

À mon fils, Renaud

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Purification et caractérisation d'une estérase produite par
Enterobacter cloacae hydrolysant les parabènes**

Par
Maryse Dupont

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

Jury d'évaluation :

François Lépine, Ph. D.
Réjean Beaudet, Ph. D.
J. Daniel Dubreuil, Ph. D.

Résumé

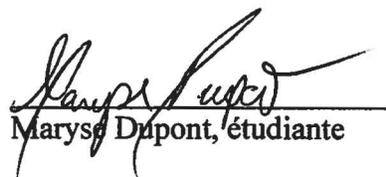
Des travaux de purification et de caractérisation d'une enzyme produite par *Enterobacter cloacae* hydrolysant les parabènes ont été entrepris afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance des microorganismes face aux parabènes. L'enzyme a été purifiée par chromatographie liquide à haute pression à l'aide de 4 colonnes chromatographiques. La première fut une colonne cationique (CM Ap-2, Waters), la seconde une colonne anionique (QMA, Waters), la troisième une colonne cationique ayant des propriétés différentes à la première (CM Avicell, Waters) et la dernière était un tamis moléculaire (Protein-Pack SW 300). Les rendements obtenus lors de ces étapes de purification furent respectivement de 69.8 %, 48.7 %, 17.3 % et 15.9 % et les taux de purification par rapport à la fraction initiale furent de 37.8, 67.6, 500 et 572.9 respectivement.

La purification a permis la détermination du poids moléculaire de l'enzyme qui a tout d'abord été évalué à 55 000 Da par visualisation sur SDS-Page. Ensuite, le poids moléculaire fut mesuré à 54 640 Da par spectrométrie de masse. Le point isoélectrique fut également évalué à 6.9 par gel d'isofocalisation électrique.

Suite à la purification de l'enzyme des travaux de séquençage ont été entrepris. Lors de ces travaux, une séquence de 19 acides aminés correspondant à l'extrémité N-terminale fut déterminée (Gln-Glu-Leu-Ser-Pro-Val-Gln-Met-Ser-Lys-Gly-Thr-Ile-Glu-Gly-Val-Lys-Asn-Asp). Une deuxième séquence interne fut déterminée par spectrométrie de masse (Val-Ala-Pro-Thr-Glu). Une troisième séquence interne fut déterminée par le séquençage d'un fragment obtenu par traitement de l'enzyme au bromure de cyanogène (Ala-Gly-Tyr-Phe-Ala-Lys-Gly-Leu-Phe-Asn-Arg-Ala-Ile-Val-Ser-Lys-Gly-Tyr). À partir de ces séquences, des oligonucléotides dégénérés furent produits et plusieurs PCR furent effectués dans diverses conditions. Trois produits d'amplification ont été clonés et séquencés. Cependant, aucun d'entre eux ne correspondait à l'estérase recherchée. Le premier gène correspondait à une protéine de régulation (glycosyl-3-phosphate), le deuxième codait pour une perméase (glycerol-3-phosphate) et le troisième codait pour une aminotransférase. Un alignement de séquence fait à partir de la séquence obtenue par traitement au bromure de cyanogène démontre une homologie avec 11 carboxylestérases connues. Ceci laisse croire que l'enzyme purifiée en serait une carboxylestérase.

Un test d'inhibition au diisopropyl fluorophosphate (DFP) a été effectué. Le test a démontré une inhibition complète de l'activité enzymatique ce qui indique que l'estérase possède une sérine active au site catalytique.


François Lépine, Directeur


Maryse Dupont, étudiante

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr. François Lépine pour son support tout au long de ma maîtrise. Je veux également remercier les Dr. Claude Dupont et Réjean Beudet pour leurs nombreux conseils et leur temps accordé en purification de protéines et également le Dr. Richard Villemur pour les travaux de séquençage.

J'aimerais aussi profiter de l'occasion pour remercier les techniciens Rita Alarie, Lisette Duval, Francine Turcotte, Louis Racine et Sylvain Milot avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et à apprendre.

J'aimerais également remercier tout les étudiants de microbiologie de l'environnement, ainsi que la Rousse (Cindy) avec qui ces deux années ont passées tellement vite. Je vais toujours me rappeler de bons souvenirs des partys et des soupers multi-ethniques qui furent organisés. Je vous souhaite à tous beaucoup de succès dans le futur.

Enfin, je veux remercier ma famille. Premièrement mes parents, Nicole et Marcel qui n'ont jamais ménagé leur support financier ainsi que leurs encouragements pour que je puisse réussir dans mon cheminement scolaire. Aujourd'hui, bien que grande soit ma reconnaissance je ne peux vous dire qu'un seul mot : MERCI ! Je veux également remercier mon mari, Michel qui s'est montré compréhensif et a su me soutenir tout au long de ma maîtrise.

Table des matières

| | Page |
|--|-------------|
| Résumé | IV |
| Remerciements | V |
| Table des matières | VI |
| Liste des tableaux | X |
| Liste des figures | XI |
| Liste des abréviations | XII |
| Liste des fournisseurs | XIII |
| 1. Introduction | 1 |
| 2. Revue de la littérature | 6 |
| 2.1 Méthodes de conservation des produits périssables | 6 |
| 2.2 Les parabènes | 6 |
| 2.2.1 Propriétés physiques et chimiques | 7 |
| 2.2.2 Activité antimicrobienne | 8 |
| 2.2.3 Mécanismes d'action | 10 |
| 2.2.4 Résistance aux parabènes | 11 |
| 2.2.5 Micro-organismes hydrolysant les parabènes | 11 |
| 2.3 <i>Enterobacter cloacae</i> | 13 |
| 2.4 Généralités sur les estérases | 14 |
| 2.4.1 Les estérases | 14 |
| 2.4.2 Structures et gènes conservés retrouvés chez les estérases | 15 |
| 2.4.3 Fonction catalytique | 18 |
| 2.4.4 Réactions enzymatiques catalysées par les estérases | 19 |
| 2.5 Importance industrielle des estérases | 21 |

| | Page |
|--|-------------|
| 3. Matériel et Méthodes | 23 |
| 3.1 Provenance et identification de la souche | 24 |
| 3.1.1 Extraction de l'ADN | 24 |
| 3.1.2 Amplification par PCR | 25 |
| 3.2 Production de l'enzyme | 25 |
| 3.2.1 Préparation du milieu de culture | 25 |
| 3.2.2 Réhydratation des bactéries | 26 |
| 3.2.3 Inoculation des milieux et préparation de l'échantillon de départ | 26 |
| 3.3 Purification de l'enzyme | 27 |
| 3.3.1 Séparation de l'échantillon sur une colonne cationique | 27 |
| 3.3.2 Concentration des fractions actives | 28 |
| 3.3.3 Séparation sur une colonne anionique | 29 |
| 3.3.4 Concentration et dialyse de l'échantillon | 29 |
| 3.3.5 Séparation de l'échantillon sur une colonne cationique | 30 |
| 3.3.6 Concentration des fractions actives | 30 |
| 3.3.7 Séparation de l'échantillon sur un tamis moléculaire | 30 |
| 3.3.8 Test d'activité enzymatique | 31 |
| 3.3.9 Électrophorèse en gel de polyacrylamide 12 % contenant 0.1 % de SDS | 32 |
| 3.3.9.1 Coloration au bleu de coomassie | 33 |
| 3.3.9.2 Coloration à l'argent | 34 |
| 3.3.10 Dosage de protéines (Folin-Ciocalteu) | 34 |
| 3.4 Isolement et séquençage du gène codant pour l'estérase | 35 |
| 3.4.1 Digestion de l'enzyme à la trypsine | 35 |
| 3.4.2 Purification par ZipTip | 35 |
| 3.4.3 Analyse des peptides par chromatographie liquide couplée à un spectre de masse (MS). | 36 |
| 3.4.4 Préparation d'un échantillon pour microséquençage | 37 |
| 3.4.5 Extraction plasmidique | 38 |
| 3.4.6 Amplification du gène | 39 |
| 3.4.7 Extraction de l'ADN à partir du gel d'agarose | 40 |
| 3.4.8 Ligation du produit de PCR dans un vecteur | 41 |
| 3.4.9 Transformation bactérienne par CaCl ₂ | 41 |
| 3.4.10 Repiquage des colonies | 42 |
| 3.4.11 Extraction de plasmides (MiniPrep) | 42 |
| 3.4.12 Digestion du plasmide avec EcoR1 | 43 |
| 3.4.13 Purification de l'ADN plasmidique pour le séquençage (Maxi Prep) | 43 |

| | Page |
|---|-------------|
| 3.5 Test d'inhibition avec le diisopropyl fluorophosphate | 43 |
| 4. Résultats | 45 |
| 4.1 Identification de la souche | 46 |
| 4.2 Purification de l'estérase | |
| 4.2.1 Purification de l'échantillon initial sur une colonne cationique | 46 |
| 4.2.2 Purification de la fraction active sur une colonne anionique | 48 |
| 4.2.3 Purification de la fraction active sur une colonne cationique | 48 |
| 4.2.4 Purification des fractions actives sur tamis moléculaire | 49 |
| 4.2.5 Tableau de purification | 51 |
| 4.3 Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique de l'enzyme. | 51 |
| 4.4 Essais d'isolement du gène codant pour l'estérase purifiée | 52 |
| 4.4.1 Production d'oligonucléotides dégénérés | 52 |
| 4.4.1.1 Production d'un oligonucléotide dégénéré à partir d'une séquence obtenue par spectrométrie de masse en mode nanospray | 53 |
| 4.4.1.2 Production d'un oligonucléotide à partir d'une séquence obtenue par le traitement au bromure de cyanogène | 55 |
| 4.4.2 Amplification du gène par PCR | 56 |
| 4.4.3 Clonage et séquençage du produit de PCR | 58 |
| 4.4.4 Autres conditions d'hybridation | 60 |
| 4.4.5 Nouvelles conditions de PCR | 62 |
| 4.4.6 Alignement de séquences | 64 |
| 4.5 Test d'inhibition au DFP | 64 |
| 5. Discussion | 66 |
| 5.1 Purification de l'estérase | 67 |
| 5.1.1 Purification de l'extrait initial à l'aide d'une colonne cationique | 68 |
| 5.1.2 Purification de la fraction active à l'aide d'une colonne anionique | 69 |
| 5.1.3 Purification de la fraction active à l'aide d'une colonne cationique | 71 |

| | Page |
|---|-------------|
| 5.1.4 Purification de la fraction active à l'aide d'un tamis moléculaire | 72 |
| 5.1.5 Tableau de purification | 73 |
| 5.1.6 Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique de l'enzyme | 75 |
| 5.2 Essais d'isolement du gène codant pour l'estérase | 75 |
| 5.2.1 Séquençage d'un peptide par spectrométrie de masse | 76 |
| 5.2.2 Amplification par PCR et séquençage | 78 |
| 5.2.3 Alignement de séquences | 79 |
| 5.3 Test d'inhibition au DFP | 80 |
| | |
| 6. Conclusion | 81 |
| | |
| Annexe | 84 |
| | |
| Bibliographie | 90 |

