l'enzyme *Sph*I a été choisie pour éliminer des fragments non responsables de l'activité lipolytique du clone F5-2. Le cosmide a donc été digéré par cette enzyme puis ligué sur lui-même. Suite à l'inactivation du produit de la ligation, ce dernier a été transformé dans *E. coli* DH11S et les transformants sélectionnés à l'aide de géloses 2xTY contenant de l'apramycine. Une centaine de colonies ont ensuite été repiquées sur une gélose 2xTY avec de la tributyrine pour observer après quelques jours quatre colonies hydrolysant le substrat (nommées Δ*Sph*I). Le cosmide de ces colonies a été extrait ainsi que celui de deux colonies qui n'hydrolysaient pas la tributyrine. Ces cosmides ont été digérés par l'enzyme *Sph*I afin de confirmer la délétion de certains fragments et le patron de restriction analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 12).

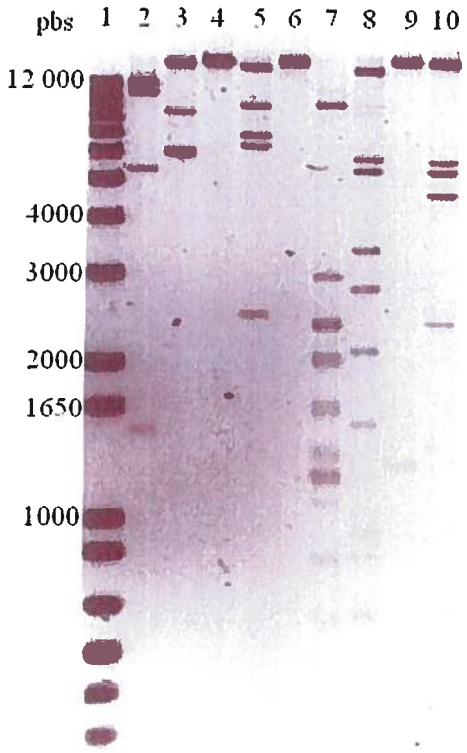


Figure 11 Carte de restriction du clone F5-2 par plusieurs enzymes, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose. (1) Marqueur de poids moléculaire, digestion du cosmide F5-2 par (2) *Bgl*II, (3) *Hind*III, (4) *Hpa*I, (5) *Kpn*I, (6) *Nde*I, (7) *Pst*I, (8) *Sph*I, (9) *Xba*I et (10) *Xho*I.

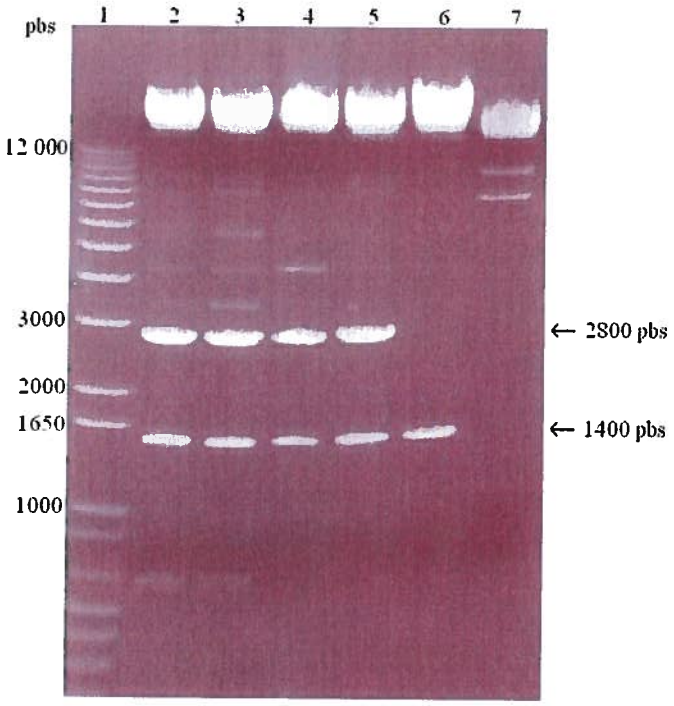


Figure 12 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose du patron de restriction de quatre cosmides de colonies issues du clone F5-2 Δ*Sph*I digéré par *Sph*I ainsi que de deux cosmides provenant de colonies Δ*Sph*I n'hydrolysant pas la tributyrine. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2-5) cosmides Δ*Sph*I digérés par *Sph*I et (6-7) cosmides de colonies Δ*Sph*I n'hydrolysant pas la tributyrine.

3.2.3 Sélection de fragments du clone F5-2 Δ*Sph*I

À la figure 12, il est possible d'observer que les quatre cosmides Δ*Sph*I digérés offrent sensiblement le même patron, soit deux fragments dominants dont l'un est situé près de 1400 pbs et l'autre près de 2800 pbs. Ces fragments ont été découpés du gel, purifiés puis clonés séparément dans pUC18, préalablement digéré par *Sph*I. Les transformants ont été sélectionnés à l'aide d'ampicilline, d'IPTG et de X-Gal. Une douzaine de colonies pour chacune des transformations ont été repiquées en gélose 2xTY contenant de la tributyrine en plus d'être mises en culture liquide en vue d'en extraire le plasmide. Aucune hydrolyse de la tributyrine n'a été observée pour les fragments clonés séparément. Les plasmides contenant le fragment de 1400 pbs et celui de 2800 pbs ont été extraits puis digérés à nouveau par *Sph*I afin de vérifier la présence de l'insert. Un plasmide contenant le fragment de 1400 pbs a ensuite été purifié à l'aide de la trousse « Qiaquick Gel Extraction Kit » de Qiagen, dosé par spectrophotométrie puis séquencé à Génome Québec. Le fragment de 2800 pbs étant trop long pour être séquencé en entier, il a été subdivisé en de plus petits morceaux par l'enzyme *Pst*I. Le résultat de la digestion de pUC18 avec le fragment de 2800 pbs par *Pst*I a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 13). L'ADN contenu dans les morceaux situés vers 1000 et 1300 pbs a été découpé, purifié puis cloné individuellement dans pUC18 digéré également par *Pst*I. Après la transformation, les plasmides de dix colonies blanches ont été extraits puis digérés par *Pst*I afin de vérifier le succès du clonage. Le résultat de la digestion a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Un plasmide contenant le morceau d'ADN de 1000 pbs et un autre celui de 1300 pbs a été purifié, dosé puis séquencé.

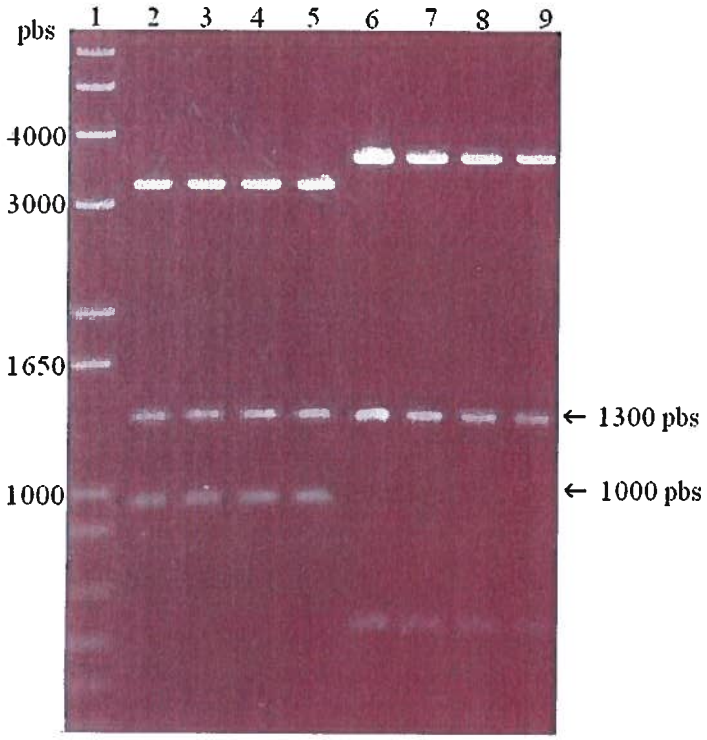


Figure 13 Patron de restriction par *Pst*I du vecteur pUC18 contenant le fragment de 2800 pbs issu du cosmide F5-2 Δ*Sph*I digéré par *Sph*I, analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2-9) plasmides de 8 colonies contenant le fragment de 2800 pbs digérés par *Pst*I.

3.2.4 Identification du gène lipolytique du clone F5-2

Les chromatogrammes obtenus par Génome Québec ont été soumis à des analyses permettant de les affilier avec des séquences de gènes connus via la banque de données du NCBI. La comparaison des séquences a mené à l'identification de plusieurs gènes, tous apparentés à des microorganismes différents (figure 14). On y retrouve un régulateur transcriptionnel qui présente 72 % d'homologie avec celui de *Mesorhizobium loti*, la lipase IAF5.2 qui possède 49 % d'homologie avec celle de *Thermobifida fusca* YX, le régulateur transcriptionnel de type AraC qui a 62 % d'homologie avec celui de *Ralstonia eutropha* ainsi que le transporteur de type ABC dont l'homologie est de 89 % avec celui de *Marinobacter algicola*. D'autres amorces ont été dessinées à partir des gènes identifiés (amorces Transporteur ABC, Régulateur AraC et Région 1400-2800) et ont été envoyées à Génome Québec avec le vecteur entier du clone F5-2. Les résultats du séquençage ont permis de relier entre eux tous les fragments qui ont été séquencés initialement (fragments de 1400, de 1000 et de 1300 pbs) pour ainsi recréer la carte génique entourant la lipase.

Le gène de la lipase est réparti sur les fragments de 1400 et de 2800 pbs du clone F5-2 Δ*Sph*I digéré par *Sph*I (figure 12). Il a été nommé *lipIAF5.2* et mesure 928 pbs (figure 15). Il encode pour une protéine de 308 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 32,6 kDa et un point isoélectrique calculé de 5,5. Le gène présente un pourcentage de G + C de 65,2 %. L'analyse de la présence d'un peptide signal a montré un site de clivage entre le 27 et le 28ème acide aminé avec une probabilité de 99,7 %. En amont du codon d'initiation (ATG) se trouve la séquence gaggag qui est typique d'une séquence Shine-Dalgarno, soit un site servant de guide à la fixation des ribosomes chez les procaryotes. Finalement, on retrouve une séquence de type G-X-S-X-G située173 acides aminés après le début de la traduction du gène.

La traduction du gène codant pour la lipase a été comparée avec les séquences en acides aminés des trois protéines les plus homologues, selon le résultat du BLAST, dans un alignement de séquences via le logiciel ClustalW (figure 16). Cet alignement met en évidence plusieurs acides aminés en commun (84 sur un total de 308, soit 27,3 %), identifiés à l'aide d'astérisques. Certains résidus (représentés par un carré, ■) seraient ceux impliqués dans la triade catalytique, qui comprend une sérine, un acide aspartique, une histidine ainsi qu'un anneau oxanion.

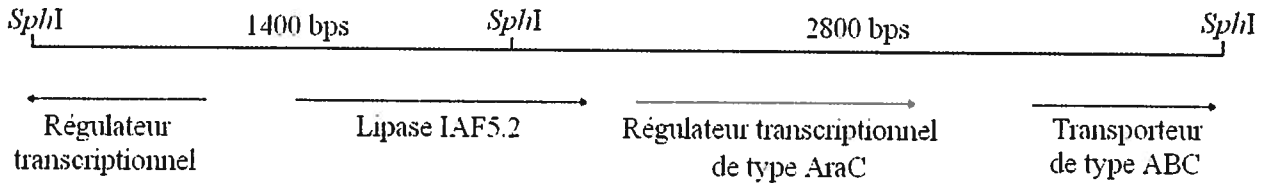


Figure 14 Organisation génétique du voisinage de la lipase IAF5.2.

Séquence Shine-Dalgarno

```
1    tcgcacgata agacaaaaaa taacttcgag gagccttgcc atgccaataa ccgccagaaa cacactggcc tcgttgctgc ttgcgtcttc
     H  R  T  I   R  Q  K   I  T  S   R  S  L  A   M  P  I   T  A  R   N  T  L  A   S  L  L   L  A  S
```

méthionine de départ

```
91   cgcattgctg ctctccggaa ccgcgttcgc cgccaacccg ccgggggcg atcccgatcc cggctgccag accgactgca actatcagcg
     S  A  L  L   L  S  G   T  A  F   A|A  N  P   P  G  G   D  P  D   P  G  C  Q   T  D  C   N  Y  Q
```

site de clivage du peptide signal

```
181  cggccccgat ccgaccgacg cctacctcga agccgcgagc ggaccgtaca ccgtgagcac catccgcgtt tccagcctgg tgcccggctt
     R  G  P  D   P  T  D   A  Y  L   E  A  A  S   G  P  Y   T  V  S   T  I  R  V   S  S  L   V  P  G

271  cggcggcggc accatccact acccgaccaa tgccggcggc ggcaagatgg ctggcatcgt ggtcattccg ggctatctgt cgttcgagtc
     F  G  G  G   T  I  H   Y  P  T   N  A  G  G   G  K  M   A  G  I   V  V  I  P   G  Y  L   S  F  E

361  gtcgatcgaa tggtggggac cgcggctggc ttcgcacggc ttcgtggtca tgaccatcga caccaacacc atctatgacc agccgagcca
     S  S  I  E   W  W  G   P  R  L   A  S  H  G   F  V  V   M  T  I   D  T  N  T   I  Y  D   Q  P  S

451  gcgccgcgac cagatcgagg ccgccctgca gtacctggtc aaccagagca actcctcctc cagccccatc agcggcatgg tcgacagctc
     Q  R  R  D   Q  I  E   A  A  L   Q  Y  L  V   N  Q  S   N  S  S   S  S  P  I   S  G  M   V  D  S

541  gcgcctggcg gcggtcggct ggtcgatggg cggcggcggg acgctgcaac tggccgccga cggcggaatc aaggccgcca tcgccttggc
     S  R  L  A   A  V  G  W  S  M  G  G  G  G   T  L  Q   L  A  A   D  G  G  I   K  A  A   I  A  L
```

séquence consensus

```
641  gccatggaac tccagcatca acgacttcaa ccgcatccag gtgccgaccc tgatcttcgc ctgccagctg gatgccatcg cgccagtggc
     A  P  W  N   S  S  I   N  D  F   N  R  I  Q   V  P  T   L  I  F   A  C  Q  L   D  A  I   A  P  V

     SphI
731  cttgcatgcc tcgccgttct ataaccgcat cccgaacacg acccccaagg ccttcttcga gatgaccggc ggggaccact ggtgcgccaa
     A  L  H  A   S  P  F   Y  N  R   I  P  N  T   T  P  K   A  F  F   E  M  T  G   G  D  H   W  C  A

821  cggcggcaac atctacagcg cgctgctcgg caagtacggc gtgtcttgga tgaagctgca cctcgaccag gatacgcgtt acgcgccgtt
     N  G  G  N   I  Y  S   A  L  L   G  K  Y  G   V  S  W   M  K  L   H  L  D  Q   D  T  R   Y  A  P

911  cctgtgcggt cccaaccacg cggctcagac cctgatctcc gaataccgag gtaactgccc gtactgaacc atgcccggc
     F  L  C  G   P  N  H   A  A  Q   T  L  I  S   E  Y  R   G  N  C   P  Y  -  T   M  P  G
```

fin de la lipase

Figure 15 Séquence du gène de la lipase IAF5.2. On y retrouve une séquence Shine-Dalgarno, la méthionine de départ, le site du clivage du peptide signal présomptif, la séquence consensus **G-X-S-X-G** ainsi que le codon de terminaison.

```
Lip IAF5-2   ANPPGGDPDPGCQTDCNYQRGPDPTDAYLEAASGPYTVSTIRVSSL-VPGFGGGTIHYPT
BAB86909     --------AVSAQTN-PYERGPAPTTSSLEASRGPFSYQSFTVSR--PSGYRAGTVYYPT
YP288944     ANP--------------YERGPNPTDALLEASSGPFSVSEENVSRLSASGFGGGTIYYPR
AAD09315     -------------ADNPYERGPAPTESSIEALRGPYSVADTSVSSLAVTGFGGGTIYYPT
                                * *** **    **  **       **     *   **  **

Lip IAF5-2   NAGGGKMAGIVVIPGYLSFESSIEWWGPRLASHGFVVMTIDTNTIYDQPSQRRDQIEAAL
BAB86909     NA-GGPVGAIAIVPGFTARQSSINWWGPRLASHGFVVITIDTNSTLDQPDSRSRQQMAAL
YP288944     E--NNTYGAVAISPGYTGTEASIAWLGERIASHGFVVITIDTITTLDQPDSRAEQLNAAL
AAD09315     STSDGTFGAVVIAPGFTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVFTIDTNTTLDQPDSRGRQLLAAL
                          **      ** * * * ** **** ****    ***  *  *  ***

                                        177 178
                                          ■■
Lip IAF5-2   QYLVNQSNSSSSPISGMVDSSRLAAVGWSMGGGGTLQLAADG-GIKAAIALAPWNSSIND
BAB86909     SQVATLSRTSSSPIYNKVDTSRLGVMGWSMGGGGSLISARNNPSIKAAAPQAPWSASKN-
YP288944     NHMINR---ASSTVRSRIDSSRLAVMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIPLTPWHLNKN-
AAD09315     DYLTGRSS-----VRGRIDSGRLGVMGHSMGGGGTLEAAKSRPSLQAAIPLTPWNLD-KS
                                *  **   * ****** *  *       **    **

                          223       229                     253
                           ■         ■                      ■
Lip IAF5-2   FNRIQVPTLIFACQLDAIAP--T--HASPFYNRIPNTTPKAFFEMTGGDHWCANGGNIYS
BAB86909     FSSLTVPTLIIACENDTIAP--VNQHADTFYDSM-SRNPREFLEINNGSHSCANSGNSNQ
YP288944     WSSVTVPTLIIGADLDTIAPVAT--HAKPFYNSLPSSISKAYLELDGATHFAP---NIPN
AAD09315     WPEVSTPTLVVGADGDTIAPVAS--HAEPFYSGLPSSTDRAYLELNNATHFSPNTSN---
                   ***      * ***     **  **            *     *      *

Lip IAF5-2   ALLGKYGVSWMKLHLDQDTRYAPFLC-G-PNHAAQTLISEYR-GNCPY--
BAB86909     ALLGKKGVAWMKRFMDNDRRYTSFAC-SNPN---SYNVSDFRVAACN---
YP288944     KIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYTQFLCPG-PRDGLFGEVEEYR-STCPF--
AAD09315     TTIAKYSISWLKRFIDDDTRYEQFLC---PLPRPSLTIEEYR-GNCPHGS
                 *    * *   * * **  * *   *           *   *
```