Liste des Tableaux

| | Page |
|--|-------------|
| Tableau 1 : Activité antimicrobienne des parabènes envers différents micro-organismes | 9 |
| Tableau 2 : Tableau de la solubilité de différents esters versus la CMI contre différents micro-organismes. | 10 |
| Tableau 3 : Conditions d'élution de l'enzyme sur la colonne cationique | 28 |
| Tableau 4 : Tableau de purification | 51 |

Liste des figures

| | Page |
|---|-------------|
| Figure 1 : Les esters de l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque | 8 |
| Figure 2 : Exemple du mécanisme catalytique d'une estérase | 18 |
| Figure 3 : Réaction d'hydrolyse et de synthèse (estérification) d'un composé par une estérase. | 19 |
| Figure 4 : Exemple d'alcoolise, d'acidolise et d'interestérification par une estérase. | 20 |
| Figure 5 : Exemple de lactonisation par une estérase. | 20 |
| Figure 6 : Chromatogramme des tamis moléculaires SW 300 en série. | 50 |
| Figure 7: Gel SDS-Page 12% de la protéine pure. | 50 |
| Figure 8: Gel d'isofocalisation de l'enzyme pure. | 51 |
| Figure 9 : Spectre de masse de l'enzyme digérée à la trypsine | 53 |
| Figure 10: Spectre de masse de l'ion 1086 fragmenté représentant une séquence en acides aminés de l'enzyme. | 54 |
| Figure 11 : Produits de PCR effectué à 36°C sur gel d'agarose 1 % | 57 |
| Figure 12 : Produits de PCR effectué à 30°C sur gel d'agarose 1 % | 58 |
| Figure 13: Clonage du fragment de 800 pb dans le vecteur GemPT-easy | 59 |
| Figure 14 : Produit de PCR effectué à 36°C à partir du " touch down" PCR mis sur gel d'agarose 1 %. | 61 |
| Figure 15 : Produits de PCR fait à partir d'un "touch down PCR" mis sur gel d'agarose 1 % | 63 |

Liste des abréviations

ADD : Iodoacétamide

ADN : Acide désoxyribonucléique

BSA : Bovine serum albumin

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CAPS: (3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid)

Da : Dalton

DNTP : 2'-déoxynucléoside-5'-Triphosphate

DTT : Dithiotritréitol

EDTA : ethylenediamine tetraacetate disodium salt dihydrate

FPLC : Fast pressure liquid chromatography

HPLC : High pressure liquid chromatography

KCl : Chlorure de potassium

MES : (2-[N-Morpholino]ethane sulfonic acid)

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

NaCl : Chlorure de sodium

PEG : Polyéthylèneglycol

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TEMED: N, N, N, N'-tetra-methyl-ethylenediamine

Liste des fournisseurs

Produits chimiques :

Acétate d'ammonium : A&C American chemical LTD, Toronto, Ontario
Acétate de potassium : A&C American chemical LTD
Acétonitrile : EM Science, Gibbstown, New Jersey
Acide acétique : Mallinckrodt Inc., Phillipsburg, New Jersey
Acide thioglycolique : Sigma, St-Louis, Missouri
Acide trifluoroacétique : Fischer, Fairlawn, New Jersey
Acrylamide : BioRad, Hercules, Californie
Agarose : ICN Biochemical Inc., Aurora, Ohio
Alcool isoamylique : A&C American chemical LTD
Ampicilline : ICN Biochemical Inc.
Bacto tryptone : Difco, Phillipsburg, New Jersey
Bicarbonate d'ammonium : MCBI, Northwood, Ohio
Bis-Tris : Fisher
Bleu de bromophénol : Fisher
Bleu de coomassie R-250: BioRad
 β -mercaptoéthanol : Fisher
Bromure d'éthidium : Sigma
BSA : Sigma
CAPS : Sigma
Carbonate d'ammonium : MCBI, Northwood, Ohio,
Carbonate de sodium : Fisher
Chloramphénicol : J.T. Baker Chemical co., Phillipsburg, New Jersey
Chloroforme : A&C American chemical LTD,
Chlorure de calcium : J.T. Baker Chemical co.
Chlorure de magnésium : A&C American chemical LTD,
Chlorure de potassium : : J.T. Backer Chemical co.
Dithiothréitol : Pharmacia, Philadelphie, Pensylvanie
EcoR1 : Pharmacia
EDTA : Fisher
Ethanol : Fisher
Extrait de levure : ICN Biochemical Inc.
Formaldéhyde : J.T. Baker chemical co
Guanidine•HCl : Aldrich chemical , Milwaukee, Wisconsin
Glucose : J.T. Baker chemical co.
Glycérol : OmniSolv Em Science, Toronto, Ontario
Glycine : ICN Biochemical inc
Iodoacétamine : Sigma
Isopropanol : A&C American chemical LTD
Lysosyme : Pharmacia Biotech
2-[N-Morpholino]ethane sulfonic acid (MES) : Sigma
Méthanol : OmniSolv Em Science

Milieu Davis sans dextrose : Difco
NaCl : Fishers
NaOH : J.T. Baker chemical co.
Nitrate d'argent : BioRad
RNase : ICN biomedical inc
Persulfate d'ammonium : BioRad
Phénol : EM Science
Phosphate de sodium : J.T. Baker chemical co.
Propyle parabène : Sigma
Sodium dodecyl sulfate: BioRad
Solution de Folin : Fischer
Sulfate de cuivre : J.T. Baker chemical co.
Tartrate de sodium : J.T. Baker chemical co.
TEMED : BioRad
Thiosulfate de sodium : J.T. Baker chemical co.
Tris base : Sigma
Tris HCl : Sigma
ToPA : Pharmacia

Liste des appareils et fournitures :

Cellule à pile agitatrice : Amicon, Beverly, Californie
Centrifugeuse : Beckman, modèle JLA 10.500
Évaporateur rotatif : Speed vac, Savant instrument Inc, Holdbrooke, New York
FPLC : Beckman, modèle 112, Fullertown, Californie
HPLC : Modèle 650, Waters Millipore, Bedford, Massachusetts
Membrane PVDF : BioRad
Membrane de type oméga 3K : Filtron, Northborough, Massachusetts
Membrane à dialyse : Snakeskin 3500 mwco, Pierce, Rodford
Mini-transblot : BioRad
PCR : DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer
Presse de French : American instrument compagny, Baltimore, Maryland
Spectrophotomètre : Milton Roy spectronic 1001 plus, Beckman
Système miniprotean : BioRad
Système Macrosep : Filtron
Zip Tips : Millipore

Introduction

1.0 Introduction

Les parabènes sont des esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Lors de leur découverte dans les années 1920, on leur attribuait des propriétés fongistatiques. Ils furent utilisés pour combattre les levures et les moisissures contre lesquels ils sont très efficaces. Maintenant, ils servent également à la prévention de la croissance bactérienne. Ces agents de conservation sont largement utilisés pour stabiliser des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Dans la littérature, des cas résistance bactérienne aux parabènes ont été rapportés. Cette résistance fut observée surtout dans des produits alimentaires et pharmaceutiques entraînant ainsi des pertes économiques importantes. Il devient donc important d'étudier le ou les mécanismes de résistance de ces micro-organismes face aux parabènes.

Il y a quelques années une souche d'*Enterobacter cloacae* (EM) et deux souches d'*Enterobacter gergoviae*, une lisse (GML) et l'autre rugueuse (GMR), ont été isolées à partir d'un supplément alimentaire qui contenait du méthyle et du propyle parabène comme agent de conservation. Des études furent entreprises afin de déterminer quel était le ou les mécanismes de résistance de ces souches afin de mettre au point un système de conservation efficace (Valéanu, 1993).

Pour ce faire, les conditions optimales de croissances des différentes souches furent déterminées. De plus, une étude de la résistance face à différents antibiotiques (pénicilline, chloramphénicol, ampicilline, streptomycine, érythromycine, tétracycline) a été entreprise avec les souches résistantes et des souches sensibles

comme témoin. Les résultats ont démontré qu'il y aurait une corrélation entre la résistance aux parabènes et à l'ampicilline puisque toutes les souches résistantes aux parabènes le sont également à l'ampicilline.

Plusieurs études ont démontré qu'il y aurait une corrélation entre le contenu et la nature des lipopolysaccharides, des lipides et des acides gras contenus dans la paroi et la membrane cellulaire et la résistance bactérienne. Les bactéries développeraient ainsi une résistance en modifiant leur perméabilité membranaire (Keweloh *et al*, 1991 ; Komagata et Suzuki, 1987 ; Nikaido et Vaara, 1985 ; Russell, 1989 ; Tusuchido et Takano, 1988). Une étude sur les acides gras totaux des souches d'*Enterobacter gergoviae* a été entreprise afin de déterminer s'il y a corrélation entre des modifications du profil des acides gras et la résistance aux parabènes. Les résultats indiquent que les souches résistantes aux parabènes contiennent beaucoup plus d'acides gras saturés que la souche sensible. Dans la littérature (Keweloh *et al*, 1991, Nikaido et Vaara, 1985) on considère généralement qu'une augmentation des acides gras saturés entraîne une augmentation de la rigidité membranaire causant une diminution de la perméabilité aux petites molécules hydrophobes comme les parabènes.

D'autre part, il a été observé que la souche d'*Enterobacter cloacae* (EM) possède une activité estérasique lui permettant d'hydrolyser les parabènes. Des essais effectués par HPLC ont démontré la disparition des parabènes et l'apparition du produit d'hydrolyse (l'acide *p*-hydroxybenzoïque). Des tentatives de purification de l'enzyme ont été débutées sans toutefois avoir été complétées. La présence d'un plasmide de haut poids moléculaire a également été mis en évidence chez la souche EM. Une hypothèse a été émise à l'effet que ce plasmide pourrait être à l'origine de la résistance de cette souche aux parabènes.

Un des objectifs de ce travail est de purifier l'estérase produite par *Enterobacter cloacae* souche EM. La purification sera effectuée à l'aide de diverses colonnes chromatographiques (échangeuses d'ions et de filtration sur gel). Dans un deuxième temps, les travaux de séquençage de l'enzyme seront entrepris. Pour ce faire, l'enzyme sera digérée à l'aide de la trypsine et les peptides seront séquençés par spectrométrie de masse. Ensuite, des oligonucléotides seront produits à partir de la séquence N-terminale de l'enzyme et d'une séquence peptidique obtenue en spectrométrie de masse. Puis, une amplification par PCR dans différentes conditions sera tentée. Les produits de PCR d'intérêts seront clonés et séquençés. Une analyse dans les banques de données sera ensuite effectuée afin de déterminer si l'estérase de la présente étude possède une certaine homologie avec une estérase déjà connue.

Revue de la littérature

2.0 Revue de la littérature

2.1 Méthodes de conservation des produits périssables

Il existe plusieurs méthodes de conservation qui visent à prévenir la croissance de micro-organismes dans les produits de consommation périssables. Ces méthodes peuvent être physiques, chimiques, enzymatiques ou microbiologiques (Huis in't Veld, 1996). La majorité des techniques de conservation agissent par la prévention ou par l'inhibition de la croissance microbienne comme dans le cas de la congélation, la lyophilisation, l'atmosphère contrôlée, l'acidification, la fermentation, l'ajout d'additifs (ex : acide benzoïque, l'acide acétique, la vitamine C) etc. D'autre part, un petit nombre de techniques agissent par inactivation des micro-organismes comme dans le cas de la pasteurisation, la stérilisation et l'irradiation. Les nouvelles techniques tendent à prendre une approche plus « naturelle » comme par l'ajout d'enzymes bactériostatiques, l'électroporation qui consiste à détruire la paroi cellulaire des bactéries à l'aide d'un courant électrique et l'ultra haute pression. (Gould, 1996).

Bien que de nouvelles techniques soient mises au point, les méthodes chimiques et physiques sont celles qui sont les plus souvent utilisées sur le marché. Dans la majorité des cas, ces méthodes sont utilisées en combinaison pour optimiser les résultats et il n'est pas rare de retrouver plusieurs additifs dans un même produit (Roberts, 1989).

2.2 Les parabènes

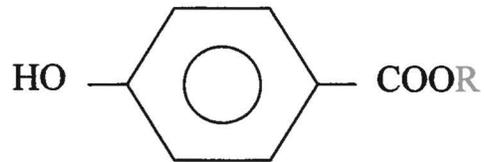
Parmi les différents agents de conservation chimiques, il y a les esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, plus communément appelés parabènes. Leur utilisation remonte à 1924 lorsque les premiers rapports sur leur activité antibactérienne et antifongique furent publiés par Sabalitschka (Sabalitchka, 1924). Leur reconnaissance officielle

furent publiés par Sabalitschka (Sabalitchka, 1924). Leur reconnaissance officielle comme agents de conservation débuta en 1934 avec l'inclusion du méthyle parabène dans la cinquième édition de la *Swiss Pharmacopiea* (Haag et Loccini, 1988).

On retrouve les parabènes dans une vaste gamme de produits. Ils servent d'agent de conservation pour les aliments tels que la margarine, des préparations aux fruits, des boissons non alcoolisées et des confiseries. On les retrouve également dans des fromages pour la prévention des moisissures (Oka, 1964). De plus, ils constituent un des plus importants agents antimicrobiens pour des produits pharmaceutiques tels que des gouttes ophtalmiques, des gouttes nasales, des solutions de vitamines C, des crèmes médicamenteuses, des solutions antibiotiques, etc.... (Gottfried, 1962). Des études ont également démontré que les parabènes avaient un potentiel thérapeutique quant à la prévention et à la guérison de mycoses (Aalto *et al.* 1953). Mais de nos jours, ils sont essentiellement utilisés dans les cosmétiques tels que les shampooings, les crèmes, les lotions, les huiles, les gelées, les cires épilatoires, etc.... (Russell *et al.* 1967).

2.2.1 Propriétés physiques et chimiques

L'utilisation massive des parabènes par diverses industries est liée à leur coût peu élevé et à leur large spectre d'activité contre divers micro-organismes (bactéries, moisissures et champignons). De plus, ils possèdent plusieurs qualités physiques et chimiques attrayantes pour un bon agent de conservation; ils sont inodores, incolores, insipides, non toxiques, non volatiles, très stables et leur activité antimicrobienne est maintenue sur un large spectre de pH et de température. Ils sont également compatibles avec une grande variété de drogues, de composés chimiques et de divers mélanges utilisés industriellement (Aalto *et al.* 1953). Les parabènes les plus utilisés industriellement sont le méthyle, l'éthyle, le propyle, et le butyle parabène (Figure 1).



R = CH₃ : Méthyle

R = C₂H₅ : Éthyle

R = C₃H₇ : Propyle

R = C₄H₉ : Butyle

Figure 1 : Les esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque

2.2.2 Activité antimicrobienne

Pour les parabènes, la concentration minimale inhibitrice requise varie selon chaque ester et selon le microorganisme visé (Tableau 1). En général, les parabènes sont plus actifs vis-à-vis les champignons et les moisissures qu'envers les bactéries. Ils sont également plus efficaces envers les bactéries Gram positives qu'envers les bactéries Gram négatives (Aalto *et al.* 1953).

| Micro-organisme (CMI* PPM) | Méthyle | Éthyle | Propyle | Butyle |
|--------------------------------|---------|--------|---------|--------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 2000 | 1000 | 500 | 250 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2000 | 1000 | 500 | 125 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2000 | 1000 | 500 | 500 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1000 | 500 | 500 | 250 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 1000 | 1000 | 500 | 500 |
| <i>Candida albicans</i> | 1000 | 500 | 250 | 125 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 1000 | 500 | 250 | 125 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 1000 | 500 | 250 | 125 |

* Concentration minimale inhibitrice

Tableau 1 : Activité antimicrobienne des parabènes envers différents micro-organismes (Haag et Locrini, 1988).

L'efficacité antimicrobienne des parabènes augmente avec la longueur de la chaîne alkyle (Tableau 2). Des études ont démontré que l'ester benzylique possède une très grande activité envers plusieurs micro-organismes (Wilson et Gisvold. 1956). Bien que les esters à longue chaîne soient plus efficaces, ce sont ceux à plus courte chaîne qui sont utilisés industriellement. Les esters à longue chaîne sont peu utilisés à cause de leur faible solubilité en milieux aqueux et de leur toxicité plus élevée. Le problème de l'efficacité versus la solubilité en milieu aqueux fut résolu par l'utilisation conjointe de deux esters ou plus dans différentes formulations. La combinaison la plus fréquemment retrouvée est le méthyle et le propyle parabène. Il en résulte un effet additif de l'efficacité de ces deux produits, ce qui amène une diminution de la concentration de parabènes nécessaire pour inhiber la croissance de micro-organismes (Gilliland *et al.* 1978).

| Esters | Méthyle | Éthyle | Propyle | Butyle | Benzyle |
|--------------------------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| Solubilité % (eau 25°C) | 0.25 | 0.17 | 0.05 | 0.02 | 0.006 |
| Concentration minimale inhibitrice % | 0.05-0.2 | 0.02-0.1 | 0.01-0.08 | 0.01-0.1 | 0.01-0.1 |

Tableau 2 : Tableau de la solubilité de différents esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque versus la CMI contre différents micro-organismes (Wilson et Gisvold. 1956).

2.2.3 Mécanisme d'action

Le mode d'action des parabènes n'est pas encore totalement connu, mais on leur attribue de multiples effets biologiques. Des études ont démontré qu'en général l'effet antimicrobien des parabènes est causé par une inhibition des transports au niveau de la membrane cellulaire (Freese et Levin. 1978, Eklund. 1980). Il semblerait qu'il y ait relargage du cytosol sans qu'il y ait eu une lyse de la membrane cellulaire. Ceci indique une perturbation au niveau de la structure de la membrane par les parabènes (Furr et Russel. 1972). Une étude faite par Ingolf et Eklund (1983) avec *E. coli* et *Bacillus subtilis* a démontré que les parabènes inhibent la synthèse d'ARN et d'ADN. Mais, dans une autre étude, il fut également observé que la concentration nécessaire pour inhiber la synthèse d'acides nucléiques est approximativement le double de la concentration nécessaire pour avoir un taux équivalent d'inhibition de la croissance bactérienne (Aalto *et al.* 1953). Certains chercheurs ont proposé que l'activité bactériostatique des parabènes puisse être due à une inactivation enzymatique, sans jamais pour autant l'avoir démontré (Shiralkar et Rege. 1978). Une étude récente a démontré que les parabènes inhibent de manière irréversible la glycolyse chez la bactérie *Streptococcus mutans* qui cause la carie dentaire (Ma et Marquis. 1996).

2.2.4 Résistance aux parabènes

Bien que les parabènes soient des agents de conservation grandement utilisés commercialement, plusieurs cas de résistance ont été rapportés dans la littérature. Les problèmes reliés à la résistance des micro-organismes face aux agents de conservation sont de plus en plus inquiétants. Dans le domaine médical on observe une résistance accrue face aux antibiotiques, ce qui complique les traitements et oblige les médecins à trouver des traitements alternatifs qui ne sont pas toujours disponibles. Dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique des lots entiers de produits contaminés doivent être détruits, entraînant ainsi des pertes économiques considérables.

Bien que les normes de qualité sur les biens de consommations soient de plus en plus sévères, il est possible que des produits préservés avec des parabènes puissent être contaminés par des micro-organismes résistants et se retrouver sur le marché, ce qui pourrait entraîner un réel danger pour la santé et le bien-être des consommateurs.

2.2.5 Micro-organismes hydrolysant les parabènes

Dans la littérature on rapporte un nombre considérable de bactéries résistantes à des fortes concentrations de parabènes, mais seulement un petit nombre d'entre elles est capable de le dégrader et de l'utiliser comme source de carbone. Une étude faite par Zedan et ses collaborateurs (1982 a,b) rapporte que 120 contaminants bactériens ont été isolés de produits pharmaceutiques ayant comme agent de conservation une combinaison de propyle et de méthyle parabène. De ce nombre, seulement 25 ont été capables de croître en milieu minimal salin ne contenant que des parabènes comme

source de carbone. La plupart de ces bactéries étaient membres du genre *Pseudomonas*.

En 1990, des chercheurs ont isolé à partir d'une solution de chlorure de benzalkonium 10 %, une souche bactérienne qui fut identifiée comme étant *Pseudomonas cepacia* (Suemitsu *et al.* 1990). Le chlorure de benzalkonium est utilisé fréquemment comme antiseptique dans diverses formulations. Ils ont démontré que cette souche était résistante non seulement au chlorure de benzalkonium, mais qu'elle était également capable de croître en milieu salin contenant du parabène comme unique source de carbone. Ces tests ont montré que le méthyle, l'éthyle, le n-propyle et le n-butyle parabène, individuellement, à une concentration de 100 ppm, ont été complètement dégradés après trois semaines d'incubation avec cette bactérie. Après deux semaines d'incubation, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, qui est le produit d'hydrolyse du lien C-O de tous les parabènes a été observé, de même que du méthyle parabène, produit par l'hydrolyse du lien C-C de certains parabènes.