Figure 16 Alignement de séquences avec ClustalW de la lipase IAF5.2 avec la triacylglycérol de *Thermobifida fusca* YX (YP_288944), la lipase de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (AAD09315) et la dépolymérase de *Acidovorax delafieldii* (BAB86909). Les astérisques (*) désignent les acides aminés conservés, tandis que les carrés (■) indiquent l'anneau oxanion, la sérine, l'acide aspartique et l'histidine présomptifs du site actif.

3.2.5 Mutations des histidines 229 et 253 de la lipase IAF5.2

Suite à l'analyse de l'alignement des séquences d'acides aminés de la lipase avec celles les plus affiliées (figure 16), deux résidus histidine ont été identifiés comme pouvant faire partie du site actif de l'enzyme. Ces histidines, soit les résidus 229 et 253, ont été mutées pour des alanines selon la technique d'élongation par chevauchement (schématisée à la figure 17). Les amorces externes au gène utilisées étaient celles dessinées pour le clonage dans pUC18, Lip5 ECFOR et Lip3 ECREV. Les premières amplifications ont été planifiées afin de muter le brin matrice pour les deux histidines en utilisant l'amorce externe Lip3 ECREV et les amorces H229A for (PCR B, mutation du résidu 229) et H253A for (PCR D, mutation du résidu 253). La deuxième amplification a été effectuée afin de muter le brin complémentaire avec l'amorce externe Lip5 ECFOR et les amorces H229A rev (PCR A, mutation du résidu 229) et H253A rev (PCR C, mutation du résidu 253). L'hybridation lors des réactions a été faite à une température de 72 °C. Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 18A). Les produits des PCR A et B purifiés ont servi à régénérer le gène de la lipase IAF5.2 avec l'histidine 229 mutée pour une alanine à l'aide des amorces externes Lip5 ECFOR et Lip5 ECREV. Les produits des PCR C et D ont subi le même sort ce qui a créé un nouveau gène avec une alanine au niveau du résidu 253. Ces produits finaux ont été analysés sur électrophorèse en gel d'agarose, purifiés pour ensuite être digérés par *Eco*RI et *Hind*III et ligués dans le vecteur pUC18 (figure 18B). Le produit des ligations inactivés a été incorporé par choc thermique dans *E. coli* DH11S. Les colonies blanches et quelques colonies bleues ont été repiquées sur des géloses avec de la tributyrine et le plasmide de certaines colonies a été envoyé séquencer afin de confirmer les mutations. L'hydrolyse de la tributyrine a été observée chez les colonies possédant le gène de la lipase avec la mutation H229A. Des cultures liquides de colonies bleues et blanches pour chaque mutant ont été faites et les surnageants analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure 19). L'activité est visible sur le zymogramme pour la lipase IAF5.2 non mutée ainsi que pour la lipase mutée au niveau de l'histidine 229, avec un patron d'activité différent. Il n'y a pas d'activité au niveau du clone contenant le gène avec la mutation H253A.

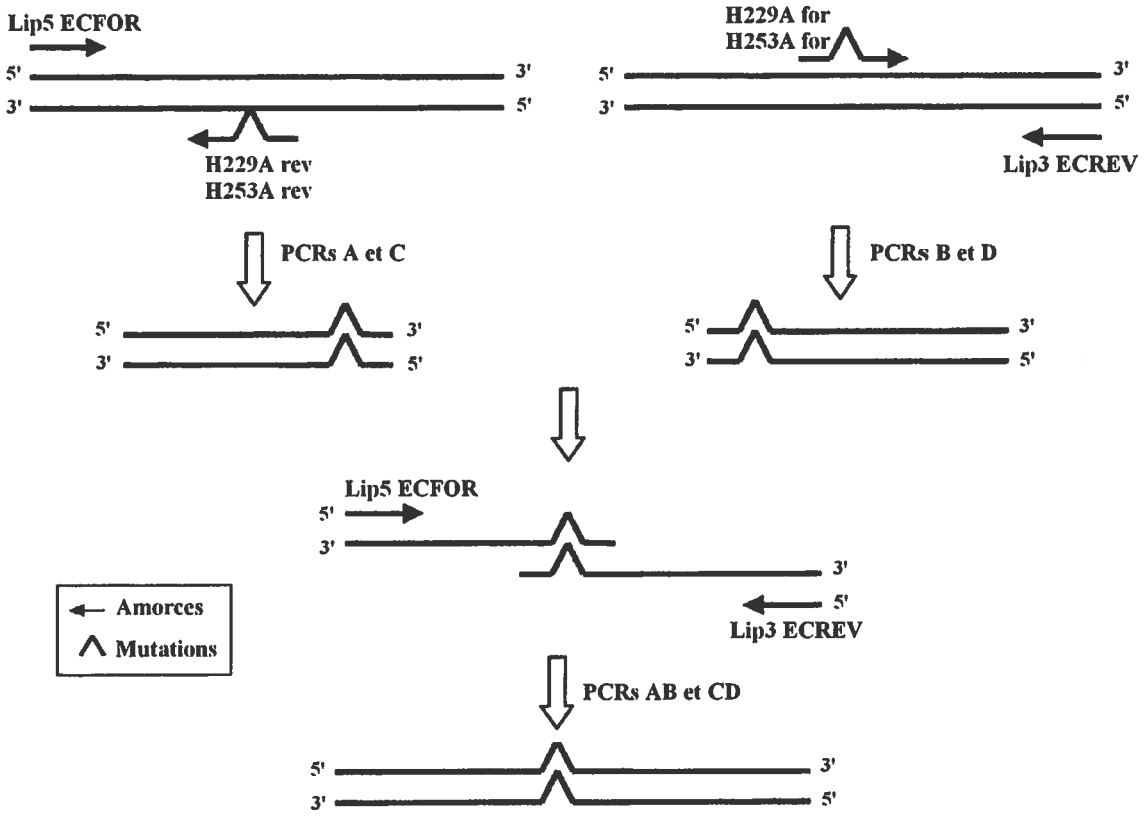


Figure 17 Schématisation de l'élongation par chevauchements utilisée pour muter les résidus histidines 229 et 253 présents dans la lipase IAF5.2 (Higuchi *et al.*, 1988).

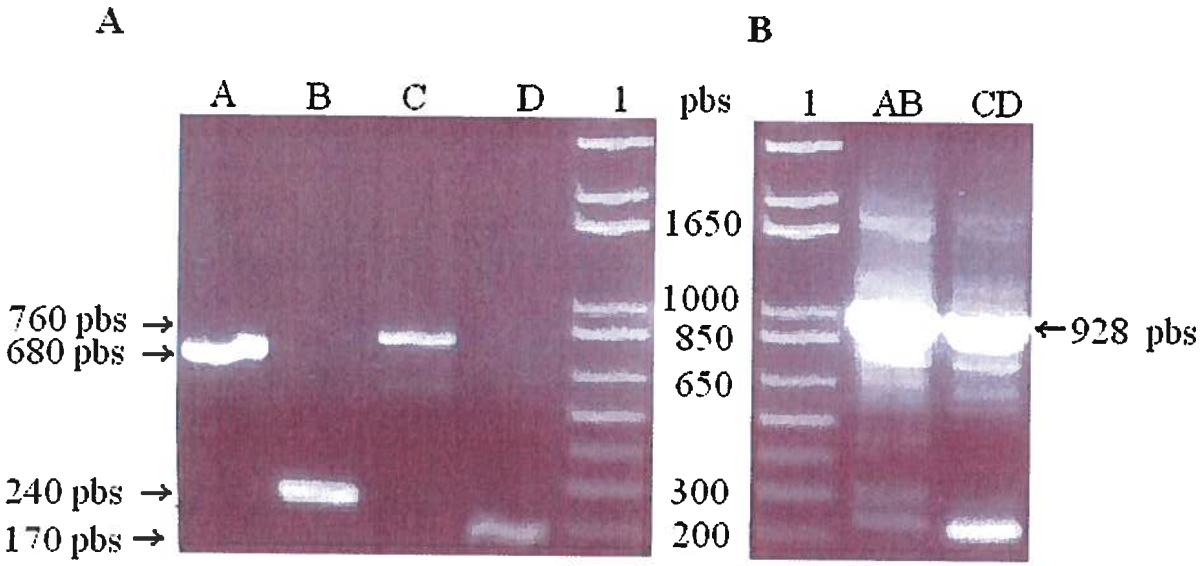


Figure 18 Électrophorèse en gel d'agarose **A** des produits des PCR A, B, C et D et **B** du gène de la lipase IAF5.2 muté provenant de l'amplification des produits AB (mutation histidine 229) et CD (mutation histidine 253). (1) Marqueur de poids moléculaire et (A, B, C, D, AB, CD) produits des PCR.

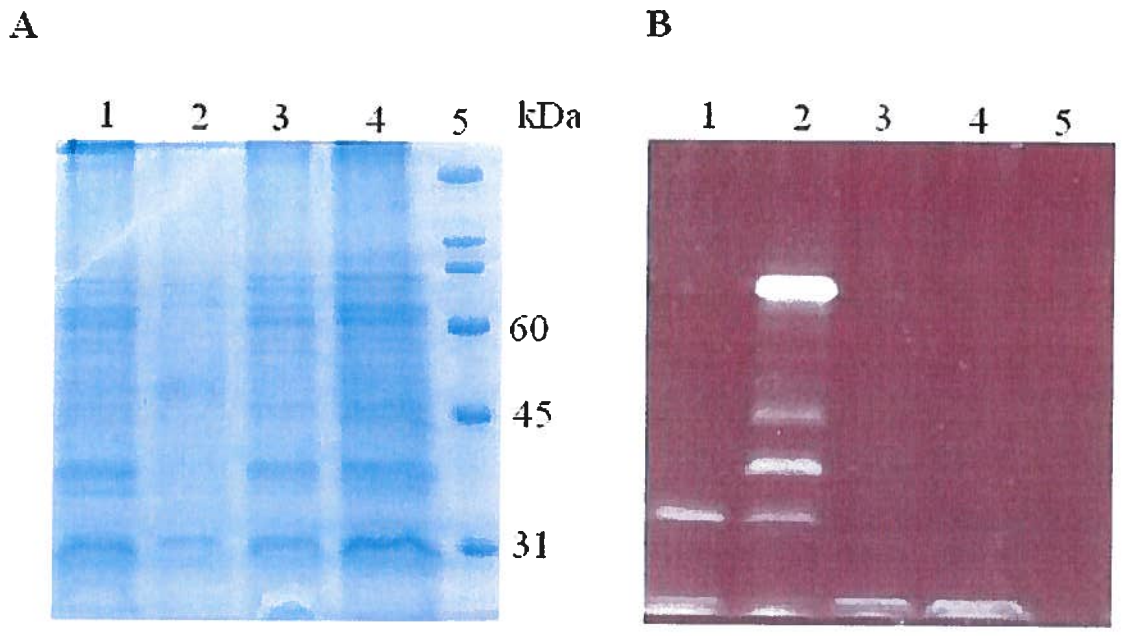


Figure 19 A SDS-PAGE et **B** zymogramme du surnageant de cultures en 2xTY. (1) Lipase IAF5.2, (2) lipase mutée H229A, (3) lipase mutée H253A, (4) colonie bleue (sans lipase) et (5) marqueur de poids moléculaire.

À présent que le gène responsable de l'activité lipolytique du clone F5-2 a été identifié, il importe de savoir si ce gène correspond réellement à celui d'une lipase. Le gène a donc été exprimé chez deux hôtes différents en vue de purifier la protéine pour laquelle il code et d'ainsi la caractériser.

3.2.6 Clonage du gène *lipIAF5.2* chez *E. coli*

Le gène de la lipase IAF5.2 a été cloné dans pUC18 en vue d'être exprimé chez *E. coli* DH11S. Deux amorces ont été dessinées à partir de la séquence entourant le gène, soit Lip5 ECFOR qui comprend un site de restriction pour l'enzyme *Eco*RI et Lip3 ECREV où est inclus le site reconnu par l'enzyme *Hind*III. L'amplicon généré par l'amplification du gène a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 20A). Il présente une taille près de 1000 pbs, soit la taille approximative du gène de la lipase (928 pbs). Le fragment a été purifié du gel puis digéré par *Eco*RI et *Hind*III, de même que le vecteur pUC18. Les produits des digestions ont été purifiés du gel d'agarose dans lequel ils ont migrés puis ont été ligués ensemble. La ligation inactivée a servie à transformer *E. coli* DH11S et les transformants ont été sélectionnés à l'aide d'ampicilline, d'IPTG et de X-Gal.

3.2.7 Expression de la lipase du clone F5-2 chez *E. coli*

Les colonies blanches et quelques bleues ont été repiquées sur une gélose contenant de la tributyrine. Afin de confirmer la présence du gène de la lipase au sein du vecteur, les plasmides de quelques colonies hydrolysant la tributyrine et de colonies bleues ont été extraits. Ils ont été digérés par *Eco*RI et *Hind*III et le patron de digestion analysé par électrophorèse en gel d'agarose (figure 20B). On y retrouve le vecteur pUC18 vers 2860 pbs pour tous les plasmides. Par contre, seuls les plasmides issus de colonies blanches possèdent un insert de 928 pbs, qui correspond au gène de la lipase. Cela confirme que le clonage a réussi et ces colonies ont servies d'inoculum à des cultures induites à l'IPTG toute la nuit. Un gel de polyacrylamide a été fait afin de vérifier l'expression de la lipase dans le milieu extracellulaire (figure 21). Une zone fluorescente est visible dans le zymogramme vers 31 kDa dans les puits des surnageants provenant des colonies avec le gène cloné et non pour celui contenant pUC18 seul (colonie bleue).