Une étude faite par Sokolski et collaborateurs (1962) met en évidence l'hydrolyse du méthyle parabène par la moisissure *Clasporidium resinae*. Ce contaminant a été isolé à partir d'un produit pharmaceutique contenant de la pectine supplémentée de 0.2 % de méthyle parabène comme agent de conservation. Des tests ont été effectués avec 5 mL d'une solution stérile de méthyle parabène à 0.2 %, à laquelle a été ajouté 1 mL d'un inoculum de *Clasporidium resinae* en milieu de culture Sabourraud préalablement incubé 48 heures avec agitation. Après 5 jours d'incubation à 25°C, 70% du méthyle parabène a été hydrolysé. Des tests fait par chromatographie sur papier ont révélé l'apparition de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Ce résultat a confirmé l'hydrolyse du méthyle parabène grâce une enzyme du type estérase produite par la moisissure.

On retrouve donc un nombre considérable de micro-organismes qui ont la propriété de dégrader les parabènes. Mais à une exception près, aucune enzyme du type estérase capable d'hydrolyser les parabènes n'a été isolée. En 1971, Child et ses collaborateurs ont réussi à isoler et caractériser une estérase produite par *Aspergillus flavus*. Ils ont déterminé le point isoélectrique de l'enzyme (4.45), son poids moléculaire (166 000 Da), son contenu en hydrate de carbone (42.8%) et sa composition en acides aminés. Ils ont étudié le spectre d'activité de cette enzyme extracellulaire vis-à-vis les esters phénoliques de divers acides carboxyliques aromatiques apparentés aux tannins. Lors de cette caractérisation, ils ont mis l'enzyme en présence d'autres substrats dont divers esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, notamment le méthyle et l'éthyle parabène. Les résultats ont révélé que l'enzyme avait la capacité de dégrader ces deux derniers composés.

2.3 *Enterobacter cloacae*

Une souche d'*Enterobacter cloacae* (EM) a été isolée à partir d'un supplément alimentaire qui contenait, comme agent de conservation, un mélange de propyle et de méthyle parabène. Cette bactérie a été étudiée à l'Institut Armand-Frappier par une étudiante, Mme Lorédanna Valéanu. Son projet de maîtrise avait, entre autres, pour objectif de comprendre le ou les mécanismes impliqués dans la résistance aux parabènes chez cette souche en vue de développer un système de stabilisation pleinement efficace (Valéanu, 1993).

Lors des travaux de caractérisation de la souche, la température optimale de croissance fut déterminée par spectrophotométrie (650 nm). Trois températures furent étudiées, soit 22, 30 et 37°C. La température optimale de croissance est 30°C. Il a également été démontré que cette souche d'*E. cloacae* (EM) produisait une ou des enzymes de type estérase qui hydrolysait les parabènes. La mise en évidence de cette activité

enzymatique a été effectuée à l'aide d'un pétri contenant du parabène cristallisé dans de l'agar. Le surnageant d'une culture jeune de bactérie (100 μ L) a été placé dans un puits pratiqué dans la gélose et celle-ci a été incubée toute la nuit à 30°C. Une zone de lyse nettement définie a été observée. Par la suite, des expériences furent effectuées avec des cultures bactériennes liquides contenant des parabènes. L'analyse de ces cultures par HPLC a démontré que la disparition des parabènes était concomitante avec l'apparition de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, lequel était ensuite dégradé par la bactérie. Ceci, de même que la nature thermosensible de cette activité, a prouvé l'existence d'un système enzymatique capable de couper le lien ester des parabènes.

Une simple extraction plasmidique a permis de mettre en évidence la présence d'un plasmide de haut poids moléculaire chez la souche d'*E. cloacae* (EM), plasmide que l'on ne retrouve pas dans la souche sensible. Une hypothèse a été émise selon laquelle ce plasmide pourrait être à l'origine de la résistance aux parabènes.

2.4 Généralités sur les estérases

2.4.1 Les estérases

Les estérases sont des enzymes de type hydrolases qui ont pour rôle de couper les liens esters de différents substrats (Tsujita *et al*, 1990). Il existe plusieurs caractéristiques spécifiques aux estérases ont été mises en évidence. Premièrement, il fut démontré que les estérases hydrolyse préférentiellement les liens esters des acides gras à courte chaîne (C₂ à C₈) (Wills, 1965). Deuxièmement, Sarda et Desnuelle (1958) ont observé que les estérases démontraient une activité beaucoup plus élevée envers des substrats solubles. En effet, les estérases ont une activité maximale envers les substrats non saturés en solution aqueuse et leur activité n'est pas influencée par la présence d'une interface. Les estérases sont actives uniquement envers des substrats solubles.

Troisièmement, des tests d'activité enzymatique ont démontré que les estérases répondent à une cinétique classique de Michaelis-Menten, c'est-à-dire que l'activité enzymatique augmente en fonction de l'augmentation de la quantité de substrat (Venger et de Haas, 1973).

2.4.2 Structure et gènes conservés retrouvés chez les estérases

Les estérases sont des enzymes ubiquitaires qui ont été retrouvées autant chez des eucaryotes, des eubactéries, que chez des archaeobactéries. Des similarités structurelles furent identifiées. Une étude effectuée par Cygler et ses collaborateurs (1993) superpose la structure de l'acétylcholinestérase produite par *Torpedo californica* (TcAChE) et de la lipase produite par *Geotrichum candidum* (GCL) et les compare à un alignement de séquence en acides aminés de 32 autres enzymes appartenant à d'autres estérases, lipases ou protéines apparentées. Basé sur cet alignement, 24 acides aminés furent conservés invariablement et 49 autres furent hautement conservés. Les structures conservées sont le site actif, les ponts disulfures, les ponts salins ainsi que des acides aminés retrouvés dans le centre hydrophobe de la protéine. Des études antérieures (Slabas *et al.* 1990; Schrag *et al.* 1991) ont démontré que les sites homologues sont plus souvent observés dans la partie N-terminale que dans la partie C-terminale de l'enzyme.

Lors de l'alignement de séquence, on remarque que dans 29 enzymes étudiées, on retrouve 24 acides aminés invariablement conservés et 21 de ceux-ci se retrouvaient dans la partie N-terminale de la protéine. La majorité des acides aminés hautement conservés se retrouvent au niveau du centre hydrophobe de la protéine et plus précisément au niveau des feuillets β . La plupart le sont entre les feuillets $\beta 1$ et $\beta 7$ inclusivement. Par contre, les acides aminés formant les hélices α sont généralement moins bien conservés.

Les protéines du site catalytique furent clairement identifiées lors de l'alignement en trois dimensions des séquences enzymatiques qui étaient composées de la triade Ser-His-Glu. Cette triade est hautement conservée sauf dans le cas d'estérases hydrolysant le cholestérol et dans le cas de carboxyestérases provenant de l'espèce *Drosophila* où l'acide glutamique est remplacé par l'acide aspartique. Le rôle important que joue cette triade dans la fonction catalytique a été déterminé par diverses expérimentations qui consistaient à effectuer diverses mutations à ce site (DiPersio *et al.* 1990,1991; Gibney *et al.* 1990; Haruki *et al.* 1999). Les mutations induisaient une baisse drastique et voire même une inhibition complète de l'activité enzymatique, ce qui venait confirmer le rôle primordial de ce site dans la catalyse. Le site actif fait également partie d'une séquence hautement conservée : Gly-Glu(His)-Ser-Ala-Gly-Ala/Gly. Cette séquence et plus particulièrement le motif Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly, fut également retrouvé dans plusieurs autres enzymes contenant la triade catalytique (Bernner, 1988). Une étude réalisée par Ollis et ses collaborateurs (1992) a démontré que la structure tertiaire du site d'hydrolyse de la majorité des estérases étudiées est composée d'un motif α/β . La sérine active (ou le peptide qui joue un rôle analogue) est positionnée dans l'angle de torsion entre le feuillet β et l'hélice α . Il en résulte une bonne exposition du groupement hydroxyle de la sérine et également rend plus accessible l'histidine du site catalytique au substrat. L'acide aminé qui précède la triade catalytique, est généralement le glutamate dans le cas des familles de protéines appartenant aux lipases/estérases, ce qui suggère qu'il joue un rôle important dans la catalyse. Cette seconde chaîne acide (Asp/Glu) dans le centre de la protéine vue en 3 dimensions est hautement conservée. Aucun rôle défini ne lui a été attribué, mais certains auteurs (Schrag *et al.* 1991; Sussman *et al.* 1991) ont suggéré que cette chaîne pourrait avoir un rôle dans la coordination de la molécule d'eau qui est essentielle à l'hydrolyse du substrat.

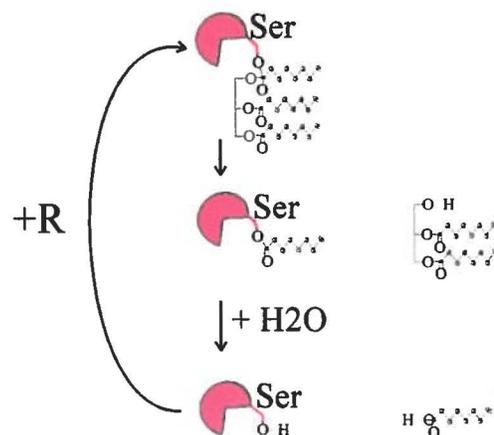
Il a été démontré que la structure en 3 dimensions de TcAChE et de GCL contient quatre ponts salins et deux ponts disulfures qui sont conservés. Les ponts salins jouent un rôle essentiel dans la préservation du maintien des boucles qui composent la structure du site actif. Les ponts disulfures situés à la partie N-terminale de la protéine sont d'avantage important dans le maintien conformationnel des deux boucles dont l'une fut clairement identifiée comme étant un site de liaison du substrat.

La majorité des estérases possèdent une certaine homologie de structure. Mais, dans de rares cas, il peut y avoir des différences par rapport aux structures généralement rencontrées. La structure cristallisée de l'estérase produite par *Streptomyces scabies* fut le premier exemple d'une enzyme possédant la diade Ser-His à son site catalytique (Wei *et al.* 1995).

Récemment, une nouvelle bactérie affiliée à l'espèce des *Alcaligenes* fut isolée à partir d'un échantillon de sol et a été identifiée comme membre de la sous-classe des *Protéobactéries* β (Bourne *et al.* 2000). Cette bactérie produit une estérase qui n'a démontré aucune homologie significative avec d'autres protéines connues. Cette nouvelle enzyme ne possède pas la séquence Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly du site catalytique des estérases. Le site catalytique de cette nouvelle enzyme est composé du motif α/β habituellement retrouvé chez ce type d'enzyme (Ollis *et al.* 1992) et la triade peptidique fut identifiée comme étant His-Ser-Glu. Cette nouvelle enzyme possède également deux ponts disulfures et 5 ponts salins, aucun d'entre eux ne correspond aux ponts conservés retrouvés par Cygler et ses collaborateurs(1993).