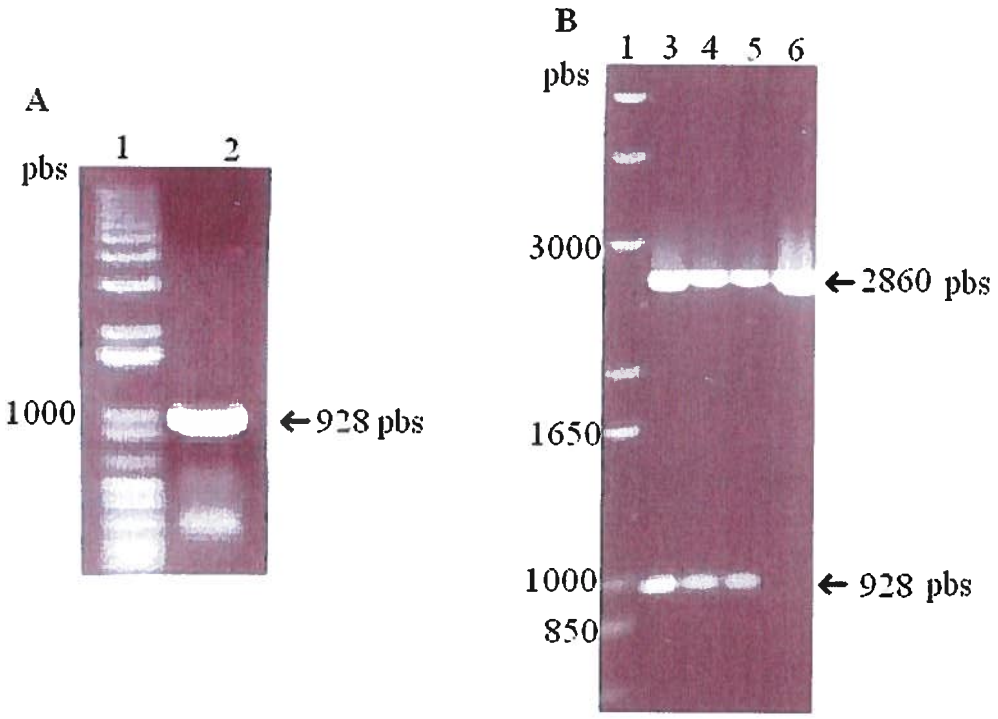


Figure 20 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose **A** du produit de PCR de la lipase IAF5.2 et **B** digestion de pUC18 par *Eco*RI et *Hind*III issu de colonies blanches et bleues suite au clonage de la lipase. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) produit de PCR de l'amplification de la lipase, (3 à 5) plasmides issus de colonies blanches hydrolysant la tributyrine et (6) plasmide isolé d'une colonie bleue.

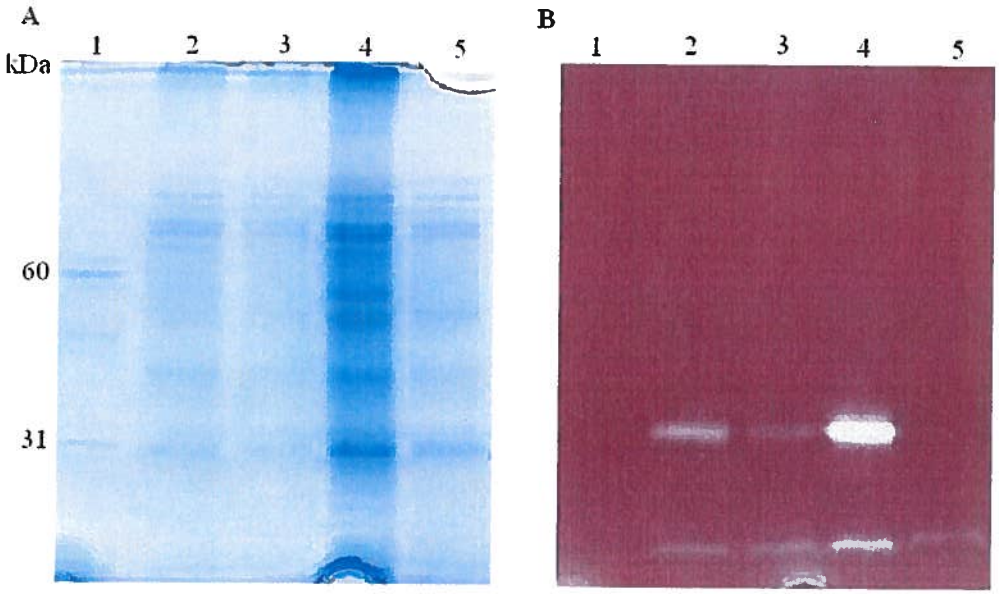


Figure 21 A SDS-PAGE et **B** zymogramme suite à l'induction avec 0.5 mM d'IPTG de la lipase IAF5.2 chez *E. coli* DH11S. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2-4) surnageant de cultures de colonies blanches contenant le gène de la lipase et (5) surnageant d'une culture d'une colonie bleue (référence).

3.2.8 Clonage du gène lipIAF5.2 chez *S. lividans* 10-164

Le gène de la lipase IAF5.2 a aussi été exprimé chez *S. lividans*. Le clonage a été effectué dans les vecteurs pIAFC109 et pIAFD95A en utilisant les sites de restriction *Sph*I et *Sac*I. Le site *Sph*I a été inclus dans l'amorce dessinée en 5' du gène de la lipase (Lip5'), tandis que le site *Sac*I est intégré dans l'amorce située en 3' du gène (Lip3'). Une autre paire d'amorces a été utilisée afin de muter le site *Sph*I qui se situe dans le gène pour ainsi pouvoir cloner le gène en entier dans les vecteurs. Le site a été muté en utilisant la technique d'élongation par chevauchements (figure 17) qui a nécessité trois amplifications par PCR. La température d'hybridation était de 50 °C pour les dix premiers cycles et de 55 °C pour les 15 cycles suivants. Les produits issus de ces amplifications ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 22). Le premier PCR a été fait avec l'amorce externe Lip3' et l'amorce interne mutSphFor, ce qui a généré un fragment de 241 pbs (figure 22A). La deuxième amplification a conduit à la mutation du brin complémentaire à l'aide de l'amorce externe Lip5' et de l'amorce interne mutSphRev, ce qui a produit un amplicon de 687 pbs (figure 22B). Ces deux fragments ainsi obtenus ont été découpés puis purifiés afin de servir de matrice au troisième PCR fait avec les amorces externes Lip5' et Lip3'. L'amplicon généré se situe entre 850 et 1000 pbs, soit à la hauteur attendue de 928 bps qui correspond à la longueur du gène de la lipase (figure 22C). Le produit de PCR final a été purifié : une partie a été envoyée séquencer avec les amorces externes à Génome Québec pour confirmer la mutation, et une autre partie a été digérée par *Sph*I et *Sac*I, de même que les vecteurs pIAFC109 et pIAFD95A. Les produits des digestions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, purifiés puis les vecteurs et les amplicons ligués ensemble. Le produit des ligations a été inactivé puis transformé dans les protoplastes de *S. lividans* 10-164. Les transformants ont été sélectionnés à l'aide de thiostrepton dont le gène de résistance est présent dans les deux vecteurs.

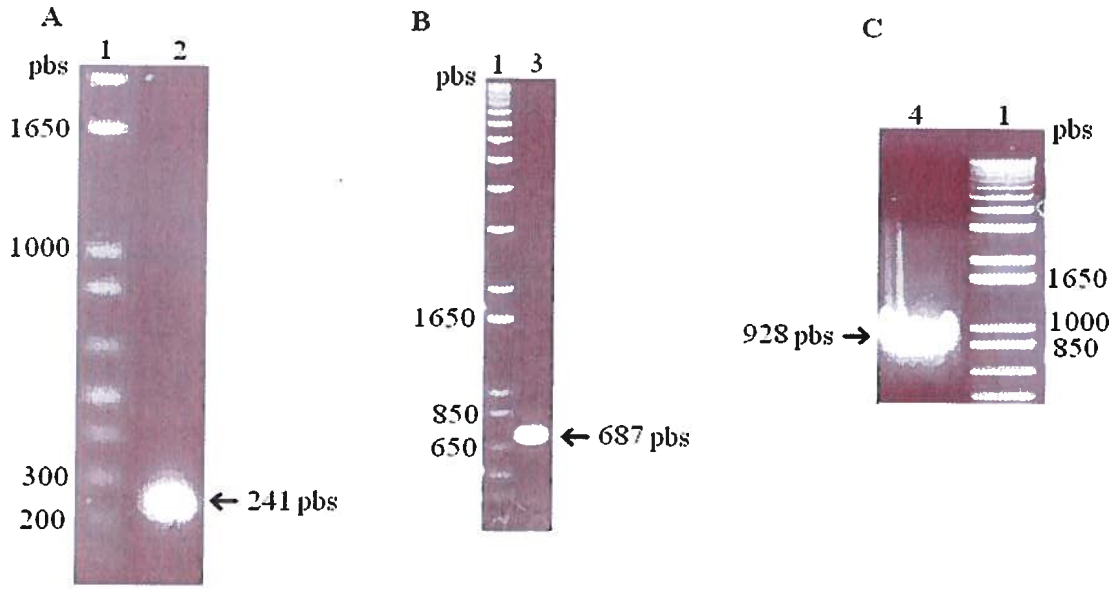


Figure 22 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR générés lors de la mutation du site interne *Sph*I de la lipase IAF5.2 pour le clonage dans pIAFC109 chez *S. lividans*. **A** Amplification à l'aide des amorces mutSphFor et Lip3', **B** amplification à l'aide des amorces Lip5' et mutSphRev et **C** reconstitution du gène entier via l'amplification des produits de A et B purifiés à l'aide des amorces Lip5' et Lip3'. (1) Marqueur de poids moléculaire et (2-4) produits de PCR.

3.2.9 Expression de la lipase du clone F5-2 chez *S. lividans*

Les transformants obtenus chez *S. lividans* avec le vecteur pIAFC109 et pIAFD95A ont été repiqués sur des géloses Bennett contenant de la tributyrine. Les deux transformants possédant la plus grosse zone d'hydrolyse pour chaque vecteur ont été mis en culture TSB en vue d'en extraire le plasmide. Ce dernier a ensuite été digéré par *Sph*I et *Sac*I puis le produit des digestions a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 23). Les vecteurs y mesurent 5296 pbs et l'insert, la lipase IAF5.2, 928 pbs. La réussite du clonage étant confirmée, l'expression extracellulaire de la lipase a été vérifiée. Le surnageant de cultures en M14 après 24, 48 et 72 heures a été traité à l'acétone puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure 24). On remarque que la lipase est présente dans le surnageant des cultures et son expression semble la plus marquée après 48 heures d'incubation avec le vecteur pIAFD95A (figure 24, puits 4; souche ci-après nommée LipIAF5.2-D95A).

3.2.10 Choix de l'hôte et du vecteur pour la purification de la lipase IAF5.2

Après avoir identifié, cloné puis exprimé la lipase IAF5.2, sa purification est l'étape suivante afin de pouvoir déterminer s'il s'agit véritablement d'une lipase. La production en grande quantité de la lipase s'est faite chez *S. lividans* considérant la présence de moins de protéines secondaires extracellulaires qu'avec *E. coli*. De plus, des expériences ultérieures ont démontré que la lipase est totalement sécrétée chez *S. lividans*, ce qui n'est pas le cas chez *E. coli*. Chez *S. lividans*, la lipase a été clonée avec succès dans deux vecteurs identiques sauf pour ce qui est du promoteur. Dans tous les essais perpétués dans le but d'optimiser la production de la lipase, la souche LipIAF5.2-D95A a toujours montré la meilleure production de cette enzyme (analyse qualitative des zymogrammes).

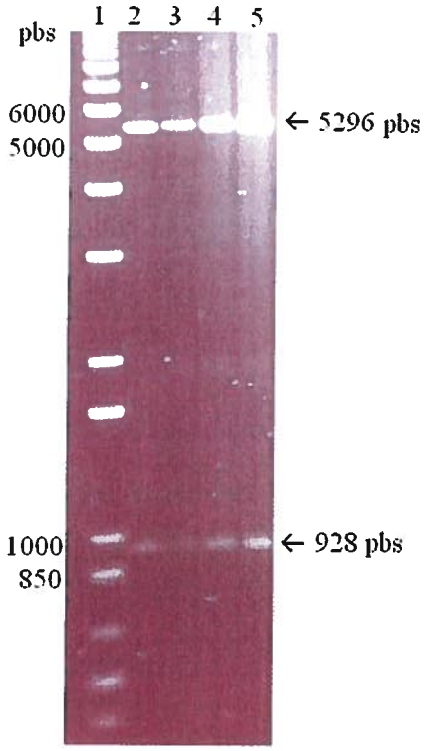


Figure 23 Vérification de la présence de la lipase IAF5.2 dans pIAFC109 et pIAFD95A par électrophorèse sur gel d'agarose suite à la digestion par *Sph*I et *Sac*I. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2-3) plasmides IAFC109 et (4-5) plasmides IAFD95A.

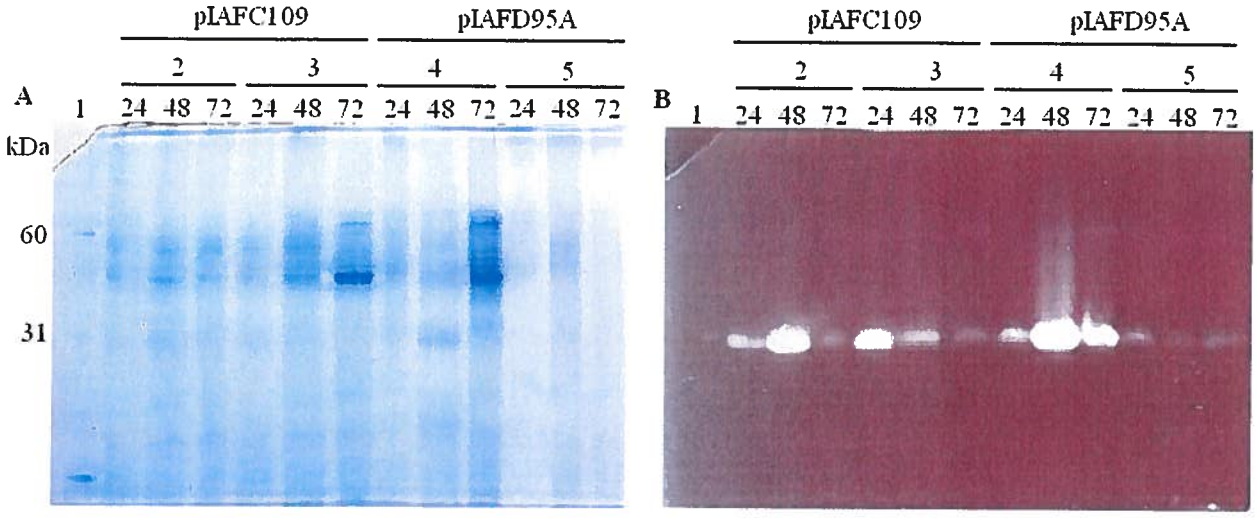


Figure 24 A SDS-PAGE et **B** zymogramme du surnageant de cultures en M14 après 24, 48 et 72 heures de la lipase IAF5.2 clonée dans pIAFC109 et pIAFD95A chez *S. lividans*. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2 et 3) lipase dans pIAFC109, (4 et 5) lipase dans pIAFD95A.

3.2.11 Purification de la lipase IAF5.2

Une production d'un litre de la souche LipIAF5.2-D95A en M14 a servi à purifier la lipase. Après l'équilibration du surnageant, les protéines contenues dans ce dernier ont été purifiées partiellement par chromatographie hydrophobe. Les fractions recueillies présentant de l'activité hydrolytique ont été soumises à un tamis moléculaire, ce qui a permis l'isolement de la lipase IAF5.2. Avant d'effectuer des tests enzymatiques, il est important de s'assurer que la lipase est pratiquement pure. Cet élément a été vérifié par électrophorèse sur gel d'acrylamide où environ 900 ng de la fraction après le tamis moléculaire ont été migrés dans le gel (figure 25). Cette fois-ci, un des échantillons de la lipase a été totalement dénaturé (traitement au DTT et à l'iodoacétamide) afin d'évaluer précisément la masse moléculaire de la protéine (figure 25, puits 3). On remarque que l'échantillon non bouilli (figure 25, puits 1) présente une protéine dominante à un poids moléculaire supérieur à 31 kDa ainsi qu'une protéine résiduelle à cette hauteur. Ces protéines présentent une activité marquée au zymogramme ainsi que la protéine de la fraction bouillie dix minutes (figure 25, puits 2), donc partiellement dénaturée. Finalement, la fraction totalement dénaturée démontre une réaction quasi absente au substrat du zymogramme ainsi qu'un poids moléculaire de 31 kDa.

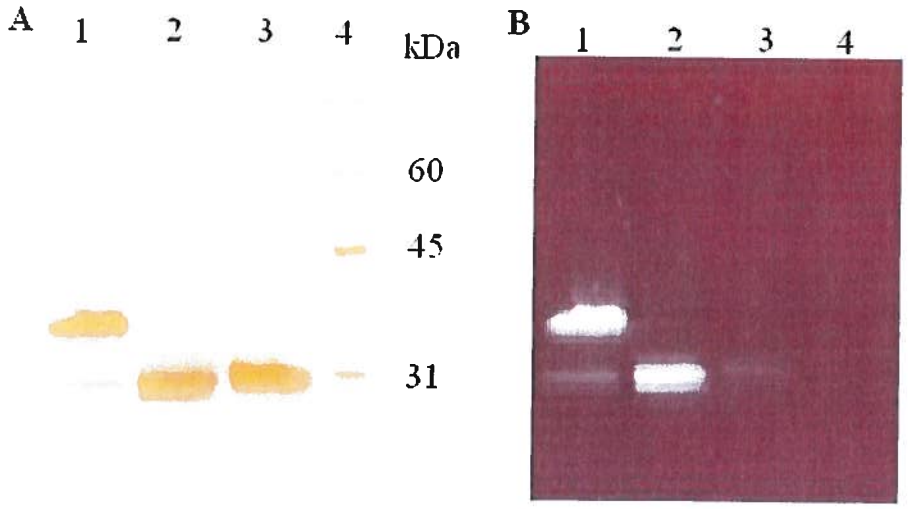


Figure 25 A SDS-PAGE et **B** zymogramme de la lipase IAF5.2 après le tamis moléculaire. (1) Fraction non bouillie, (2) fraction bouillie 10 minutes, (3) fraction bouillie 10 minutes et dénaturée avec du DTT et de l'iodoacétamide et (4) marqueur de poids moléculaire.

3.2.12 Détermination du substrat, du pH et de la température optimaux de LipIAF5.2

Le premier test enzymatique effectué afin de caractériser l'enzyme a été celui de la détermination du substrat optimal. Le tampon choisi pour tester les substrats était le Tris-HCl 50 mM à pH 9 supplémenté de 0,05 % de $CaCl_2$, et la température de 50 °C. La quantité d'enzyme a été déterminée afin que la réaction soit linéaire, ce qui correspond à 75 ng par réaction. La spécificité de l'enzyme (figure 26) se situe envers les substrats à longues chaînes (C14, C16 et C18), avec une préférence marquée envers le *p*-nitrophényl myristate (C14, p-NPM).

Le pH optimal de l'enzyme a été déterminé avec ce substrat et à la même température. Tous les tampons présentaient une molarité de 50 mM et un supplément de 0,05 % de $CaCl_2$. L'activité relative de la lipase est supérieure à 50 % entre les pH 9 et 11, présentant un maxima à un pH de 10,5 avec le tampon NaOH-glycine (figure 27).

La température optimale a été déterminée avec le tampon optimal (NaOH-glycine 50 mM + 0,05 % $CaCl_2$) et avec le substrat C14. On remarque que l'enzyme démontre une activité élevée à de hautes températures (plus de 50 % d'activité entre 50 et 70 °C), avec une température optimale de 60 °C (figure 28).

Une fois déterminés le substrat, le pH et la température optimaux dans les conditions précisées, la spécificité de l'enzyme envers les substrats a été revérifiée avec le nouveau tampon et à la nouvelle température. Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes, soit une spécificité envers les longues chaînes d'acide gras et une préférence pour le *p*-nitrophényl myristate. Le pH a aussi été validé dans les nouvelles conditions et l'activité demeure maximale à 10,5. Le calcul d'une unité internationale (UI) est défini comme la quantité d'enzyme nécessaire afin de libérer une µmol de *p*-nitrophénol par minute. Ce calcul a été effectué pour la lipase en utilisant le *p*-nitrophényl myristate comme substrat, dans les conditions réactionnelles optimales avec ce substrat (tampon NaOH-glycine 50 mM + 0,05 % $CaCl_2$ et température de 60 °C) et correspond à 160 U/mg.

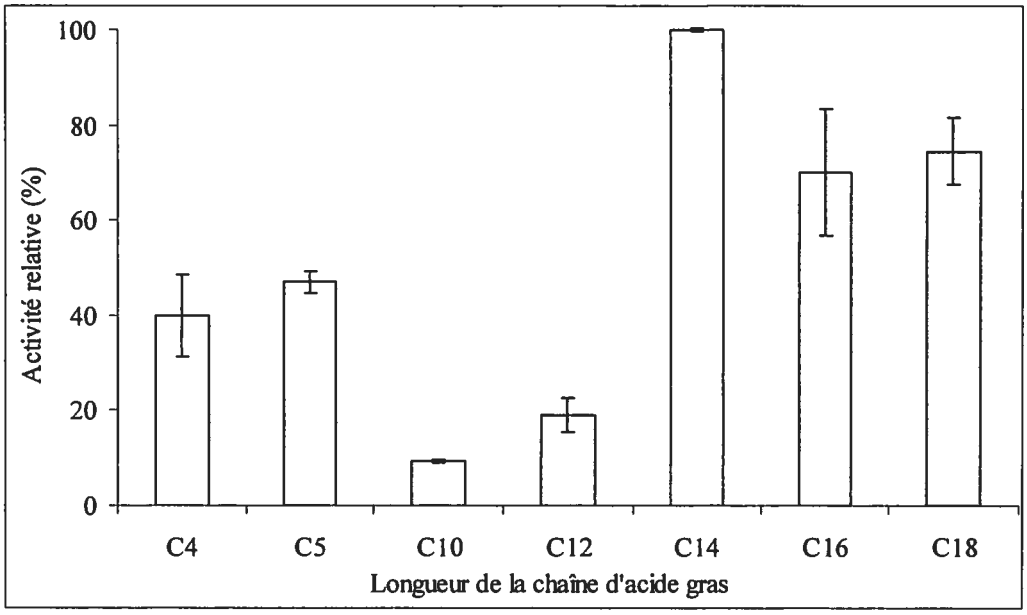


Figure 26 Activité relative de la lipase IAF5.2 envers différents substrats dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 9 + 0,05 % de $CaCl_2$ et à une température de 50 °C. (C4) *p*-nitrophényl butyrate, (C5) *p*-nitrophényl valérate, (C10) *p*-nitrophényl caprate, (C12) *p*-nitrophényl laurate, (C14) *p*-nitrophényl myristate, (C16) *p*-nitrophényl palmitate et (C18) *p*-nitrophényl stéarate.

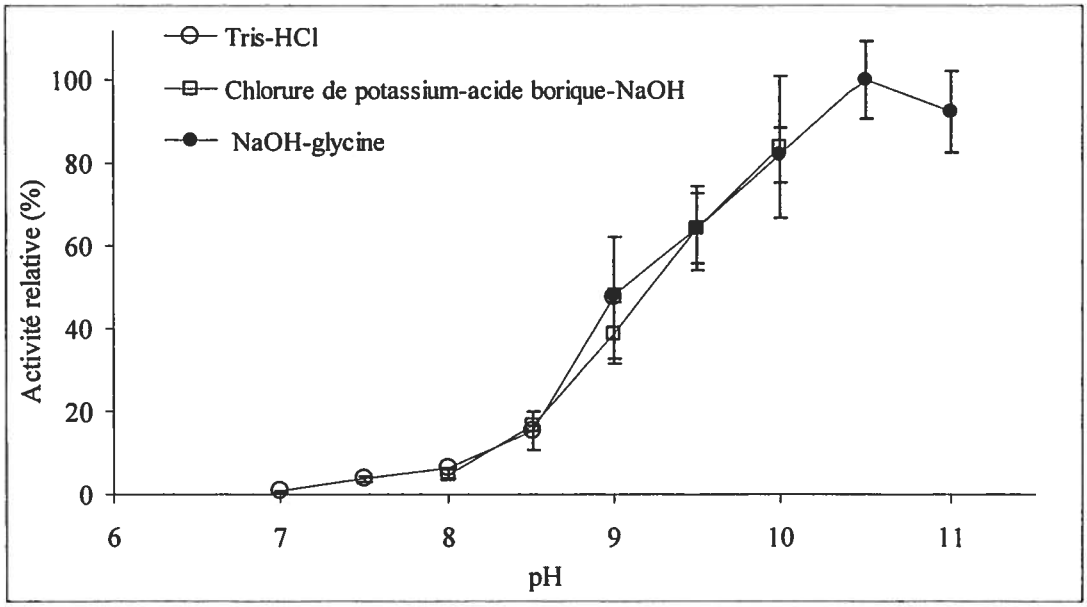


Figure 27 Activité relative de la lipase IAF5.2 à différents pH dans des tampons 50 mM contenant 0,05 % de $CaCl_2$, à une température de 50 °C avec le *p*-nitrophényl myristate comme substrat. (pH 7-9) Tampon Tris-HCl, (pH 8-10) tampon KCl-H_3BO_3-NaOH et (9-11) tampon NaOH-glycine.

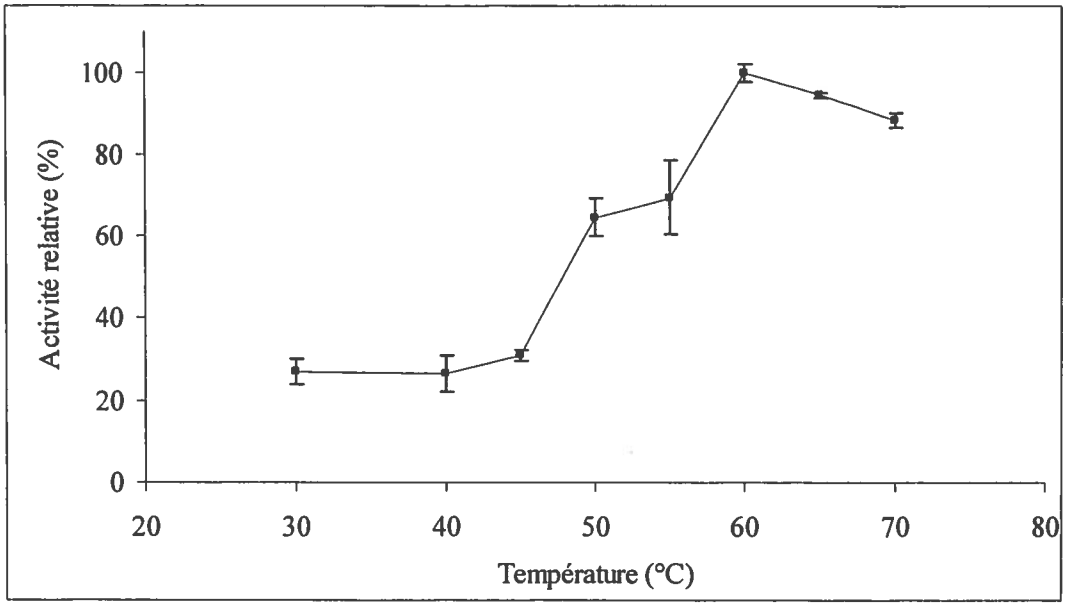


Figure 28 Activité relative de la lipase IAF5.2 à différentes températures (°C) dans le tampon NaOH-glycine 50 mM à pH 10.5 + 0,05 % $CaCl_2$ et le substrat *p*-nitrophényl myristate.

3.12.13 Détermination de la thermostabilité de LipIAF5.2

La thermostabilité de l'enzyme a été vérifiée en incubant l'enzyme jusqu'à quatre heures à 90 °C. Avant de débuter l'incubation, des réactions enzymatiques ont été faites afin d'établir l'activité initiale (témoin début). L'enzyme a ensuite été incubée dans l'eau à 90 °C puis à chaque heure un aliquot a été prélevé, mis sur glace et testé dans les conditions optimales. Après quatre heures, l'activité semblait encore forte alors l'incubation a été arrêtée. Le témoin qui a été incubé sur la glace pour la même durée a été testé aussi (témoin fin). Globalement, l'enzyme après quatre heures d'incubation à 90 °C (4 heures) et sur la glace (témoin fin) présente une hydrolyse du substrat comparable (figure 29).

3.2.14 Effets de différents agents sur l'activité de la lipase IAF5.2

Afin d'évaluer la résistance et la stabilité de la lipase, cette dernière a été mise en présence de plusieurs composés différents. Après une heure d'incubation à 37 °C avec des ions métalliques, des agents oxydants, des détergents, des alcools et des solvants, l'activité résiduelle de la lipase dans les conditions optimales a été analysée.

Le tableau 3 souligne l'augmentation de la stabilité de l'enzyme en présence de calcium et de manganèse (10 mM) de l'ordre de 115 et de 134 % respectivement. Le magnésium et le PMSF tant qu'à eux affectent très peu la lipase. Le zinc, le cobalt, les Tweens 20 et 80 ont surtout un effet marqué à une concentration de 10 mM ou de 10 %. Le potassium, le sulfate d'ammonium ainsi que l'EDTA diminuent la stabilité de l'enzyme de façon partielle (entre 28 et 66 % de diminution) pour 1 et 10 mM, tandis que l'enzyme est totalement inhibée lorsque pré-incubée en présence d'EGTA, de Triton X-100 et de Tween 80. Les solvants et les alcools démontrent un tout autre effet lorsque pré-incubés avec l'enzyme. Abstraction faite du glycérol, du méthanol et du 1-hexanol qui semblent diminuer la stabilité de l'enzyme, tous les autres substances en ont augmenté considérablement l'activité, jusqu'à 517 % pour l'éthanol par exemple.

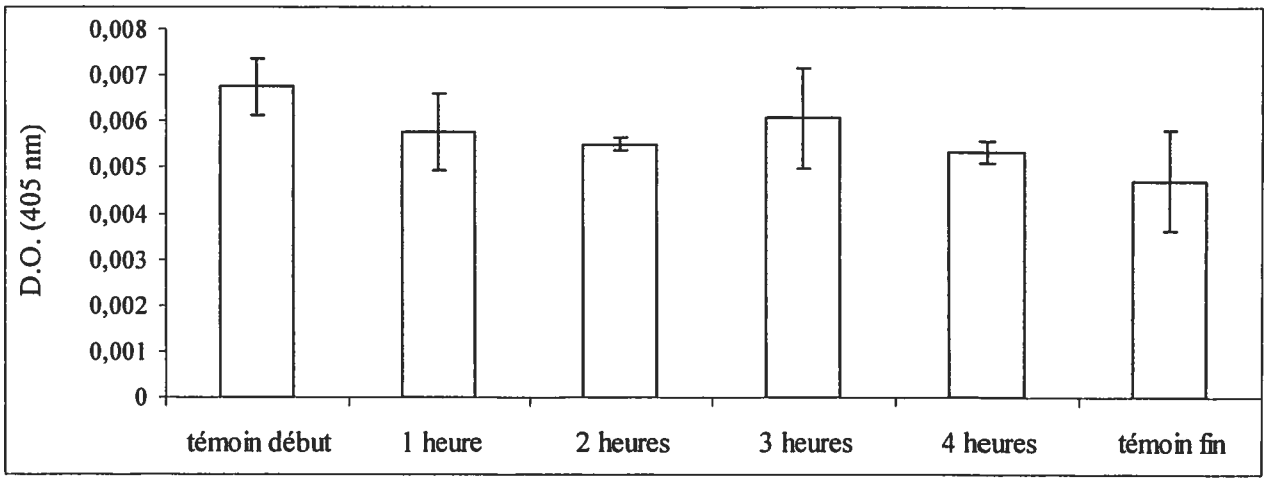


Figure 29 Absorbance à 405 nm du *p*-nitrophénol suite à sa libération par la lipase après avoir été incubée une, deux, trois et quatre heures à 90 °C. (témoin début) Test de l'enzyme effectué avant de débuter l'incubation, (1, 2, 3 et 4 heures) tests de l'enzyme après ces temps d'incubation et (témoin fin) test de l'enzyme incubée 4 heures sur la glace.

Table 3 Activité relative de l'enzyme après une pré-incubation d'une heure à 37 °C en présence de divers composés. L'activité résiduelle se compare à celle d'un témoin incubé dans les mêmes conditions mais sans le composé. Les ions métalliques, l'agent oxydant, les chélateurs et l'inhibiteur de la sérine ont été utilisés en concentration de 1 et 10 mM. Les détergents ont été utilisés en concentration de 1 et 10 % et les solvants et alcools en concentration de 30 %.