2.4.3 Fonction catalytique

Le site actif des estérases est très similaire à celui que l'on retrouve chez la sérine protéase qui est composé de la triade des acides aminés sérine (Ser), histidine (His) et aspartate (Asp). Cette séquence consensus retrouvée à l'extrémité C-terminale est hautement conservée chez ces enzymes et constitue la clef de la catalyse. Bien que cette séquence soit chimiquement identique à la sérine protéinase qui fut décrite pour la première fois en 1969 par Blow et ses collaborateurs, elle est différente au point de vue structurelle. Une certaine distance géographique entre les acides aminés est maintenue, la localisation mutuelle de la sérine et de l'aspartate est en conformité avec celle de l'histidine qui est interchangée. La sérine nucléophile est à la base du mécanisme d'hydrolyse des tryglycérides par l'enzyme. L'oxygène nucléophile de la sérine active va venir former un intermédiaire hémiacétale tétrahédrique avec le triacyl glycéride. Le lien ester est alors hydrolysé et le diacyl glycéride sera relâché. Le site actif de la sérine est réactivé grâce à une molécule d'eau. L'enzyme réactivée pourra hydrolyser l'intermédiaire libéré (diacyl glycéride ou monoacyl glycéride) jusqu'à ce qu'il y ait dissociation complète des acides gras de la molécule de glycérol (voir figure2) (Winkler et Gubernator, 1994).



R = Triacylglycérol, diacylglycérol ou monoacylglycérol.

Figure 2 : Exemple du mécanisme catalytique d'une estérase.

Le relâchement de l'acide gras par la sérine active est d'une capitale importance dans le processus de la catalyse. Dans le cas où le lien entre l'acide gras et le site actif serait trop solide, il peut y avoir inhibition de l'enzyme.

2.4.4 Réactions enzymatiques catalysées par les estérases.

De nombreuses réactions enzymatiques peuvent être catalysées par les estérases en fonction des substrats utilisés. En milieu aqueux, la réaction enzymatique tend vers l'hydrolyse des acides gras et il est possible d'obtenir des glycérides de longueurs variables. Par contre, en milieu organique la réaction tend vers l'estérification, soit la synthèse d'un nouveau composé (voir figure 3).

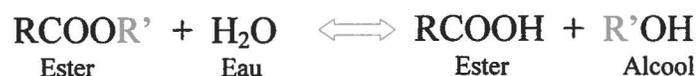


Figure 3: Réaction d'hydrolyse et de synthèse (estérification) d'un composé par une lipase/estérase.

Les réactions de transestérification sont également possibles. Ces réactions visent essentiellement à obtenir des composés à chaînes latérales plus longues. Parmi les réactions de transestérification il y a l'alcoolise où il y a libération d'un ester et d'un alcool, l'acidolise où la réaction engendre la libération d'un ester et d'un acide et l'interestérification où il y a échange de radicaux entre deux esters ce qui conduit à la formation de nouveaux esters (voir figure 4).

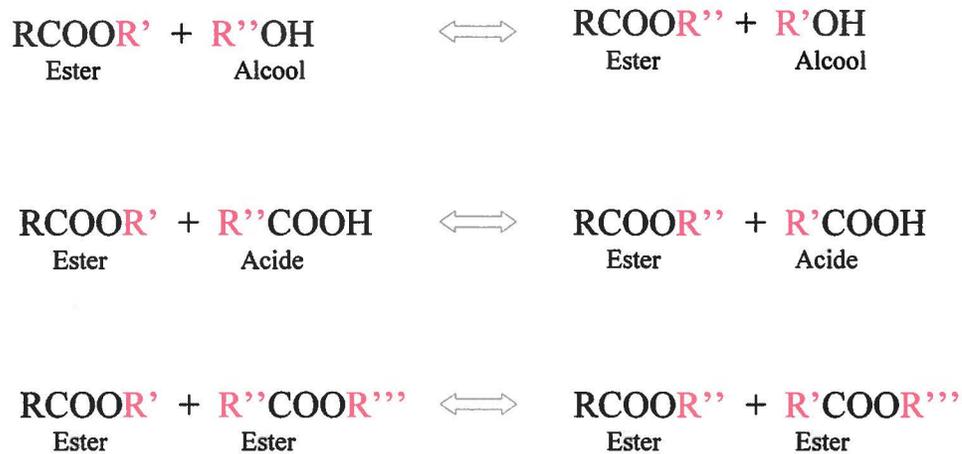


Figure 4 : Exemple d'alcoolise, d'acidolise et d'interstérification par une estérase.

Les estérases ont aussi la propriété de pouvoir faire de l'estérification intramoléculaire ou lactonization. Cette réaction conduit à la formation d'un lactone (voir figure 5).

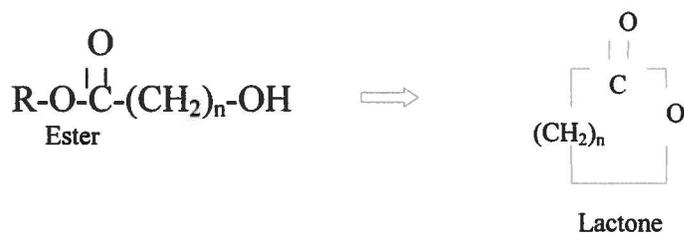


Figure 5 : Exemple de lactonisation par une lipase/estérase.

2.5 Importance industrielle des estérases.

De nos jours, il y a une montée fulgurante dans la recherche de nouveaux processus biotechnologiques visant à faire la synthèse de composés. Les enzymes sont au cœur même de cette technologie. La synthèse biologique de composés apporte une alternative aux processus chimiques déjà existants sur le marché. Les récents développements technologiques dans le domaine analytique tel que le HPLC, GC et la spectrométrie de masse sont présentement des outils indispensables pour l'analyse des composés. Ils ont grandement aidé à faire avancer les recherches plus rapidement dans le domaine.

La synthèse de composés par des processus biotechnologiques est retrouvée dans des domaines diversifiés de l'industrie. Par exemple, la synthèse de composés d'arômes par ces processus est en développement croissant dans l'industrie de l'alimentation. Les produits issus par ces méthodes sont considérés comme des produits naturels par les réglementations. La vente de composés d'arômes est estimée à 675 millions \$ US en 1991 et les fonds attribués à la recherche sont estimés à 376 millions \$ US dans la communauté européenne (Cheetham, 1991). La majorité des compagnies qui produisent des arômes ont mis en place un programme de recherche pour le développement d'un processus de production biotechnologique de leurs composés (Dziezak, 1986).

Les compagnies sont grandement influencées par les consommateurs qui tiennent compte davantage des caractéristiques nutritionnelles de leur alimentation et plus particulièrement, des additifs utilisés par les industries alimentaires. Cette tendance a été démontée par l'accroissement sur le marché des produits industriels faibles en gras, en sodium, en caféine ou en cholestérol et également par le remplacement du sucre

par l'aspartame. Le consommateur d'aujourd'hui recherche des produits qui contiennent des colorants, des saveurs et des agents de conservation d'origines naturelles en remplacement des additifs de synthèse chimique.

Matériel et Méthodes

3.0 Matériel et Méthodes

3.1 Provenance et identification de la souche

La souche *Enterobacter cloacae* (EM) a été isolée à partir d'un supplément alimentaire contaminé (Valeanu, 1993). L'identification de la souche fut confirmée à l'aide de la galerie A.P.I. et par le séquençage de l'ARN 16 S.

3.1.1 Extraction de l'ADN

Pour l'extraction de l'ADN, 1 mL de culture liquide a été prélevé et centrifugé 2 minutes à 16 250 g. Ensuite, 250 mg de billes de verres ont été ajoutées et les bactéries furent resuspendues dans 1 mL de tampon TEN [(50-20-150); 50 mM de Tris, 20 mM EDTA et 150 mM NaCl]. Cette suspension fut broyée pendant 5 minutes et centrifugée 15 minutes à 16 250 g. Après la centrifugation, le surnageant a été récolté et une extraction phénol/chloroforme/ alcool isoamylique [(50 :49 :1) (50/50)] a été effectuée. Le mélange fut centrifugé 10 minutes à 16 250 g. Par la suite, une extraction phénol/ alcool (24 :1) dans une proportion 50/50 (eau) fut faite et la suspension centrifugée 2 minutes à 16 250 g. Suite à l'extraction, une précipitation à l'acétate d'ammonium 10 M (ajout équivalent à 1/3 du volume) a été effectuée. Le mélange fut mis sur la glace 20 minutes, puis centrifugé 15 minutes à 16 250 g. Ensuite, 2 volumes d'éthanol 95 % ont été ajoutés au surnageant et le mélange incubé 15 minutes à -20°C. Puis, la suspension a été centrifugée 15 minutes (16 250 g) et le culot resuspendu dans 50 µL d'eau.

3.1.2 Amplification par PCR

Une amplification par PCR avec les amorces universelles du gène 16 S a été faite avec l'ADN de la souche. Un mélange servant au PCR a été préparé avec les réactifs de Pharmacia Biotech (USA). Il était composé de 83 μL d'eau, 10 μL de tampon Taq polymérase, 2 μL d'amorce pA et 2 μL d'amorce pH, 2 μL de dntp et 1 μL d'enzyme Taq polymérase. Les conditions de PCR utilisées furent les suivantes :

80°C, 2 min ; 94°C, 5min; 1 cycle

72°C, 1 min, 94°C, 40 sec; (36°C), 1 min; 30 cycles

72°C, 10 min

3.2 Production de l'enzyme

3.2.1 Préparation du milieu de culture

Dans le but de faire la production à grande échelle de la bactérie, 10 litres de milieu minimal de Davis contenant 3 % de glucose (p/v) ont été préparés de la façon suivante : 106 g de milieu minimal de Davis sans dextrose ont été pesés et le volume a été complété à 10 L avec de l'eau osmose inverse. Ensuite, le milieu fut transféré dans 10 erlenmeyers de 2 litres à raison de 880 ml par erlenmeyer et le pH ajusté à 8.0 avec du NaOH 3.0 N. L'utilisation d'erlenmeyers de 2 litres est nécessaire afin d'éviter les éclaboussures lors de la stérilisation et de l'agitation des milieux. En même temps, 1.5 litres d'une solution glucose 25% (p/v) ont été préparés. Les milieux de culture ainsi

que la solution de glucose ont été stérilisés à l'autoclave. Le glucose n'est pas directement ajouté au milieu Davis avant stérilisation car il y a caramélisation du milieu lors de la stérilisation. Ces milieux peuvent être gardés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

3.2.2 Réhydratation des bactéries

L'inoculum a été obtenu à partir d'une ampoule contenant la souche lyophilisée d'*E. cloacae* (EM) résistante aux parabènes. Après vérification de l'étanchéité de l'ampoule, les bactéries ont été réhydratées dans 100 ml de milieu minimal de Davis contenant 3 % de glucose stérile à l'aide d'une pipette pasteur. La suspension a été incubée à la température de la pièce pendant 24 heures sans agitation.