Ions métalliques et inhibiteurs	Activité résiduelle (%)		Solvant ou alcool	Activité résiduelle (%)
	1 mM (1 %)	10 mM (10 %)		
$CaCl_2$	99 ± 5	115 ± 2	Acétone	464 ± 30
$MgCl_2$	103 ± 1	105 ± 1	Acétonitrile	363 ± 38
$MnCl_2$	100 ± 1	134 ± 3	DMF	142 ± 24
$ZnCl_2$	99	51 ± 6	DMSO	196 ± 12
$CoCl_2$	102 ± 4	62 ± 4	Hexane	207 ± 9
KCl	44 ± 8	34	Éthanol	517 ± 44
$(NH_4)_2SO_4$	70 ± 14	72 ± 1	Glycérol	83 ± 22
EDTA	72 ± 3	62 ± 2	alcool isopentylique	140 ± 20
EGTA	0	0	Méthanol	85 ± 12
PMSF	93 ± 4	99 ± 3	1-butanol	240 ± 8
Triton X-100	0	0	2-butanol	315 ± 23
Tween 20	101	52 ± 2	1-hexanol	34 ± 13
Tween 80	76 ± 6	0	1-propanol	281 ± 12
SDS	0	0	2-propanol	481 ± 14

4. DISCUSSION

4.1 Criblage fonctionnel de la banque métagénomique

Dans le but d'identifier de nouvelles enzymes lipolytiques, une banque métagénomique provenant d'un bioréacteur enrichi a été criblée. Le criblage, effectué à l'aide de milieux solides contenant de la tributyrine, a révélé dix clones hydrolysant ce substrat sur un total d'environ 10 000 criblés, ce qui correspond à une fréquence de 0,1 %. Cette fréquence est nettement plus élevée que celle obtenue lors d'un criblage d'une banque métagénomique provenant d'un milieu non enrichi, qui est de l'ordre de 0,01 %, soit dix fois moins (Cowan *et al.*, 2005). Le criblage fonctionnel a été choisi au profit du criblage par homologie de séquences car l'objectif global de l'étude était l'identification de nouvelles enzymes puis leur expression afin de pouvoir évaluer leurs propriétés physico-chimiques. Il était donc intéressant d'identifier des enzymes pouvant être exprimée naturellement de façon hétérologue afin de minimiser les manipulations génétiques permettant leur expression.

Parmi les clones positifs, deux clones hydrolytiques ont été retenus afin d'isoler l'enzyme responsable de cette activité. La méthodologie employée visait à réduire l'insert provenant de la banque métagénomique à l'aide d'endonucléases de restriction à une taille permettant son séquençage. L'utilisation d'enzymes de restriction à cette fin ne représente pas une façon qui serait efficace à grande échelle. Initialement, l'utilisation d'un transposon inclus dans le vecteur pIAFS2 était prévue. À partir d'un clone positif, il s'agissait de favoriser la transposition de l'élément transposable jusqu'à l'obtention d'un phénotype négatif, qui indiquerait la présence du transposon dans le gène lipolytique. Ensuite, le cosmide de la colonie présentant un phénotype négatif devait être séquencé en utilisant les amorces se liant de façon divergente aux extrémités du transposon, permettant ainsi d'avoir la séquence du gène interrompu. Or, les colonies obtenues après la transposition étaient minuscules même après plusieurs jours, ce qui rendait difficile l'observation d'une zone d'hydrolyse autour. De plus, une très grande quantité ne présentait pas de zone, qui n'était pas nécessairement des colonies dont le transposon avait inactivé le gène lipolytique. En regard de ces difficultés, l'emploi d'enzymes de restriction a été retenue comme technique car la méthodologie est simple et peu coûteuse. Il est toutefois évident que cette méthode ne peut s'employer à grande échelle étant donnée la quantité de manipulations nécessaires ainsi que la difficulté de reconstitution des fragments séquencés.

4.2 Le clone F5-15

4.2.1 Identification du gène lipolytique du clone F5-15

L'utilisation de l'endonucléase de restriction *Sph*I a permis de réduire la taille de l'insert qui était de 40 kbs initialement en deux fragments d'ADN de 12 000 et 5 000 pbs chaque. Le séquençage préliminaire d'une partie de ces fragments a permis de révéler une carboxylestérase. Le séquençage ultérieur du cosmide du clone F5-15 a révélé les gènes avoisinant la carboxylestérase. Les gènes s'apparentent à six microorganismes différents, dont quatre Gram négatifs et deux Gram positifs, ce qui ne permet pas de conclure de quel microorganisme provient cet insert. Aussi, parmi ces gènes, certains sont apparentés à des organismes ne présentant pas le profil choisi lors de l'enrichissement du bioréacteur. Par exemple, le gène codant pour la protéine Bpro et celui pour le régulateur de la transcription de la famille TetR sont tous les deux affiliés aux gènes homologues de *Polaromonas* sp., un genre bactérien psychrophile. Or, l'objectif était l'obtention d'enzymes thermostables donc issues d'organismes probablement thermophiles, alors que le profil des bactéries apparentés aux gènes identifiés présente une température de croissance située entre 25 et 37 °C (Drobniewski, 1993; Ferreira *et al.*, 1997; Rhie et Shimkets, 1991). Toutefois, le gène de la carboxylestérase en tant que tel est associé à celui de *Deinococcus geothermalis*, soit une bactérie isolée d'une source thermale présentant une température de croissance entre 45 et 50 °C (Ferreira *et al.*, 1997). Cette affiliation peut faire du sens en regardant le contenu en G + C du gène qui est de 67,2 %. Une teneur élevée de ces deux bases est souvent observée au sein du l'ADN d'organisme thermotolérants. Ces organismes ont une plus grande résistance à la chaleur ce qui sous-entend une certaine thermostabilité de ses protéines, mais la corrélation entre le contenu en G + C de l'ADN et la thermostabilité des protéines n'est malheureusement pas inéluctable (Vinogradov, 2003).

Présentant une faible homologie de 40 % avec celui de *D. geothermalis*, le gène de la carboxylestérase identifié au sein du clone F5-15 pourrait ne pas véritablement coder pour ce type de protéine. Cependant, plusieurs indices au niveau de la séquence du gène laissent croire qu'il s'agit réellement d'une estérase. Tout d'abord, les estérases sont divisées en trois groupes : les cutinases, les estérases et les acétylcholine estérases (Fojan *et al.*, 2000). Les enzymes des deux derniers groupes font parties de la famille des α/β hydrolases, tout comme la carboxylestérase du clone F5-15. L'appartenance à cette famille est confirmée par la présence d'une séquence de type G-X-S-X-G où la sérine fait partie de la triade catalytique composée d'un résidu nucléophile (la sérine), d'un résidu acide et d'une histidine (Ollis *et al.*, 1992). Souvent, le motif typique des

estérases est G-E-S-A-G, soit le même que celui de la carboxylestérase du clone F5-15, mais il n'est pas unique à ce type d'enzymes (Fojan *et al.*, 2000). Par contre, chez les estérases uniquement, ce motif est situé au sein d'une grande séquence consensus : F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G (Cygler *et al.*, 1993). Cette séquence est retrouvée au sein du gène lipolytique du clone F5-15, soit F-G-G-D-P-N-N-V-T-I-F-G-E-S-A-G-G. Toutes ces observations permettent de conclure que le gène identifié comme étant une carboxylestérase présente toutes les caractéristiques associées à ce type d'enzyme.

4.2.2 Expression protéique de la carboxylestérase IAF5.15

L'expression extracellulaire de la carboxylestérase du clone F5-15 a été vérifiée chez *E. coli* suite à la conclusion par le serveur SignalP 3.0 quant à l'absence d'un peptide signal dans la traduction du gène. Ce résultat a été confirmé par un zymogramme suite à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des protéines intra et extra cellulaires du clone. Le zymogramme a révélé une protéine vers 60 kDa pour ce qui est du contenu intracellulaire. Une protéine en quantité négligeable en ce qui a trait au contenu extracellulaire a aussi été observée; le protocole utilisant le MUF-butyrate étant réputé pour être extrêmement sensible à toute activité lipolytique (Gupta *et al.*, 2003). Globalement, la carboxylestérase du clone F5-15 n'est pas sécrétée dans le milieu environnant. Comme la masse moléculaire théorique de la carboxylestérase est calculée à 58 kDa et qu'aucune protéine de la culture témoin n'a réagit au zymogramme, la protéine révélée au niveau du clone à une hauteur de 60 kDa peut être associée à la carboxylestérase IAF5.15. L'impossibilité de retrouver cette protéine précisément après la coloration au bleu de Coomassie démontre que la protéine est exprimée en de faibles quantités.

4.3 Isolement du gène lipolytique du clone F5-2

4.3.1 Identification du gène lipolytique du clone F5-2

L'enzyme lipolytique du clone F5-2 a elle aussi été isolée à l'aide de l'endonucléase de restriction *Sph*I. La digestion du cosmide de ce clone par cette enzyme présentait sept fragments d'ADN, ce qui donnait beaucoup de possibilités afin d'éliminer plusieurs de ces fragments tout en conservant l'activité lipolytique. L'enzyme *Pst*I présentait sensiblement le même patron de restriction, mais cette dernière se trouvait à couper au sein du cosmide pIAFS2 également. Suite à la digestion du cosmide du clone F5-2 par *Sph*I et à sa ligation sur lui-même, le nouveau patron de

digestion des colonies hydrolysant toujours la tributyrine présentait trois fragments d'ADN au lieu de sept. Les colonies résultant du clonage individuel des fragments de 1400 et 2800 pbs ne démontraient pas de phénotype positif. De plus, un des cosmides digéré par *Sph*I et ligué sur lui-même présentait seulement le fragment de 1400 pbs et n'hydrolysait pas la tributyrine. Ces observations pouvaient indiquer la présence d'un site de restriction *Sph*I à l'intérieur même du gène codant pour l'activité lipolytique. Le séquençage de ces fragments a permis de confirmer cette hypothèse en découvrant un site *Sph*I au sein d'un gène associé à une lipase.

Tout comme pour le clone F5-15, les gènes entourant celui de la lipase et ce dernier sont affiliés à des microorganismes différents, ce qui ne permet pas de conclure quant à l'origine du fragment issu du clone F5-2. Toutefois, la découverte de sept (clone F5-15) et de quatre (clone F5-2) nouveaux gènes permet d'affirmer qu'une étude métagénomique mène effectivement à l'identification de gènes nouveaux (Handelsman, 2004; Langer *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2002; Schloss et Handelsman, 2003; Schmeisser *et al.*, 2007; Steele et Streit, 2005).

Le gène *lipIAF5.2* montre 49 % d'homologie avec celui de la triacylglycérol de *Thermobifida fusca* YX, un microorganisme thermophile modéré. Le gène présente aussi le motif consensus des enzymes de la famille des α/β hydrolases, G-X-S-X-G (Ollis *et al.*, 1992). Dans le cas de la lipase IAF5.2, le motif est G-W-S-M-G, où le tryptophane (W) est un acide aminé hydrophobe avec un fort encombrement stérique et la méthionine (M), un acide aminé soufré non polaire. Les glycines (G) encadrent généralement ce motif car étant un acide aminé très petit, elles ne nuisent pas à la liaison avec le substrat (Ollis *et al.*, 1992). Chez les lipases, ce motif est inclus dans la séquence consensus [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-X-G-[GSTAC] (Chapus *et al.*, 1988). Or, cette séquence d'acides aminés n'est pas retrouvée intégralement au sein de la lipase du clone F5-2; il y a une différence d'un acide aminé (en gras): L-A-**A**-V-<u>G-W-S-M-G</u>-G. Il est donc impossible de conclure à partir de cette séquence que la traduction du gène *lipIAF5.2* correspond à celui d'une lipase. Finalement, la proline est le cinquième résidu le plus abondant dans la lipase. Le cycle contenu dans cet acide aminé aurait un rôle à jouer en abaissant l'entropie de la dénaturation de la protéine ce qui en augmenterait la stabilité (Svendsen, 2000). La fréquence élevée de ce résidu représente donc un atout pour la thermostabilité d'une protéine.

L'alignement de séquences réalisé entre les traductions du gène de la lipase du clone F5-2 et ses trois plus proches homologues met en évidence plusieurs résidus pouvant être impliqués dans la réaction catalytique. En plus de la sérine identifiée au sein du motif consensus, il y a la méthionine (résidu 178) qui serait un des deux résidus faisant partie de l'anneau oxanion. En

effet, à l'intérieur du motif G-X_1-S-X_2-G, le résidu X_2 est identifié comme étant un des deux acides aminés faisant partie de l'anneau oxanion (Pleiss *et al.*, 2000). Le second résidu est souvent situé entre le feuillet β3 et l'hélice αA (Nardini et Dijkstra, 1999). Chez plusieurs lipases, il est situé entre 70 et 100 acides aminés avant la sérine catalytique (Kwoun Kim *et al.*, 2004). Malgré cela, ces informations sont insuffisantes afin de déterminer où serait situé le second résidu. De plus, l'alignement des séquences a été fait avec les protéines les plus homologues dont les résidus de l'anneau oxanion n'ont pas été déterminés, ce qui nous est d'aucune utilité afin de déterminer celui de la lipase IAF5.2. Par contre, cet alignement indique un acide aspartique (D, résidu 223) ainsi que deux histidines (H, résidus 229 et 253) les plus probablement impliqués dans la triade catalytique.

4.3.2 Mutations des résidus histidines 229 et 253 de la lipase IAF5.2

Deux gènes mutants de la lipase ont été créés afin de déterminer si les histidines 229 et 253 étaient impliquées dans la triade catalytique. Lors de la transformation des vecteurs contenant ces gènes, les transformants obtenus pour le mutant H229A présentaient une zone d'hydrolyse autour des colonies, tandis que ceux issus de la mutation H253A ne présentaient pas de zone. De plus, un zymogramme pratiqué avec le surnageant de cultures contenant le gène muté a confirmé l'absence d'activité de la part du mutant H253A. De ces résultats, il est possible de conclure que la mutation H253A empêche la lipase d'avoir son activité hydrolytique. Cependant, l'absence d'activité peut être due à l'absence de l'histidine 253 qui serait essentielle à l'activité hydrolytique, mais la mutation n'a peut être aussi qu'engendré un changement dans le repliement de la protéine, ce qui nuirait au bon fonctionnement de l'enzyme. De façon générale, la conclusion la plus véridique est que l'histidine 253 joue un rôle important au niveau de l'activité catalytique, directement ou indirectement.

De cette conclusion peut être déduit l'appartenance de l'acide aspartique (résidu 223) comme faisant parti de la triade catalytique. En effet, même si l'homologie entre les enzymes de la classe des α/β hydrolases est très faible, les résidus impliqués dans la triade catalytique sont toujours placés dans l'ordre suivant au niveau de la structure primaire : nucléophile, acide et histidine (Ollis et al., 1992). En regardant l'alignement des séquences en acides aminés entre le gène *lipIAF5.2* et ses trois homologues, l'acide aspartique 223 est le seul résidu acide conservé situé après la sérine active. De plus, en tenant compte que les histidines 229 et 253 feraient parties

de la triade catalytique de l'enzyme, le résidu 223 demeure le plus probable désigné comme étant l'acide.

Lors de l'analyse protéique sur SDS-PAGE, outre l'absence d'activité pour le mutant H253A, il est possible de constater que le profil de l'activité au zymogramme du mutant H229A est différent de celui de la lipase non mutée. Trois protéines sont révélées au zymogramme autres que celle correspondant à la lipase non mutée. La zone de fluorescence la plus marquée est associée à la protéine située près 60 kDa (la plus haute) qui pourrait correspondre à un homodimère de la lipase. Sous certaines conditions de pH, il arrive que les protéines se dimérisent, comme c'est le cas de la ribonucléase A (Park et Raines, 2000). Aussi, suite à des mutations, il est possible qu'une protéine originalement monomère puisse s'associer à des peptides afin de former un dimère (Bennett *et al.*, 1995). Les peptides peuvent être simplement des hélices α ou des feuillets β, des domaines entiers ou des protéines entières. Cela pourrait expliquer pourquoi deux autres protéines sont révélées entre celle de 31 kDa et celle de 60 kDa, qui seraient en fait une association entre la protéine mutée et un peptide. Par contre, ces associations ne doivent pas nuire à l'activité de l'enzyme sinon elle ne serait plus détectable, de même qu'il est rare mais pas impossible qu'une mutation ponctuelle produise cet effet. Bref, la mutation de l'histidine 229 n'inactive pas l'enzyme mais sa forme protéique en est altérée.

4.3.3 Expression protéique de la lipase IAF5.2 chez *E. coli* et *S. lividans*

La banque métagénomique de laquelle la lipase du clone F5-2 est issue a été transduite chez *E. coli* initialement. Une fois le gène de la lipase isolé et identifié, il a été cloné individuellement dans le vecteur inductible pUC18 chez cet hôte ainsi que chez *S. lividans* à l'aide de deux vecteurs inductibles. Cette opération avait pour but d'éliminer les gènes potentiellement toxiques qui pouvaient se trouver au sein du clone F5-2 ainsi qu'afin de s'assurer que l'activité détectée sur la tributyrine était véritablement associée au gène *lipIAF5.2*. L'expression du gène seul de la lipase chez *E. coli* et chez *S. lividans* a démontré que cette enzyme ne nécessitait pas la présence d'une protéine chaperonne, ou du moins de sa propre chaperonne afin d'être repliée convenablement. Considérant les différences non négligeables entre ces deux hôtes, il est plus probable qu'afin d'être active, la lipase ne nécessite tout simplement pas de chaperonne. Plusieurs lipases provenant de microorganismes Gram positif possèdent un peptide signal, probablement comme celui identifié par SignalP 3.0 chez la lipase du clone F5-2 (Jaeger *et al.*, 1999). Lors de la traduction protéique, le produit résultant est une pré-

enzyme dont le peptide signal joue un rôle protecteur contre la protéolyse ainsi qu'il facilite la translocation de la protéine mature hors de la cellule (Jaeger *et al.*, 1999).

La production protéique de la lipase IAF5.2 chez *E. coli* est détectable grâce à la technique du zymogramme. Cette apparente sécrétion est intéressante car normalement, la membrane externe de *E. coli* est imperméable aux protéines (Rinas et Hoffmann, 2004). Par contre, étant donné la très grande quantité des autres protéines visibles sur le gel, il est plus probable que la présence de la lipase soit due à la lyse cellulaire considérant que les fractions ont été recueillies après une nuit de culture. Il est possible d'attribuer la zone de fluorescence visible vers 31 kDa à la présence de la lipase au sein du vecteur pUC18 car un témoin ayant le vecteur seul ne présente aucune zone de fluorescence. Cependant, la coloration au bleu de Coomassie ne met pas en évidence une protéine dominante à la hauteur attendue de la lipase. De plus, d'autres expériences ont révélé une présence intracellulaire de la lipase, ce qui signifie que pour purifier une grande quantité de cette enzyme, il faudrait prendre les contenus intra et extra cellulaires. Cependant, la séparation des constituants cellulaires puis de la lipase des protéines propres à l'hôte s'avère un processus plus ardu, d'où l'utilisation d'un autre hôte sécrétant totalement la protéine.

Le clonage de la lipase chez *S. lividans* a nécessité la mutation du site interne *Sph*I afin de pouvoir utiliser ce site de restriction lors de l'insertion du gène dans les vecteurs utilisés. La culture de cet hôte est plus fastidieuse que celle de *E. coli* car la croissance de cet Actinomycète est beaucoup plus lente. Le gène de la lipase a été cloné simultanément dans deux vecteurs puis transformés chez cet hôte. Des analyses protéiques ont démontré que la lipase est retrouvée uniquement dans le surnageant des cultures. Les zymogrammes pratiqués ont révélé une protéine qui semble en plus grande quantité pour ce qui est de la production extracellulaire avec la colonie 8, dont le vecteur est pIAFD95A. Le maximum de la production est visible après 48 heures, ce qui est intéressant car l'activité protéolytique extracellulaire de *S. lividans* augmenterait pendant la phase stationnaire (Binnie *et al.*, 1997; Isiegas *et al.*, 1999). De cette façon, après 48 heures il y aurait peu de protéases dans le surnageant car la phase stationnaire serait plutôt après 72 heures. Considérant que les protéines n'ont pas été dosées avant d'être chargées sur le gel, la sélection de la colonie 8 pour la purification s'avère totalement qualitative.

4.3.4 Choix de l'hôte et purification de LipIAF5.2

Bien qu'autant *E. coli* que *S. lividans* aient exprimé la lipase IAF5.2, le choix de *S. lividans* comme hôte pour la purification a été déterminé par plusieurs facteurs. Il est évident que la décision n'a pas été prise en fonction du temps requis pour l'expression protéique car produire un litre de *E. coli* demande tout au plus 48 heures tandis qu'un litre de *S. lividans* exige sept jours. Dans un cas comme dans l'autre, malgré une induction, il y avait beaucoup de protéines extracellulaires, ce qui souligne l'inefficacité des systèmes d'expression avec ce gène inconnu. Par contre, *E. coli* présentait autant de lipase au niveau intracellulaire qu'extracellulaire, ce qui est non souhaitable car la séparation des constituants cellulaires ainsi que des enzymes demande plus d'étapes. Puis, à chaque étape supplémentaire de purification, une fraction de l'enzyme est perdue ce qui réduit le total d'enzyme pure obtenue à la fin des manipulations. L'hôte *S. lividans* tant qu'à lui sécrétait totalement la lipase IAF5.2. Aussi, le surnageant de *E. coli* présentait une autre protéine réagissant au substrat du zymogramme autant chez les clones exprimant la lipase que chez les témoins sans lipase. Cette protéine indésirable (probablement une estérase propre à cet hôte) aurait nuit aux étapes de purification subséquentes. Par contre, malgré la perte intracellulaire chez *E. coli*, il est difficile de comparer l'expression extracellulaire de la lipase chez ces deux hôtes. Le dosage des protéines du surnageant aurait pu être utile afin de quantifier cette différence mais comme la lipase est tellement peu exprimée, le résultat aurait privilégié l'hôte exprimant le plus de protéines et non celui exprimant le plus la lipase. De plus, des expériences utilisant le surnageant brut avec des *p*-nitrophényl esters ont mis en évidence une activité lipolytique provenant des estérases intrinsèques à *E. coli*, qui rend la quantification de l'activité propre à la lipase IAF5.2 quasiment indétectable. Globalement, le choix de *S. lividans* comme hôte de production s'est fait en dépit du temps de croissance considérable mais plutôt au profit de l'expression totalement extracellulaire de l'enzyme à purifier.

À partir du litre de surnageant de *S. lividans* ayant produit la lipase IAF5.2, la concentration des protéines par précipitation a d'abord été tentée à l'aide de sulfate d'ammonium. Or, après 24 heures et un pourcentage de sel de 90 % (ce qui est élevé), les protéines n'avaient toujours pas précipitées. Cela indiquait que la quantité de protéines semblait faible au sein du surnageant, ce qui a été confirmé par un dosage ultérieur indiquant 61 µg/mL de protéines (donnée non présentée). Face à cette situation, la totalité du surnageant équilibré a été chargé sur une colonne hydrophobe d'un millilitre, même si les volumes semblaient disproportionnés. L'absence d'activité lipolytique dans l'éluat a démontré que la lipase avait totalement adhérée à la

matrice de la colonne. Cette purification par colonne hydrophobe a permis d'éliminer la majorité des protéines en plus de les concentrer à 6406 µg/mL dans un volume réduit. La chromatographie par échanges ioniques a ensuite été envisagée mais l'élution n'a pas permis de séparer les autres protéines de la lipase (le patron était exactement le même qu'avant la chromatographie). Étant donné la différence de masse moléculaire entre les protéines restantes, la lipase a pu être purifiée par tamis moléculaire ce qui l'a laissée pure avec une concentration de 322 µg/mL. La pureté de l'enzyme a été déterminée à l'aide d'une électrophorèse SDS-PAGE où la lipase y a été chargée directement, a été partiellement dénaturée ainsi que totalement dénaturée. La lipase non dénaturée (fraction non bouillie) présente un poids moléculaire de près de 35 kDa ainsi qu'une protéine vers 31 kDa. D'ailleurs, seule la protéine vers 35 kDa présente une activité au zymogramme, ce qui laisse supposer que celle de 31 kDa correspond à de l'enzyme dénaturée. Cette hypothèse est confirmée par le puits présentant la lipase totalement dénaturée, qui ne présente pas d'activité et qui confirme le poids moléculaire réel de la protéine qui est de 31 kDa. Finalement, le plus intéressant est le puits présentant la protéine bouillie 10 minutes car on observe une activité au zymogramme très forte. Ceci représente un bon indice de la résistance de l'enzyme à la chaleur.

4.4 Propriétés physico-chimiques de LipIAF5.2

Une fois la pureté de la lipase confirmée, les tests enzymatiques permettant sa caractérisation ont été entrepris. Le premier paramètre analysé a été celui du substrat préférentiel de l'enzyme. Les substrats choisis étaient synthétiques car le matériel (substrats, spectrophotomètre) nécessaire pour l'analyse des réactions enzymatiques avec ce type de substrat était facilement accessible. Un tampon de réaction ainsi qu'une température ont été choisis afin de débuter la caractérisation. Tout d'abord, il est possible de remarquer que la lipase semble préférer les substrats C4, C5, C14, C16 et C18 au profit des substrats C10 et C12. Ces résultats sont peu communs car normalement, la tendance d'une enzyme est soit envers les substrats à courtes chaînes, soit envers ceux à longues chaînes. Cependant, les substrats C4 et C5 démontrent une auto-hydrolyse surtout à une température élevée, comme par exemple 50 °C. Les réactions avec ces substrats ont donc saturées rapidement, laissant un intervalle très court où la réaction était linéaire. C'est à partir de ce court intervalle que l'activité relative a été calculée. Bien que l'incertitude relative sur les données ne soit pas très élevée, il est évident que le court intervalle de temps où la réaction a été linéaire présente une faiblesse technique qui vient interférer avec la qualité des résultats obtenus avec ces substrats. Un réflexe facile aurait été de faire les tests à une

température moins élevée. Mais, le problème aurait simplement été déplacé vers les substrats à longues chaînes (C10 et plus) car ces derniers sont très peu solubles. Il est courant que la solubilisation des substrats s'effectue à l'aide du Triton X-100, un détergent non-ionique. Or, il s'avère que la lipase IAF5.2 est inhibée en présence de ce détergent; il faut donc l'exclure du tampon réactionnel. Après plusieurs essais infructueux avec d'autres composés, la seule façon de solubiliser les substrats à longues chaînes a été l'augmentation de la température de réaction. L'effet direct a été une augmentation de l'hydrolyse spontanée des substrats C4 et C5. Comme ce qui nous intéressait était l'activité potentielle de la lipase envers les substrats à longues chaînes, la décision a été d'effectuer les réactions à une température de 50 °C. De toute façon, le criblage ayant mené à l'isolement du clone F5-2 s'est fait avec de la tributyrine, soit un acide gras de quatre carbones, ce qui indiquait une activité envers ce type de substrats à courtes chaînes. Dans le même ordre d'idée, une goutte de la lipase purifiée a été placée sur une gélose contenant de l'huile d'olive extra pure couplée à la rhodamine B. Un halo fluorescent visible sous les rayons ultra-violet a démontré que l'enzyme est capable d'utiliser ce substrat, qui correspond à C18. Toutes ces données démontrent que l'enzyme hydrolyse le substrat C4 assurément et potentiellement le C5 puis le C10 et le C12 à plus petite échelle. Par contre, autant l'hydrolyse de l'huile d'olive ainsi que celle des substrats synthétiques à longues chaînes soulignent l'appartenance de l'enzyme LipIAF5.2 à la classe des lipases. Sa préférence marquée envers le *p*-nitrophényl myristate (C14) a justifié l'emploi de ce substrat pour la détermination subséquente des autres paramètres physico-chimiques de l'enzyme.

Le pH optimal de l'enzyme a été identifié grâce à l'emploi de trois types de tampons différents. L'intervalle de pH de ces tampons devait se juxtaposer afin d'attribuer l'activité observée au pH et non au tampon lui-même. Aucun test n'a été fait à un pH inférieur à 7 car le *p*-nitrophénol n'absorbe pas en deçà de ce pH (Kademi *et al.*, 2000). Aussi, l'activité relative a été calculée par rapport à un témoin pour chaque réaction car le *p*-nitrophénol ne possède pas le même coefficient d'absorption selon le pH (Gupta *et al.*, 2003). Les données ont été normalisées pour chaque tampon à partir des résultats obtenus à pH 9, ce qui permet d'observer que le pH optimal d'action de l'enzyme avec le *p*-nitrophényl myristate à 50 °C est de 10,5. Ce résultat démontre l'alcalinité de l'enzyme, ce qui représente une qualité recherchée dans les procédés industriels, comme par exemple pour son utilisation dans les détergents.

Le tampon NaOH glycine à pH 10,5 a été retenu afin de déterminer la température optimale de l'enzyme. L'objectif ultime de ce travail était l'identification de nouvelles lipases

alcalines, agissant à de hautes températures et thermostables. Les tests effectués pour la température ont donc débuté à 30 °C puis se sont butés à 70 °C car afin d'avoir cette température dans la cuvette réactionnelle, la température de l'incubateur devait frôler les 95 °C. Il était donc physiquement impossible à l'aide du matériel utilisé jusqu'à présent de déterminer l'activité relative de la lipase à des températures excédant 70 °C. La courbe obtenue présente une forte activité à partir de 50 °C et ce jusqu'à 70 °C, avec un maximum à 60 °C. De plus, la perte minime d'activité observée après quatre heures d'incubation à 90 °C comparée à celle d'un témoin souligne également l'identification d'une lipase thermostable.

De façon générale, l'enzyme lipolytique issue du clone F5-2 présente les caractéristiques physico-chimiques recherchées lors de l'enrichissement du bioréacteur duquel elle provient. L'enrichissement favorise les chances d'obtenir des microorganismes capables de produire des enzymes aux traits recherchés comme si l'organisme provenait exactement de milieu voulu (Elend *et al.*, 2006; Entcheva *et al.*, 2001; Rhee *et al.*, 2005). En effet, le bioréacteur a été maintenu à une température variant entre 50 et 70 °C ainsi qu'à un pH variant entre 7 et 8,5. Ceci avait pour objectif l'obtention d'enzymes alcalines et agissant à de hautes températures, ce qui a été obtenu avec la lipase du clone F5-2.

4.5 Effets de différents agents sur la lipase IAF5.2

Dans une dernière série d'essais, l'effet de plusieurs agents sur l'activité de la lipase IAF5.2 a été vérifié. Tous ces éléments ont été mis en pré-incubation avec l'enzyme puis cette dernière a été ajoutée à une cuvette réactionnelle afin d'analyser si ces éléments avaient la possibilité de se lier à l'enzyme et d'ainsi en changer son activité. L'ajout de certains ions métalliques a démontré que le calcium et le manganèse semblent être deux métaux ayant la possibilité de se lier à la lipase car l'activité résiduelle de l'enzyme après son incubation avec ces éléments a augmentée. C'est le cas d'au moins quatre autres lipases, soit une exprimée par *Acinetobacter* sp. RAG-1, deux lipases alcalines et thermophiles provenant de *Thermosynthropha lipolytica* ainsi qu'une dernière issue de *Pseudomonas* sp. souche KB700A (Rashid *et al.*, 2001; Salameh et Wiegel, 2007; Snellman *et al.*, 2002). Le calcium agirait comme un ligand à de nombreux résidus entourant le site actif, tels que les cystéines, les histidines, les acides aspartiques et glutamiques qui ont la possibilité de s'associer avec des ions métalliques tels que le

calcium et le manganèse (Brenner, 1988; Salameh et Wiegel, 2007). Il faut également considérer que les interactions électrostatiques entre le calcium et les acides gras libérés lors de l'hydrolyse d'un triacylglycérol permettent de retirer ces acides de la surface des micelles, résultant à un libre accès continuel de la lipase à du nouveau substrat (Villeneuve *et al.*, 200). Le manganèse quant à lui augmenterait l'activité et la stabilité de l'enzyme à de hautes températures (Salameh et Wiegel, 2007). L'importance de ces ions pour l'activité de la lipase IAF5.2 est soulignée lors de l'ajout d'EGTA, soit un chélateur spécifique de ces métaux qui lors de son ajout à l'enzyme, a inhibé totalement son activité (Delhaize *et al.*, 2003). Cependant, aucun site supposé de liaison au calcium G-X-X-G-X-D n'a été retrouvé au sein de la séquence de la lipase, ce qui ne signifie pas que la lipase ne possède pas un motif différent de liaison (Rashid *et al.*, 2001).

Le magnésium, le zinc, le cobalt, le potassium, l'ammonium sulfate, le PMSF ainsi que le Tween 20 n'ont aucun (à 1 mM ou 1 %) sinon très peu d'effets (à 10 mM ou 10 %) sur l'activité résiduelle de l'enzyme. Le Tween 80 quant à lui inhibe totalement l'enzyme à une concentration de 10 %, tout comme le Triton X-100 qui empêche l'activité même à 1 %. Ces résultats indiquent que la lipase IAF5.2 pourrait difficilement être utilisée dans une formulation pour les détergents car elle ne serait plus active. Le SDS enlève également toute activité de l'enzyme, ce qui pourrait indiquer que des ponts disulfures sont essentiels à l'activité lipolytique de l'enzyme. Le plus intéressant dans toutes ces données est l'absence d'inhibition de l'enzyme en pré-incubation avec le PMSF. Cet agent se lie spécifiquement aux sérines de la protéine donc en autres à la sérine inclue dans le site actif. Cependant, lorsque le PMSF a été intégré dans la réaction enzymatique, aucune activité de la lipase n'a été observée. Cela suppose que lorsque l'enzyme, son substrat et le PMSF sont en contact, la lipase ne peut hydrolyser son substrat. C'est à cette étape qu'entre en jeu le couvercle qui protègerait le site actif et qui se déplacerait lors du contact de l'enzyme avec son substrat. En effet, ce résultat laisse deviner que la lipase IAF5.2 possède ce type de structure et lors de la réaction enzymatique, le couvercle a été déplacé ce qui a donné libre accès au PMSF à la sérine du site actif ce qui a conséquemment inhibé la réaction enzymatique. Cette hypothèse vient renforcer l'idée que le gène *lipIAF5.2* code effectivement pour une vraie lipase car seules les lipases possèdent ce type de structure (Fojan *et al.*, 2000; Jaeger *et al.*, 1994).