3.2.3 Inoculation des milieux et préparation de l'échantillon de départ

Lors de l'inoculation des milieux de culture, 120 mL de la solution glucose 25 % est ajouté au 880 mL de milieu minimal de Davis contenu dans chaque erlenmeyer afin d'ajuster la concentration de glucose à 3 %. Ensuite, 10 mL de l'inoculum de départ ont été ajoutés dans chaque milieu. Les milieux ont ensuite été incubés à 34 °C, avec agitation (240 rpm), pour une période de 24 heures.

Après 24 heures d'incubation, la densité optique du milieu a été mesurée à une longueur d'onde de 650 nm afin d'évaluer la croissance bactérienne. Les milieux ont été centrifugés 30 minutes (18 480 g), à 4°C. Les bactéries ont été resuspendues dans environ 80 mL de tampon MES à 20mM (pH 6.0) et mises sur la glace et ont subit 3

passages à la presse de French à une pression de 12 000 psi. Cette étape a pour but de casser les bactéries afin de libérer l'enzyme.

Afin de pouvoir récolter l'enzyme, le milieu a été centrifugé une première fois 30 minutes à 39 190 g à 4°C. Le surnageant a été récolté et ultracentrifugé à 145 000 g pour une durée de 90 minutes à 4°C afin d'éliminer tous les débris cellulaires. Le surnageant dépourvu de tout débris cellulaires fut dialysé toute la nuit dans 4 litres de tampon MES/NaOH à 0.5 mM. Le lendemain, l'échantillon a été filtré 3 fois (2.0 µm, 1.0 µm et 0.22 µm) et le filtrat constitue l'échantillon de départ pour la purification.

3.3 Purification de l'enzyme

3.3.1 Séparation de l'échantillon sur une colonne cationique

La première étape de purification a été effectuée à l'aide d'une colonne cationique (CM Sépharose AP-2, 2 cm ID X 20 cm, Waters), couplée à un FPLC. Cette colonne était composée d'une matrice carboxyméthyle échangeuse faible de cations. La colonne a été lavée avec le tampon MES/ NaOH 20mM + 1M de NaCl (pH 6.0). Cinq à dix volumes de colonne ont été élués à un débit de 4 mL/min. La colonne fut ensuite équilibrée avec le tampon MES/NaOH à 20 mM (pH 6.0). Suite à l'équilibration, l'échantillon (240 ml) a été adsorbé sur la colonne à un débit de 4 mL/min. L'étape d'adsorption a eu lieu jusqu'à ce que le signal UV revienne à la ligne de base.

Après l'adsorption de l'échantillon, différentes conditions d'éluion ont été tentées. La première condition fut l'éluion des protéines à l'aide d'un gradient linéaire croissant

de NaCl de 0 à 1.0 M en 90 minutes (tampon MES/NaOH à 20 mM + NaCl 1M) . Les fractions ont été récoltées à toutes les deux minutes .

Une deuxième expérience a été effectuées en ayant fait varier les paramètres d'élution. Ce sont ces dernières conditions qui furent conservées pour le protocole de purification (voir tableau 3).

| Temps (minutes) | Débit (mL/min) | Solvant A % [MES 20mM pH (6.0)] | Solvant B % [MES 20mM + 1M NaCl pH (6.0)] |
|--------------------|-------------------|------------------------------------|--|
| 0 | 4 | 100 | 0 |
| 5 | 4 | 100 | 0 |
| 60 | 4 | 60 | 40 |
| 70 | 4 | 0 | 100 |
| 90 | 4 | 0 | 100 |
| 100 | 4 | 100 | 0 |

Tableau 3 : Conditions d'élution de l'enzyme sur la colonne cationique

3.3.2 Concentration des fractions actives

Les fractions actives ont été concentrées 3 fois à l'aide d'une cellule à pile agitatrice. Le système est muni d'une membrane de type oméga 3K qui laisse passer les liquides et les sels et qui retient les protéines (3000 daltons et plus) . Le tampon a été remplacé par du tampon Bis-Tris/NaOH à 20 mM (pH 7.0). Afin de bien s'assurer qu'il ne reste

plus de sel, l'échantillon a été dialysé toute la nuit à 4°C dans 4 litres de tampon Bis-Tris/NaOH à 0.5 mM (pH 7.0).

3.3.3 Séparation sur une colonne anionique

La deuxième étape de purification a été le passage des fractions actives sur une colonne échangeuse d'anions (QMA Avicell 0.5 cm ID X 6.0 cm, Waters), couplée à un HPLC. Cette colonne était composée d'une matrice quaternaire amine échangeuse forte d'anions. Le tampon utilisé pour le lavage de la colonne fut le Bis-Tris/NaOH à 20 mM auquel a été ajouté 2 M de NaCl (pH 7.0). Cinq à dix volumes de colonne ont été passés à un débit de 1 mL par minute. Ensuite, la colonne a été équilibrée avec du tampon Bis-Tris/NaOH à 20 mM (pH 7.0). L'échantillon (4.6 ml) fut passé sur la colonne et les protéines qui furent adsorbées ont été par la suite éluées à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl qui variait de 0 à 100 % en 60 minutes à un débit de 1mL/min. Les fractions furent récoltées à toutes les deux minutes.

3.3.4 Concentration et dialyse de l'échantillon

Les fractions actives ont été concentrées 3 fois à l'aide d'une cellule à pile agitatrice muni d'une membrane de type oméga 3K. Le tampon a été remplacé par du MES/NaOH à 20mM et l'échantillon a ensuite été dialysé toute la nuit à 4°C dans 4 litres de tampon MES/NaOH à 0.5 mM (pH 6.0). L'échantillon fut ensuite filtré à l'aide d'une membrane 0.22 µM.

3.3.5 Séparation de l'échantillon sur une colonne cationique

La troisième étape de purification a été le passage des fractions actives sur une colonne échangeuse de cations (CM Avicell 0.5 cm ID X 8.0 cm, Waters), couplée à un HPLC. La colonne Avicell était composée d'une matrice d'acide sulfonique échangeuse forte de cations. Le tampon utilisé pour le lavage de la colonne fut le même qu'à la première étape de purification, soit le MES/NaOH à 20 mM + 1M de NaCl (pH 6.0). Cinq à dix volumes de colonne furent passés à un débit de 1 mL/min. Ensuite, la colonne a été équilibrée avec le tampon MES/NaOH à 20 mM (pH 6.0). Suite à l'adsorption de l'échantillon (7.3 ml), les protéines furent éluées à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl qui variait de 0 à 30 % en 60 minutes à un débit de 1mL/min. Les fractions furent récoltées à toutes les deux minutes.

3.3.6 Concentration des fractions actives

Les fractions actives ont été concentrés 3 fois à l'aide d'un système Macrosep. Les fractions ont été placés dans le réservoir du système qui est muni d'une membrane 3 K. Les tubes ont été centrifugés 3 heures à 3000 g. Le tampon fut changé pour du tampon phosphate de sodium/NaOH à 100 mM (pH 7.0). L'échantillon fut filtré à l'aide d'une membrane 0.22 µm.

3.3.7 Séparation de l'échantillon sur un tamis moléculaire

La quatrième étape de purification a été le passage des fractions actives (0.650 ml) sur 2 tamis moléculaires en série (Protein Pack SW 300, Waters), couplés à un système HPLC (Waters Millipore, modèle 510). Ces colonnes étaient composées d'un gel qui

sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Leur intervalle de séparation se situe entre 10 000 et 300 000 Da. La phase mobile qui fut utilisée était le tampon sodium phosphate à 100 mM (pH 7.0). Le débit était de 0.5 mL/min et les fractions ont été récoltées à toutes les minutes.

3.3.8 Test d'activité enzymatique

Afin de déterminer dans quelles fractions était contenue l'enzyme, des tests d'activité enzymatique mesurant la disparition du propyle parabène ont été réalisés par HPLC. La colonne utilisée était une Nova-pack C-18 de Waters (3.9 X 15.0 cm).

Les tests d'activité ont été faits dans un tampon phosphate de sodium à 50 mM (pH 7.5). Chaque essai enzymatique était composé de 45 μ L de la fraction à tester 45 μ L de propyle parabène 1mM et 360 μ L de tampon pour un volume final de 450 μ L. Les échantillons ont été incubés 30 minutes à 27°C. Après la période d'incubation, les échantillons furent placés 5 minutes dans un bain d'eau bouillante afin d'arrêter la réaction. Puis, 50 μ L d'acétonitrile contenant 1% d'acide acétique fut ajouté à chaque tube. Les analyses sur HPLC ont été effectuées selon un gradient linéaire décrit ci-dessous.

| Temps (minutes) | Débit (ml) | A % Eau + 0.1% acide acétique | B% Acétonitrile + 0.1 % acide acétique |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|--|
| 0 | 2 | 90 | 10 |
| 5 | 2 | 0 | 100 |
| 12 | 2 | 0 | 100 |
| 17 | 2 | 90 | 10 |
| 20 | 2 | 90 | 10 |

L'activité enzymatique de l'échantillon était évalué en fonction de la disparition du substrat.

À partir des résultats obtenus, plusieurs valeurs ont été calculées soit l'activité enzymatique, l'activité spécifique, le taux de purification et le rendement.

Activité enzymatique (unités) : Quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader une $\mu\text{mole/minute/mL}$.

Activité spécifique (unités internationale :UI) : Activité enzymatique/ mg de protéines.

Taux de purification : Activité spécifique/ activité spécifique de l'extrait de départ.

Rendement (%) : Unités récupérées/ unités totales au départ.

3.3.9 Électrophorèses en gel de polyacrylamide 12 % contenant 0.1 % SDS (Laemmli, 1970).

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide 12 % ont été effectués après chaque étape de purification afin de visualiser les protéines des fractions actives

Les gels furent coulés entre deux plaques de verre montées sur un système Miniprotean. La première étape fut de couler le gel de séparation qui était composé de 8ml d'une solution mère [16 ml d'acrylamide, 13.5 ml d'eau distillée, 10 ml Tris/HCl 1.5 M à pH 8.8, 400 μL d'une solution de SDS 10 %], 40 μL de persulfate d'ammonium et 4 μL de TEMED. Environ 3.5 mL de cette préparation à été utilisée

pour chaque gel et un peu d'eau fut mis au-dessus pour la polymérisation. Après la polymérisation du gel de séparation, l'eau fut égouttée et le gel d'entassement composé de 3 mL d'une solution mère [1.3 mL d'acrylamide, 6.1 mL d'eau distillée, 2.5 mL de Tris/HCl 0.5 M à pH :6.8, 100 µL de SDS 10 %], 15 µL de persulfate d'ammonium et 3 µL de TEMED, a été coulé.