Lors de l'ajout de solvants en pré-incubation avec l'enzyme, une augmentation significative de l'activité est observée. Cette augmentation a aussi été observée dans le cas d'autres lipases comme celle de *Pseudomonas* sp. (PS) ou celle de *Fusarium solani* FS1 (Maia *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001). Une explication serait la déshydratation du milieu, ce qui

favoriserait l'hydrophobicité de l'environnement entourant le site actif (Nawani et Kaur, 2000). Aussi, les solvants rendent l'enzyme plus rigide ce qui pourrait permettre une meilleure interaction entre le substrat et l'enzyme (Dordick, 1989). D'autres expliquent ce phénomène par le fait que les solvants garderaient le couvercle ouvert, ce qui dégagerait le site actif, peu importe le contact avec le substrat (Choo et al., 1998). Un test intéressant serait d'ajouter du PMSF en présence des solvants en pré-incubation puis de vérifier l'activité résiduelle. Par contre, cela ne représente pas une explication susceptible d'expliquer pourquoi le glycérol, le méthanol et le 1-hexanol inhibent l'activité de l'enzyme. Pour le glycérol et le méthanol, l'incertitude sur la donnée peut laisser croire qu'il n'y a pas d'inhibition. Par contre, pour le 1-hexanol, c'est sans équivoque qu'il y a inhibition, comme cela a été observé pour une lipase provenant de *P. aeruginosa* LST-03 (Ogino *et al.*, 2000).

Globalement, la lipase IAF5.2 présente des caractéristiques physico-chimiques intéressantes que peu de lipases démontrent. En effet, seules les lipases de *B. alcalophilus*, de *B. licheniformis* souche H1 et de *Burkholderia sp.* présentent un pH (10,6; 10 et 11 respectivement) et une température (60, 55 et 90-100 °C respectivement) optimaux semblables à ceux de la lipase du clone F5-2 (Ghanem *et al.*, 2000; Khyami-Horani, 1996; Braddo *et al.*, 2002; Rathi *et al.*, 2000 et 2001). Ces caractéristiques la place comme un candidat intéressant pour son utilisation dans des procédés demandant des températures et des pH élevés, excluant bien entendu son utilisation dans les détergents.

5. CONCLUSION

Une approche métagénomique a été utilisée ici afin d'identifier de nouvelles lipases alcalines et thermostables. L'ADN utilisé afin de construire la banque provenait d'un bioréacteur enrichi où le pH et la température sont demeurés élevés. Le criblage fonctionnel de la banque métagénomique s'est déroulé en utilisant des milieux nutritifs solides contenant de la tributyrine comme substrat. Deux clones ont été étudiés dont l'un menant à l'identification d'une nouvelle lipase agissant à des pH alcalins et à de hautes températures.

Tout d'abord, le criblage fonctionnel de la banque transduite dans *E. coli* à l'aide de la tributyrine a identifié dix clones hydrolysant ce substrat. Deux de ces clones ont été choisis afin d'en isoler l'enzyme responsable de l'activité lipolytique. L'isolement de ces enzymes a été fait par une série de délétions à l'aide d'endonucléases de restriction. L'utilisation de ces enzymes a permis l'élimination d'une partie de l'insert provenant de la banque métagénomique et le séquençage des fragments d'ADN restants a mené à l'identification de deux nouvelles enzymes.

L'enzyme issue du premier clone a été identifiée comme étant une carboxylestérase dont le gène mesure 1624 pbs et son poids moléculaire théorique est de 58 kDa. L'analyse des gènes entourant cette enzyme n'a pas permis d'en identifier la provenance car tous les gènes étaient apparentés à des microorganismes différents. Cependant, le gène de la carboxylestérase était affilié à un organisme thermophile, ce qui peut laisser croire que la protéine pourrait être thermostable. L'analyse séquentielle du gène a permis de l'identifier comme faisant partie de la famille des α/β hydrolases grâce à son motif de type G-X-S-X-G. De plus, ce motif est inséré dans une séquence conservée qui est unique aux estérases, ce qui permet de conclure que le gène responsable de l'activité lipolytique du clone F5-15 correspond à celui d'une carboxylestérase.

L'expression du gène a ensuite été vérifiée afin de déterminer si la protéine était sécrétée ou intracellulaire. La détection de la protéine, pratiquée à l'aide d'un zymogramme, a révélé une protéine dominante intracellulaire à une hauteur de 60 kDa ainsi qu'une protéine extracellulaire qui est probablement due au relâchement de l'enzyme suite à la mort cellulaire.

Pour conclure en ce qui a trait au clone F5-15, l'enzyme lipolytique correspond à une carboxylestérase intracellulaire.

L'enzyme issue du deuxième clone a nécessité beaucoup plus de manipulations afin d'en obtenir sa séquence. Le résultat est l'identification d'un gène inconnu codant pour une lipase

codée par un gène de 928 pbs, et dont la protéine possède à un poids moléculaire théorique de 32,6 kDa. Un site potentiel pour le clivage d'un peptide signal a été identifié avec une probabilité de 99,7 %. Tout comme le gène du clone F5-15, celui du clone F5-2 fait partie aussi de la famille des α/β hydrolases car il possède également le motif G-X-S-X-G. Par contre, ce motif est inclus dans une séquence qui ne correspond pas totalement à celle des lipases. Les gènes entourant celui de la lipase sont tous affiliés à des microorganismes différents, ce qui ne permet pas de conclure quant à l'origine du fragment issu de la banque métagénomique. L'alignement de séquences en acides aminés entre les traductions du gène et de ses trois homologues met en évidence deux histidines pouvant être impliquées dans le site actif.

La mutation de l'histidine 253 a révélé une perte d'activité qui peut être due autant à l'absence du résidu en tant que tel ou à un changement de forme de l'enzyme empêchant son activité adéquate. Bref, l'histidine 253 est importante pour l'activité lipolytique de la lipase IAF5.2. La mutation de l'histidine 229 n'a pas inhibé l'activité de l'enzyme mais le patron protéique correspondant à l'enzyme mutée présente trois nouvelles isoformes. Cette différence d'expression entre l'enzyme native et celle mutée peut être expliquée par la dimérisation de cette dernière avec certains peptides.

La lipase IAF5.2 a ensuite été exprimée chez *E. coli* ainsi que chez *S. lividans*. Dans les deux cas, la production de la lipase n'était visualisable qu'à l'aide d'un zymogramme. Chez *E. coli*, la lipase était intracellulaire et sécrétée, probablement à cause du relâchement causé par la lyse cellulaire. Chez *S. lividans* la lipase était totalement sécrétée. Malgré le taux de croissance lent de cet hôte, il a été désigné afin de purifier la lipase. L'enzyme a été purifiée en deux étapes, soit une chromatographie à interactions hydrophobes suivie par un tamis moléculaire. La pureté de la lipase a été analysée sur gel et a permis de déterminer que le poids moléculaire exact de la protéine mature se situe près de 31 kDa.

La lipase purifiée a été utilisée afin de déterminer ses caractéristiques physico-chimiques. La lipase préfère les substrats à longues chaînes avec une préférence pour le *p*-nitrophényl myristate (C14). Son pH optimal avec ce substrat est de 10,5 et sa température optimale de 60 °C. L'enzyme est aussi capable de résister à une température de 90 °C pendant quatre heures sans perte significative de son activité. Le clone F5-2 contient donc une enzyme qui correspond aux caractéristiques choisies lors de l'enrichissement des bioréacteurs.

La lipase IAF5.2 est activée par le calcium et le manganèse lorsque placée en pré-incubation avec ces éléments, tandis qu'elle est inhibée par les détergents. Des expériences ont démontré que la lipase possèderait une structure agissant comme un couvercle afin de protéger son site actif. Finalement, l'ajout de solvants en pré-incubation avec l'enzyme augmente énormément son activité.

Globalement, l'approche métagénomique utilisée ici a permis l'identification de deux enzymes jusqu'à maintenant inconnues. Le gène lipolytique du clone F5-2 présente le plus d'intérêt car il code vraisemblablement pour une lipase. D'un point de vue industriel, cette enzyme ne pourrait être utilisée dans des formulations de détergents car son activité est inhibée en présence de ces éléments. Cependant, la résistance de l'enzyme aux solvants, sa grande thermostabilité ainsi que ses propriétés physico-chimiques de pH, substrat et température optimaux en font un bon candidat pour la production de biodiésel.

BIBLIOGRAPHIE

Abbot, P., Withgott, J.H., Moran, N.A., 2001. Genetic conflict and conditional altruism in social aphid colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12068-12071.

Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., Givskov, M., 2001. gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol*, 67, 575-585.

Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J*, 343 Pt 1, 177-183.

Beer, H.D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J.E., Schomburg, D., Schmid, R.D., 1996. Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Eng*, 9, 507-17.

Bennett, M.J., Schlunegger, M.P., Eisenberg, D., 1995. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci*, 4, 2455-2468.

Bentley, S.D., Maiwald, M., Murphy, L.D., Pallen, M.J., Yeats, C.A., Dover, L.G., Norbertczak, H.T., Besra, G.S., Quail, M.A., Harris, D.E., von Herbay, A., Goble, A., Rutter, S., Squares, R., Squares, S., Barrell, B.G., Parkhill, J., Relman, D.A., 2003. Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*. *Lancet*, 361, 637-644.

Benzonana, G., Desnuelle, P., 1965. Kinetic study of the action of pancreatic lipase on emulsified triglycerides. Enzymology assay in heterogeneous medium. *Biochim Biophys Acta*, 105, 121-36.

Binnie, C., Cossar, J.D., Stewart, D.I., 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol*, 15, 315-320.

Bousquet-Dubouch, M.P., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S., Legoy, M.D., 2001. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim Biophys Acta*, 1550, 90-9.

Bradoo, S., Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., 2002. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *J Biochem Biophys Methods*, 51, 115-120.

Bradoo, S., Saxena, R.K., Gupta, R., 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp. World J Microbiol Biotechnol*, 15, 87-91.

Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., Rohwer, F., 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*, 185, 6220-6223.

Brenner, S., 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 334, 528-30.

Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G., Lotti, M., 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci*, 12, 2312-2319.

Brockerhoff, H., Jensen, R., 1974. Lipolytic enzymes, Academic Press, New York, p.1-340.

Brune, A.K., Gotz, F., 1992. Degradation of lipids by bacterial lipases. VCH, Weinhein.

Cannon, W.R., 2003. Whipple's disease, genomics, and drug therapy. *Lancet*, 361, 1916.

Castro, M.J., Cabral, J.M., 1988. Reversed micelles in biotechnological processes. *Biotechnol Adv*, 6, 151-167.

Chapus, C., Rovery, M., Sarda, L., Verger, R., 1988. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*, 70, 1223-34.

Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C., 1981. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 7294-7299.

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

Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M., 1990. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Lett*, 276, 181-4.

Coque, T.M., Oliver, A., Perez-Diaz, J.C., Baquero, F., Canton, R., 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 500-510.

Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R., Guerineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernodet, J.L., 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol*, 69, 49-55.

Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., Wittwer, P., 2005. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol*, 23, 321-329.

Cowan, D.A., Arslanoglu, A., Burton, S.G., Baker, G.C., Cameron, R.A., Smith, J.J., Meyer, Q., 2004. Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst. *Biochem Soc Trans*, 32, 298-302.

Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K., Doctor, B.P., 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci*, 2, 366-82.

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

Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., Ryan, P.R., 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell*, 15, 1131-1142.

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

Derewenda, Z.S., Derewenda, U., Dodson, G.G., 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 A resolution. *J Mol Biol*, 227, 818-39.

Dharmsthiti, S., Kuhasuntisuk, B., 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties sand application for wastewater treatment. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 21, 75-80.

Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., Mullany, P., 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1430-1432.

Diaz, P., Prim, N., Pastor, F.I.J., 1999. Direct fluorescence-based lipase activity assay. *Biotechniques*, 27, 696-700.

Dordick, J.S., 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb Technol*, 11, 194-211.

Drobniewski, F.A., 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev*, 6, 324-338.

Egloff, M.P., Sarda, L., Verger, R., Cambillau, C., van Tilbeurgh, H., 1995. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Sci*, 4, 44-57.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., Reymond, J.L., Jaeger, K.E., Streit, W.R., 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3637-45.

Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., Streit, W.R., 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol*, 67, 89-99.

Entressangles, B., Desnuelle, P., 1968. Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system. *Biochim Biophys Acta*, 159, 285-95.

EuropaBio, 2008. http://www.europabio.org/white_biotech.htm The European association for bioindustries.

Ferreira, A.C., Nobre, M.F., Rainey, F.A., Silva, M.T., Wait, R., Burghardt, J., Chung, A.P., da Costa, M.S., 1997. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov.,

two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 939-947.

Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T., Petersen, S.B., 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie*, 82, 1033-1041.

Gabor, E.M., Alkema, W.B., Janssen, D.B., 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol*, 6, 879-886.

Galbraith, E.A., Antonopoulos, D.A., White, B.A., 2004. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ Microbiol*, 6, 928-937.

Gandhi, N., 1997. Applications of lipase. *JAOCS*, 74, 621-634.

Ghanem, E.H., H.A., A.-S., Saleh, K.M., 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 16, 459-464.

Gilbert, E.J., Cornish, A., Jones, C.W., 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J Gen Microbiol*, 137, 2223-2229.

Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., Davies, J., 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 17025-17030.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Cygler, M., 1994. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci*, 3, 82-91.

Guit, R.P., Kloosterman, M., Meindersma, G.W., Mayer, M., Meijer, E.M., 1991. Lipase kinetics: Hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber membrane reactor. *Biotechnol Bioeng*, 38, 727-32.

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 763-781.

Gupta, R., Rathi, P., Gupta, R., Bradoo, S., 2003. Lipase assays for conventionnal and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 63-71.

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

Handelsman, J., 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 669-685.

Harlow, E., Lane, D., 1988. Antibodies. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*.

Healy, F.G., Ray, R.M., Aldrich, H.C., Wilkie, A.C., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 1995. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, 667-674.

Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., Ollis, D.L., 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure*, 7, R141-6.

Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., Gottschalk, G., 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3901-7.

Hughes, D.S., Felbeck, H., Stein, J.L., 1997. A histidine protein kinase homolog from the endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3494-3498.

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., Morosoli, R., 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol Microbiol*, 17, 367-377.

Isiegas, C., Parro, V., Mellado, R.P., 1999. *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM beta-lactamase. *Lett Appl Microbiol*, 28, 321-326.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*, 53, 315-351.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 15, 29-63.

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

Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., Baratti, J., 2000. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 173-179.

Khyami-Horani, H., 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J Microbiol Biotechnol*, 12, 399-401.

Kim, E.-K., Sung, M.-H., Kim, H.-K., Oh, T.-K., 1994. Occurence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus sp.* strain 398. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58, 961-962.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 345-51.

Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G., Daniel, R., 2003. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3048-3060.

Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., Daniel, R., 2003. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1408-1416.

Kulkarni, N., Gadre, R.V., 2002. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J Ind Food Microbiol*, 28, 344-348.

Kwoun Kim, H., Jung, Y.J., Choi, W.C., Ryu, H.S., Oh, T.K., Lee, J.K., 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol Lett*, 235, 349-355.

Langer, M., Gabor, E.M., Liebeton, K., Meurer, G., Niehaus, F., Schulze, R., Eck, J., Lorenz, P., 2006. Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J*, 1, 815-821.

Lawrence, R., 1967. Microbial lipases and related esterases. *Dairy Sci. Abstr.*, 29, 1-8.

Lee, O.-W., Koh, Y.-S., Kim, K.-J., Kim, B.-C., Choi, H.-J., Kim, D.-S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.-R., 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett*, 179, 393-400.

Leveau, J.H., Gerards, S., de Boer, W., van Veen, J.A., 2004. Phylogeny-function analysis of (meta)genomic libraries: screening for expression of ribosomal RNA genes by large-insert library fluorescent in situ hybridization (LIL-FISH). *Environ Microbiol*, 6, 990-998.

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

Lonon, M.K., Woods, D.E., Straus, D.C., 1988. Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 979-984.

Lorenz, P., Eck, J., 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol*, 3, 510-516.

Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J., 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 572-577.

Lorenz, P., Schleper, C., 2002. Metagenome-a challenging source of enzyme discovery. *J Mol Cat B: Enz*, 19-20, 13-19.

Maia, M.M., Heasley, A., Camargo de Morais, M.M., Melo, E.H., Morais, M.A., Jr., Ledingham, W.M., Lima Filho, J.L., 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour Technol*, 76, 23-7.