Pour la migration, un volume de 16 µl d'échantillon fut prélevé auquel a été ajouté 4 µL de tampon de migration. Le tampon de migration (5X) était composé de : 1.0 mL d'eau distillée, 3.2 mL de glycérol (50 %), 1.6 mL de SDS (10 %), 0.4 mL de β-mercaptoéthanol et 0.8 mL de bleu de bromophénol (50 %) . Les échantillons furent placés 7 minutes dans un bain d'eau porté à ébullition.

Pour la migration, la cavité entre les deux gels ainsi que le bain a été rempli de tampon de migration à pH : 8.3 [5 g de Tris base, 24 g de glycine et 1.6 g de SDS Richemond dans 1 litre d'eau distillée]. Les protéines ont alors été déposées dans les puits et un courant de 200 volts a été appliqué afin de faire migrer les protéines dans le gel. La migration a eu lieu jusqu'à ce que l'indicateur (bleu) fut rendu en bas du gel.

3.3.9.1 Coloration au bleu de coomassie

Les gels ont été placés dans la solution de coloration [méthanol (40 %), acide acétique (10 %) , bleu de coomassie R-250 (1g/L) , eau distillée (50 %)] 15 minutes avec agitation. Après 15 minutes, les gels furent transférés dans la solution de décoloration [méthanol (40 %), acide acétique (10 %), eau distillée (50 %)] avec agitation. La décoloration a été maintenue jusqu'à ce que les bandes soient nettement visibles. Lorsque la décoloration fut terminée, les gels ont été placés dans une solution d'acide acétique (5 %) afin de mettre fin à la décoloration.

3.3.9.2 Coloration à l'argent (technique modifiée de Blum *et al*, 1987)

Les gels furent mis dans la solution de fixation [méthanol (50 %), acide acétique (5 %), eau (45 %)] une heure avec agitation. Puis, ils ont été transférés dans une solution de 50 % méthanol/ 50 % eau pour 10 minutes, avec agitation, puis rincés 2 fois dans l'eau pour une période de 10 minutes chacune. Les gels ont ensuite été placés dans une solution de 0.02 % de thiosulfate de sodium pour une minute avec agitation. Puis, ils ont été rincés 2 fois dans l'eau pour 1 minute. Par la suite, ils ont été colorés avec une solution de 0.2 % nitrate d'argent. Les gels ont été placés 20 minutes dans la solution de coloration avec agitation. Ensuite, ils ont été rincés dans l'eau 2 fois pour une période de une minute chacune. Finalement, les gels ont été placés dans une solution contenant 2 % de carbonate de sodium et 0.001 % de formaldéhyde. Suite à la révélation des bandes (environ 3 minutes), les gels ont été placés dans une solution d'acide acétique 5 % afin de mettre fin à la coloration.

3.3.10 Dosage de protéines (Folin-Ciocalteu)

Un dosage de protéines a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu sur un échantillon avant et après purification (Lowry *et al*. 1951). Une courbe standard a été faite à l'aide de concentrations connues de BSA (12, 30, 50, 60, 70, 80, 100, 120 µg/mL). Dans un même temps, diverses dilutions des échantillons à doser ont été effectuées (1/20, 1/100, 1/500, 1/2500). Chaque échantillon avait un volume final de 500 µL. A ce volume, 500 µL de la solution 1 (carbonate de sodium 1 M, NaOH 250 mM) et 200 µL de la solution 2 (Sulfate de cuivre à 0.2 % et 0.4 % de tartrate de sodium et de potassium 1 :1), ont été ajoutés. La solution a été mélangé au vortex et les tubes incubés 15 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 375 µL de la solution 3 (solution de Folin, 1 :3 H₂O) ont été ajoutés au mélange et les tubes ont été

incubés 15 minutes à la température de la pièce. L'absorbance des échantillons a ensuite été déterminée à 700 nm au spectrophotomètre.

3.4 Isolement et séquençage du gène codant pour l'estérase

3.4.1 Digestion de l'enzyme à la trypsine

La première étape a consisté à la dénaturation de l'enzyme. Pour ce faire, 10 µg d'enzyme pure ont été pesés auxquels ont été ajoutés 25 µL de tampon carbonate d'ammonium 0.1M à pH 8.6 contenant 6M de guanidine•HCl . Cette solution fut incubée 30 minutes à 50°C. Ensuite, 0.5 µL de DTT 1M a été ajouté et la solution incubée 2 heures à 30°C. À cette étape de réduction la concentration finale de DTT était de 20mM. La troisième étape consiste en l'alkylation de la protéine. Un volume de 1 µL d'ADD (1 M) a été ajouté afin que la concentration finale en ADD soit de 40 mM. La solution a été incubée une demie heure à la température de la pièce dans l'obscurité. Ensuite, les solvants de l'échantillon furent complètement éliminés à l'aide d'un évaporateur. Suite à cette étape, 275 µL de tampon bicarbonate d'ammonium à 50 mM (pH 8.6) ont été ajoutés pour redissoudre la protéine. La trypsine a ensuite été ajoutée selon un rapport molaire de 1 :20. La digestion a eu lieu toute la nuit à 37°C. Le lendemain, l'échantillon a été placé dans un bain d'eau bouillante afin d'arrêter la réaction.

3.4.2 Purification par ZipTip

Suite à la digestion à l'aide de la trypsine, la purification des peptides a été effectuée par Zip Tips. Avant de procéder à la purification, toutes les solutions ont été filtrées

avec des filtres 0.22 μm . La première étape a consisté au mouillage de l'embout. Un volume de 10 μL de solution d'acétonitrile (50 %) contenant 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) a été passé dans l'embout. Cette étape a été répétée 4 fois avec de la solution fraîche. Ensuite, la résine de l'embout a été équilibrée par passage de 10 μL de TFA à 0.1%. Cette étape fut répétée 5 fois avec de la solution fraîche. Par la suite, l'échantillon a été passé dans l'embout pour l'adsorption des peptides sur la matrice. Un volume de 2 μL de TFA à 20 % a été ajouté à 18 μL d'échantillon. La moitié de cette solution a été passée sur la résine 10 fois par aspiration. Suite aux 10 aspirations, la même étape a été répétée avec l'autre moitié.

La résine a ensuite été lavée par le passage de 10 μL de TFA à 0.1 %. Cette étape a été répétée 10 fois en prenant soin d'utiliser de la solution fraîche à chaque fois. Après l'étape de lavage, les peptides ont été élués avec 12 μL d'acétonitrile à 80 % contenant 0.1% de TFA. L'éluant a été passé 3 à 4 fois dans la résine afin de s'assurer que tous les peptides ont été élués. L'échantillon a été centrifugé et soniqué 5 minutes pour enlever les bulles d'air.

3.4.3 Analyse des peptides par chromatographie liquide couplée à un spectre de masse (MS).

Les peptides obtenus lors de la digestion à la trypsine ont été analysés en mode "nanospray" par un spectre de masse Quattro II (Micromass, Manchester, UK) triple quadrupole en mode négatif. Un volume de 12 μL d'échantillon fut introduit dans un fin capillaire. Le voltage qui fut appliqué à la sortie du capillaire était de 0.9 kV et la température était maintenue à 100°C. Les analyses furent effectués sur des masses comprises entre 600 et 1 200 Da. La chambre de collision contenait 4.5×10^{-4} mTorr d'argon et l'énergie des collisions était de 27 eV.

3.4.4 Préparation d'un échantillon pour microséquençage

Un gel de polyacrylamide 12 % contenant 0.1 % SDS a été préparé selon la méthode mentionnée en 3.3.7. Lors de la migration, 200 μ L d'acide thioglycolique 100 mM ont été ajoutés dans la chambre supérieure. La migration a eu lieu à 200 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Suite à la migration, les protéines ont subi un transfert électrophorétique sur une membrane PVDF. La membrane a d'abord été rincée une minute dans du méthanol. Ensuite, le gel ainsi que la membrane, ont été rincés 5 minutes dans le tampon de transfert (CAPS 10 mM, 10 % de méthanol à pH 11). Le gel et la membrane ont été montés dans un système « Mini-transblot ». La chambre a été remplie à ras bord de tampon de transfert et un courant de 250 mA (constant) appliqué pour un période de 15 minutes. Ensuite, la membrane a été lavée 5 minutes dans de l'eau distillée, puis colorée 2 minutes au bleu de coomassie [bleu de coomassie R-250 (0.1 %) dans du méthanol à 50 %]. Après coloration, la membrane a été décolorée 7 minutes dans la solution de décoloration [méthanol 40%, acide acétique (10 %), eau distillée (50 %)]. Cette solution a été changée à chaque minute. Finalement, la membrane a été lavée 5 minutes dans de l'eau distillée. Une fois la membrane séchée, elle a été conservée à -20°C, à l'obscurité, jusqu'à son envoi à l'Institut de Recherche Biologique pour le séquençage. (Méthode de Le Gendre et Matsudaira, 1988).

La protéine a été traitée au bromure de cyanogène. Le bromure de cyanogène est un réactif de petite taille qui a la propriété de couper la chaîne polypeptidique en C-terminal des résidus méthionines. L'avantage de travailler avec ce réactif est que la réaction est moins dépendante de la structure de la protéine car, étant de petite taille, le réactif ne souffre pas de l'encombrement stérique. L'enzyme ainsi clivée, fut mise sur membrane de PVDF. Un des fragments obtenu a été retiré de la membrane et fut séquençé.

3.4.5 Extraction plasmidique

Une extraction plasmidique a été effectuée pour les travaux de séquençage. Les bactéries ont été cultivées dans 2 litres de milieu minimal Davis contenant 3 % de glucose. Lorsque la densité optique du milieu a atteint 0.600 (à 650 nm), 170 µg de chloramphénicol par mL de milieu ont été ajoutés afin de forcer l'expression du plasmide. Les milieux ont été incubés toute la nuit à 34°C avec agitation. Le lendemain, le milieu a été centrifugé 15 minutes à 18 480 g. Après la centrifugation, les bactéries ont été resuspendues dans 36 mL de TEG (Tris 25 mM à pH 8.0, EDTA disodique 10mM à pH 8.0 et glucose à 50 mM). Ensuite, 4 mL d'une solution de lysozyme (10 mg/mL TEG) qui doit être préparée juste avant son utilisation ont été ajoutés et le mélange incubé 10 minutes à la température de la pièce.