Majernik, A., Gottschalk, G., Daniel, R., 2001. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na(+)(Li(+))/H(+) antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J Bacteriol*, 183, 6645-6653.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Jr., Amundson, C.H., 1992. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol*, 14, 426-46.

Martin, V.S., Woodard, S.S., Katsuki, T., Yamada, Y., Ikeda, M, Sharpless, K.B., 1981. Kinetic resolution of racemic allylic alcohols by enantioselective epoxidation. A route to substances of absolute enantiomeric purity? *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6240-6327.

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

Miled, N., De Caro, A., De Caro, J., Verger, R., 2000. A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta*, 1476, 165-72.

Mozhaev, V.V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol*, 11, 88-95.

Nardini, M., Dijkstra, B.W., 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol*, 9, 732-737.

Nawani, N., Kaur, J., 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol Cell Biochem*, 206, 91-6.

Nini, L., Sarda, L., Comeau, L.C., Boitard, E., Dubes, J.P., Chahinian, H., 2001. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochim Biophys Acta*, 1534, 34-44.

Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Frenken, L.G.J., Egmond, M.R., 1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* 331, 123–128.

Noonan, J.P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J.R., Rohland, N., Rabeder, G., Krause, J., Detter, J.C., Paabo, S., Rubin, E.M., 2005. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science*, 309, 597-599.

Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., Ishikawa, H., 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng*, 89, 451-7.

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., et al., 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 5, 197-211.

Overbeeke, P.L.A., Govardhan, C., Khalaf, N., Jongejan, J.A., Heijnen, J.J., 1999. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *J Mol Cat B: Enz*, 10, 385-393.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News*, 51, 4-12.

Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X., 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. *Enzyme Microb Technol*, 27, 187-204.

Park, C., Raines, R.T., 2000. Dimer formation by a "monomeric" protein. *Protein Sci*, 9, 2026-2033.

Piel, J., 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14002-14007.

Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., Schmid, R.D., 2000. Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 491-508.

Plou, F.J., Ferrer, M., Nuero, O.M., Calvo, M.V., Alcalde, M., Reyes, F., Ballesteros, A., 1998. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotecnology Techniques*, 12, 183-186.

Preston, C.M., Wu, K.Y., Molinski, T.F., DeLong, E.F., 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6241-6246.

Rajan, M., 204. Global market for industrial enzymes to reach $2.4 million by 2009 Business Communications Company Inc.. RC-147U Enzymes for industrial applications. http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html.

Randall-Hazelbauer, L., Schwartz, M., 1973. Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 116, 1436-46.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T., 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4064-9.

Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R.K., Gupta, R., 2000. A hyperthermostable , alkaline lipase from *Pseudomonas sp.* with the property of thermal activation. *Biotechnol Lett*, 22, 495-498.

Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem*, 37, 187-192.

Rhee, J.K., Ahn, D.G., Kim, Y.G., Oh, J.W., 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl Environ Microbiol*, 71, 817-25.

Rhie, H.G., Shimkets, L.J., 1991. Low-temperature induction of *Myxococcus xanthus* developmental gene expression in wild-type and csgA suppressor cells. *J Bacteriol*, 173, 2206-2211.

Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*, 38, 525-552.

Rinas, U., Hoffmann, F., 2004. Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 20, 679-687.

Rodriguez-Valera, F., 2002. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ Microbiol*, 4, 628-633.

Rossello-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 39-67.

Salameh, M.A., Wiegel, J., 2007. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7725-7731.

Sarda, L., Desnuelle, P., 1958. Action of pancreatic lipase on emulsified esters. *Biochim Biophys Acta*, 30 : 513-521.

Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S., 2003. Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods*, 52, 1-18.

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

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

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

Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E., Streit, W.R., 2003. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol*, 69, 7298-7309.

Schmid, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed*, 37, 1608-1633.

Schmidt-Dannert, C., Rùa, M.L., Atomi, H., Schmid, R.D., 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* - Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim Biophys Acta*, 1301, 105-114.

Schmidt, T.M., DeLong, E.F., Pace, N.R., 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol*, 173, 4371-4378.

Schrag, J.D., Li, Y.G., Wu, S., Cygler, M., 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351, 761-4.

Schrag, J.D., Cygler, M., 1993. 1.8 A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J Mol Biol*, 230, 575-91.

Sebat, J.L., Colwell, F.S., Crawford, R.L., 2003. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4927-4934.

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

Sharma, R., Rajan, R., Kapardar, R.K., Grover, A., 2005. Unculturable bacterial diversity: an untapped resource. *Curr. Sci.*, 89, 72-77.

Snellman, E.A., Sullivan, E.R., Colwell, R.R., 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem*, 269, 5771-5779.

Steele, H.L., Streit, W.R., 2005. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiol Lett*, 247, 105-111.

Svendsen, A., 2000. Lipase protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, 1543, 223-238.

Thomson, C.A., Delaquis, P.J., Mazza, G., 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 39, 165-187.

Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 56, 782-787.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428, 37-43.

Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., Watanabe, K., 2005. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol*, 23, 88-93.

Uppenberg, J., Patkar, M.T., Hansen, S., Jones, A., 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2, 293.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66-74.

Verger, R., 1976. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 5, 77-117.

Verger, R., 1997. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Tibtech*, 15, 32-38.

Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.

Vinogradov, A.E., 2003. DNA helix: the importance of being GC-rich. *Nucleic Acids Res*, 31, 1838-1844.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., Streit, W.R., 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6235-6242.

Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.-J., Wang, H.Y., 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATTC 53841). *J Ferment Bioeng*, 79, 433-438.

Ward, N., 2006. New directions and interactions in metagenomics research. *FEMS Microbiol Ecol*, 55, 331-338.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6578-6583.

Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343, 771-4.

Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., Zhou, J., 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 67, 5780-90.

Annexe A

Souches bactériennes

Tableau 4 Souches bactériennes utilisées pour le criblage et l'expression des enzymes

Souches	Description	Références
Escherichia coli		
DH11S	FΔ *mcr*A Δ (*mrr hsd*RMS *mcr*BC) Δ (*lac-pro*AB) (*rec*A1398) *deo*R *sup*E *rps*L *srl thi*/F'*pro*AB$^+$*lac*I^{q}Z ΔM15, *lac-3350*, *galK2*, *galT22*, *rpsL179*, zgj-203::Tn10 *hflB1* (Ts)	Lin *et al.*, 1992
Streptomyces lividans		
IAF10-164	Dérivée de la souche sauvage *S. lividans* 1326, *msi*K$^-$	Hurtubise *et al.*, 1995

Plasmides et cosmides

Tableau 5 Plasmides et cosmides utilisés pour le criblage et l'expression des enzymes

Plasmides/cosmides	Description	Références
Escherichia coli		
pIAFS2	Dérivé de pWEB-TNC™ et de pIAF550, apra^R, amp^R, chl^R,	INRS-Institut Armand-Frappier
pUC18	Origine pMB1, gène de la β-lactamase (*bla*), gène *lacZ*, site de multiclonage	Pharmacia
Streptomyces lividans		
pIAFC109	Dérivé de pIJ702, *xln*Cp$_{C109}$	INRS - Institut Armand-Frappier
pIAFD95A	Dérivé de pIAFC109, promoteur D95A	INRS - Institut Armand-Frappier

Amorces utilisées

Tableau 6 Description des amorces utilisées

Nom	Séquence (5'→ 3')	Sources
Clonage de la lipase IAF5.2 dans pUC18 (*E. coli*)		
Lip5 ECFOR	GGGAATTCCCGAGGAGCCTTGCCATGCCAA *Eco*RI	Ce travail
Lip3 ECREV	TTTAAGCTTTCAGTACGGGCAGTTACCTCGGTATT *Hind*III	Ce travail
Clonage de la lipase IAF5.2 dans C109 (*S. lividans*)		
Amorces du gène entier		
Lip5'	AAAGCATGCCAATAACCGCCAGAAA *Sph*I	Ce travail
Lip3'	AAAGAGCTCAGTACGGGCAGTTACCTCGGTATT *Sac*I	Ce travail
Mutation du site SphI interne		
mutSphFor	GCACGCCTCGCCGTTCTATAACCG	Ce travail
mutSphRev	GATGCGGTTATAGAACGGCGAGGCGTGC	Ce travail
Mutations H229A et H253A		
H229A for	GTGGCCTTGGCTGCCTCGCCGTTC	Ce travail
H229A rev	GAACGGCGAGGCAGCCAAGGCCAC	Ce travail
H253A for	GGGACGCCTGGTGCGCCAACG	Ce travail
H253A rev	CGTTGGCGCACCAGGCGTCCC	Ce travail
Séquençage		
M13 for	GTAAAACGACGGCCAGT	Génome Québec
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Génome Québec
Séquençage de la région entourant la lipase IAF5.2		
Transporteur ABC	CCGTGCTCGACAACATCAAG	Ce travail
Régulateur AraC	TGGCGTGATGCCGTTGATCG	Ce travail
Région 1400-2800	TACTACCTGGCGTCGTTCTC	Ce travail

Annexe B

Publication (article accepté)

Meilleur, C., Hupé, J.-F., Juteau, P., Shareck, F. Isolation and characterization of a new alkalithermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Communications par affiche

Meilleur, C., Hupé, J.-F., Juteau, P., Shareck, F., 2007. Screening for Novel Thermostable Enzymes using Metagenomics. 57e Congrès Annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes. Québec, Canada.

Meilleur, C., Juteau, P., Shareck, F., 2007. Clonage, expression et purification d'une lipase hétérologue chez *Streptomyces lividans*. Congrès Armand-Frappier. Magog, Canada.

Annexe C

Le bioréacteur

Source : Jean-François Hupé

Inoculum de départ:

- Biomasse provenant de l'effluent de deux réacteurs thermophiles
- Extrait de compost de crevettes
- Extrait de sol (terre noire)
- Échantillons (2) provenant de la cafétéria

Milieu de culture:

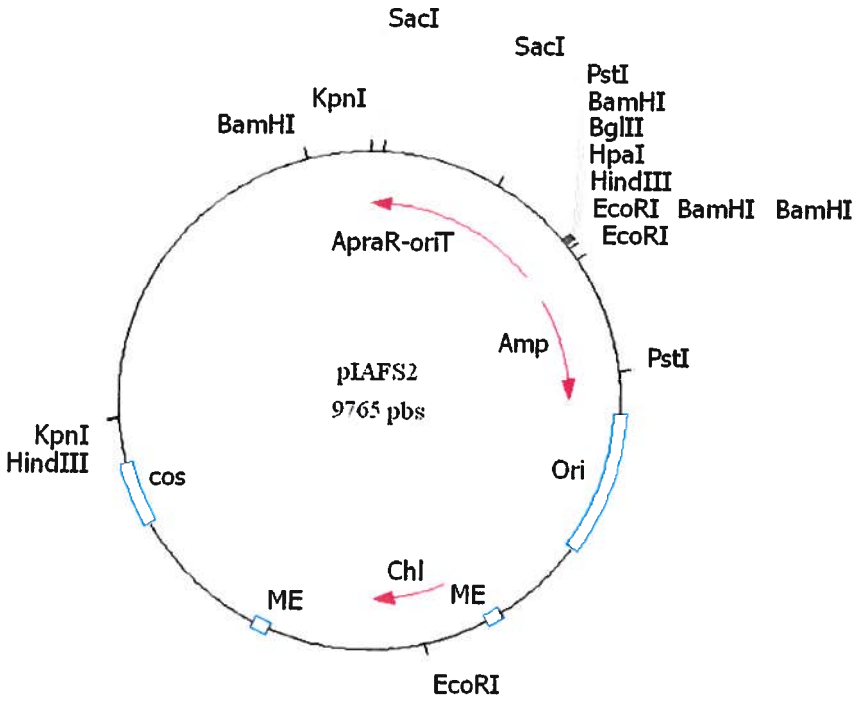
- Milieu nutritif minimal
- Extrait de levure 0,01% (source de N)
- Gélatine (source de N et de C)

Cuvées alimentées séquentielles («fed-batch»):

- Cycles de 72h
- 50% de renouvellement du milieu
- pH: 7,0 → 8,5 → 7,0
- T°: 50°C → 70°C → 50°C
- Alimentation en source de carbone une fois par 12 heures

Le bioréacteur 5 a subi 30 cycles de 72 heures après lesquels la biomasse fût recueillie. L'ADN a ensuite été extrait d'une partie de cette biomasse par une série de digestions au lysozyme, de cycles de congélation et décongélation et d'extractions au phénol et au chloroforme. L'ADN a ensuite été digéré de façon partielle par *Bam*HI afin d'obtenir des fragments de la taille de 40 kbs. Le vecteur pIAFS2 a été digéré par *Bgl*II (site unique). Le vecteur ainsi que l'ADN ont été ligués ce qui a formé de longs concatémères. Par l'ajout de têtes de phage λ préformées, l'ADN compris entre deux sites *cos* (inclus dans le vecteur) a été encapsidé à raison d'environ 40 kbs d'insert ainsi que de ~ 10 kbs de vecteur. Une fois la tête remplie, une queue vient s'y rattacher et les unités phagiques sont prêtes à transduire *E. coli* LE392MP (Épicentre).

Annexe D



Carte physique du cosmide pIAFS2. Origines de réplication pour *E. coli* et *S. lividans* (*ori*), gènes de résistance à l'ampicilline (*amp*), à l'apramycine (*apra*) et au chloramphénicol (*chl*), séquence servant à l'encapsidation (*cos*), origine de transfert par conjugaison (*ori*T), séquences reconnues par la transposase (ME, Mosaic End).

Liste des produits chimiques utilisés

Acétate de potassium	Sigma
Acétate de sodium	EM Science
Acétone	Sigma
Acide acétique glacial	EMD
Acide borique	Sigma
Acide sulfurique	USB
Acrylamide	Amersham
Agar	USB
Agarose	USB
Albumine sérique bovine	Sigma
Ampicilline	USB
Apramycine	Sigma
ARNase A	Roche
ATP	Sigma
Bleu de bromophénol	Biorad
Bleu de Coomassie	Biorad
Borate de sodium	Fisher
Bromure d'éthidium	EM Science
Carbonate de sodium	Fisher
Casamino acid	Fisher
Chloroforme	Fisher
Chlorure de calcium	Sigma
Chlorure de cobalt	Sigma
Chlorure de cuivre	VWR
Chlorure de magnésium	VWR
Chlorure de manganèse	Sigma
Chlorure de potassium	Fisher
Chlorure de sodium	Fisher
Chlorure de zinc	VWR
Chlorure ferrique	Fisher
DMF	OmniSolv

DMSO	Fisher
dNTPs	Fisher
EDTA	Fisher
EGTA	Sigma
Éthanol	Alcool du Québec
Éthylène glycol	BDH
Extrait de boeuf	Difco
Extrait de levures	Difco
Ficoll 400	Sigma
Formaldéhyde	Fisher
Glucose	Sigma
Glycérol	Fisher
Glycéryl tributyrate (tributyrine)	Sigma
Glycine	GE Healthcare
Hydroxyde de sodium	VWR
Hydroxyquinoline	Sigma
IPTG	USB
Isopropanol	Fisher
Kanamycine	Sigma
Lait écrémé	Difco
L-proline	Roche
Lysozyme	USB
Maltose	Difco
Mannitol	Sigma
Méthanol	Alcool du Québec
Méthionine	Sigma
4-méthylumbelliféryl butyrate	Sigma
Molybdate d'ammonium	Fisher
MOPS	BDH
n-butanol	Sigma
Nitrate d'argent	Sigma
NZ amine A	Sigma
PEG 1000	Roche
Phénol	Roche

PMSF	Sigma
Phosphate de potassium dibasique	Fisher
Phosphate de potassium monobasique	Fisher
Phosphate de sodium	VWR
p-nitrophényl butyrate	Sigma
p-nitrophényl caprate	Sigma
p-nitrophényl laurate	Sigma
p-nitrophényl myristate	Sigma
p-nitrophényl palmitate	Sigma
p-nitrophényl stéarate	Sigma
p-nitrophényl valérate	Sigma
Poudre de soja tryptique (TSB)	Difco
Propionamide	Acros
Saccharose	Sigma
SDS	Biorad
Sulfate d'ammonium	Fisher
Sulfate de cuivre	Sigma
Sulfate ferrique	Merck
Sulfate de magnésium	VWR
Sulfate de potassium	Anachemia
Sulfate de zinc	Baker
TEMED	PlusOne
TES	Sigma
Thiosulfate de sodium	VWR
Tris	USB
Triton X-100	Sigma
Tryptone	Difco
Tween 20	Sigma
Tween 80	Sigma
X-gal	USB
Xylène cyanol	Sigma
Xylose	Sigma