Pour dénaturer les protéines, 120 ml de solution NaOH (0.2M) contenant 1% de SDS ont été ajoutés et le mélange incubé 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 60 ml d'acétate de potassium 3M à pH 4.8 ont été ajoutés et la solution mise sur la glace pour 15 minutes afin de précipiter les protéines. Puis, le mélange a été centrifugé 15 minutes à 7500 rpm à 4°C et le surnageant filtré sur du coton fromage. Le filtrat obtenu a été mesuré et 0.6 volume d'isopropanol a été ajouté pour précipiter l'ADN génomique et l'ARN. Le mélange a été incubé 60 minutes à la température de la pièce et centrifugé 10 minutes à 6800 g. Le surnageant a été récupéré et 2 volumes d'éthanol (95 %) furent ajoutés afin de précipiter les acides nucléiques. Le mélange a ensuite été incubé 20 minutes sur la glace et centrifugé 15 minutes à 6800 g. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de TE (Tris 10 mM additionné d' EDTA monosodique 1mM à pH 8.0) et 2 µL de RNase (10mg/mL) ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été incubé 15 minutes à 37°C.

L'extraction plasmidique proprement dite a été faite par le traitement au PEG. A 1mL de la solution d'ADN, 429 μ L de NaCl (5 M) et 357 μ L de PEG (30 %) + NaCl 1.5 M ont été ajoutés. Ce mélange a été incubé 30 minutes sur la glace, puis centrifugé 10 minutes à 6800 g. Le culot a été resuspendu dans 5 mL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM à pH 8.0). Une première extraction (50/50) phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50 :49 :1) a été effectuée. La suspension a été centrifugée 15 minutes à 1480 g. La phase aqueuse fut récupérée et une deuxième extraction (50/50) chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1) a été effectuée. La suspension fut centrifugée 2 minutes à 1 480 g. La phase aqueuse a été récupérée et de l'acétate de sodium à 3M (pH 7.0) (1/10 du volume) et 2 volumes d'éthanol (95 %) ont été ajoutés. Cette suspension a été incubée 30 minutes à -20°C. Ensuite, la suspension fut centrifugée 10 minutes à 16 250g, et le culot resuspendu dans 400 μ L d'eau. Afin de déterminer la quantité de plasmide, une dilution 1/100 a été effectuée et la densité optique fut déterminée à 260 nm et 280 nm.

Pour visualiser le plasmide, 10 μ L d'échantillon plus 2 μ L de tampon de bleu de bromophenol (6X) ont été déposés sur un gel d'agarose 1 %. La migration a été effectuée dans du tampon TAE (Tris 40 mM contenant 1mM d'EDTA) à un voltage de 80 mV pour une durée d'environ 2 heures. Ensuite, le gel a été coloré dans une solution de bromure d'éthidium 15 minutes et les bandes observées aux rayons U.V.

3.4.6 Amplification du gène

Un PCR a été effectué avec les amorces obtenues à partir des séquences en acides aminés correspondant au N-terminal déterminé pour l'enzyme de *E. cloacae* (EM) et d'un peptide obtenu par spectrométrie de masse. Deux températures d'hybridation ont été utilisées, soit 36°C et 30°C. Les tests ont été effectués à partir des réactifs de Pharmacia. Chaque essai a été fait avec de l'ADN plasmidique et de l'ADN

chromosomique. Pour chaque type d'ADN trois tubes ont été préparés : tous contenaient 3 μL de tampon Taq, 42.5 μL d'eau, 1 μL de DNTP, 0.5 μL de Taq polymérase. Ensuite, 1 μL d'amorce N-terminale (EcoN) a été ajouté au premier tube, 1 μL d'amorce EcoP1 dans le second tube et 1 μL de chaque amorce ont été ajoutés au troisième tube. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'appareil à PCR et lorsque la température atteint 80°C, 5 ng d'ADN (plasmidique ou chromosomique selon le cas) ont été ajoutés. Le PCR a été effectué selon les conditions suivantes :

80°C, 2 min ; 94°C, 5min; 1 cycle

72°C, 1 min, 94°C, 40 sec; (36°C ou 30°C), 1 min; 30 cycles

72°C, 10 min

3.4.7 Extraction de l'ADN à partir du gel d'agarose

La bande d'intérêt obtenue par PCR a été coupée du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel. Le protocole et les solutions qui furent utilisées proviennent de la compagnie QIAEX. Tout d'abord, le gel a été pesé et 3 volumes de tampon QX1 ont été ajoutés. Puis, 30 μL de solution QIAEX II ont été ajoutés et le mélange incubé 10 minutes à 50°C afin de solubiliser le gel. Le mélange a ensuite été centrifugé 30 secondes (16 250 g) et le culot lavé avec 500 μL de tampon QX1. Le mélange fut centrifugé 30 secondes et le culot lavé deux fois avec du tampon PE. Le culot a ensuite été séché à l'air libre et 20 μL de tampon Tris-HCl à 5 mM (pH 8.5) ont été ajoutés afin d'éluer l'ADN. Le mélange a été incubé 5 minutes à la température de la pièce et centrifugé 30 secondes. Le surnageant qui contient l'ADN purifiée a été récolté.

3.4.8 Ligation du produit de PCR dans un vecteur

Le produit de PCR purifié a été introduit dans le vecteur pGEM[®]-T Easy. Pour la ligation, un mélange de 5 µL de tampon de ligation, 1 µL de vecteur (50 ng), 2 µL d'insert, 1 µL de T4 DNA ligase et 1 µL d'eau, a été préparé et incubé toute la nuit à 4°C.

3.4.9 Transformation bactérienne par CaCl₂

La transformation a été effectuée avec une souche de *E. coli* (XL1-blue). La souche bactérienne a été repiquée dans 30 mL de milieu SOB à pH 7.0 [bacto tryptone (4%) contenant 1 % d'extrait de levure, 0.1 % de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂] et incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0.6 à une longueur d'onde de 600nm.

La suspension bactérienne a été incubée 15 minutes sur la glace, puis centrifugée 5 minutes à 3 000 g. Le culot fut resuspendu dans 20 mL de CaCl₂ 100mM, incubé 10 minutes sur la glace et centrifugé 5 minutes (4°C) à 3 000 g. Le culot fut ensuite resuspendu dans 10 mL de CaCl₂ 100 mM, incubé 10 minutes sur la glace et centrifugé 5 minutes (4°C) à 3 000 g. Finalement, le culot a été resuspendu dans 1.2 mL de CaCl₂ 100mM. Les cellules étaient alors prêtes à subir la transformation.

Dans un tube eppendorf, 200 µL de cellules compétentes ont été ajoutés au produit de ligation. Dans un autre tube (contrôle négatif), 1µL de vecteur et 200 µL de cellules compétentes ont été ajoutés. Les deux préparations ont été incubées 30 minutes sur la glace. Ensuite, les tubes ont été placés 90 secondes à 42°C. Puis, ils ont été placés 2

minutes sur la glace. Le mélange a été transféré dans 800 μ L de milieu SOC (milieu SOB plus glucose à 10 mM) et incubé à 37°C pour 45 minutes. Ensuite, le milieu a été étalé sur pétris d'agar contenant de l'ampicilline. Les pétris ont été incubés toute la nuit à 37°C.

3.4.10 Repiquage des colonies

Après 24 heures d'incubation, 11 colonies blanches et 1 colonie bleue ont été repiquées dans 3 mL de milieu SOB (300 μ g ampicilline) et incubées toute la nuit à 37°C avec agitation.

3.4.11 Extraction de plasmides (MiniPrep)

Suite au repiquage des colonies, une extraction plasmidique a été effectuée. Pour ce faire, 1 mL de culture bactérienne a été centrifugé 30 secondes. Le culot a été resuspendu dans 500 μ L de TEN, puis centrifugé 30 secondes. Ensuite, 200 μ L de TEN et 300 μ L de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50 :49 :1) ont été ajoutés et le tout vortexé jusqu'à ce qu'il y ait une émulsion. Le mélange fut ensuite centrifugé 15 minutes à 16 250 g, la partie aqueuse fut récoltée et 50 μ L d'acétate d'ammonium ont été ajoutés. Ensuite, 500 μ L d'éthanol (95 %) ont été ajoutés au mélange. Le mélange fut incubé 15 minutes à -20°C afin de faire précipiter les protéines, centrifugé 10 minutes (16 250 g) et le culot resuspendu dans 500 μ L d'éthanol (70 %). Le mélange a été centrifugé 1 minute et le culot fut resuspendu dans 50 μ L de solution de RNase (10 μ g/mL). Ensuite, 5 μ L d'échantillon ont été appliqués sur un gel d'électrophorèse d'agarose à 1 % .

3.4.12 Digestion du plasmide avec EcoR1

Suite à l'extraction, les plasmides ont été digérés avec l'enzyme EcoR1 afin de déterminer si le plasmide contient l'insert voulu. La digestion a été effectuée avec le mélange suivant : 10 µL d'ADN, 0.5µL EcoR1, 5.5 µL d'eau, 4 µL de ToPA. Le mélange fut incubé toute la nuit à 37°C et mis sur gel d'agarose 1 % afin de visualiser la présence ou non de l'insert.

3.4.13 Purification de l'ADN plasmidique pour le séquençage (Maxi Prep)

La purification d'un plasmide contenant l'insert a été faite à l'aide de la méthode et des réactifs de QIAGEN. Un volume de 4 mL de culture bactérienne a été centrifugé et le culot resuspendu dans 250 µL de tampon P1 par inversion jusqu'à ce qu'il y ait lyse complète des cellules. Ensuite, 250 µL de tampon P2 ont été ajoutés et le tout mélangé par inversion. Puis, 350 µL de tampon N3 ont été ajoutés et le mélange centrifugé 10 minutes (16 250 g). Le surnageant a été placé au-dessus d'une colonne de purification. La colonne fut centrifugée 60 secondes. L'éluant récolté dans le tube Eppendorf a été jeté et la colonne a été lavée avec 500 µL de tampon PE et centrifugé 1 minute. L'éluant a été jeté et la colonne a été centrifugée une seconde fois afin d'éliminer le tampon résiduel. Finalement, l'ADN a été élué avec 50 µL de tampon EB (10 mM Tris.HCl à pH 8.5).

3.5 Test d'inhibition avec le diisopropyl fluorophosphate (DFP)

Des tests d'inhibition enzymatique au DFP (Calbiochem) ont été effectués avec l'estérase pure. La réaction d'inhibition a été faite dans du tampon phosphate de

sodium à 100 mM (pH 7.5) à la température de la pièce. Une quantité de 0.2 μ M d'enzyme a été incubée avec une concentration 0.5 mM de DFP dans un volume final de 500 μ L. Après une incubation d'une heure, l'échantillon a été évaporé à sec sous jet d'azote. Le culot a été resuspendu dans 500 μ L d'eau milliQ. Ensuite, l'échantillon a été dialysé trois fois contre 5 L d'eau milliQ filtré (filtre 0.22 μ m) à 4°C afin d'éliminer le DFP excédentaire. Des tests d'activité enzymatique ont été effectués.

Résultats

4.0 Résultats

4.1 Identification de la souche

L'amplification par PCR du gène de l'ARN 16S avec des amorces universelles a permis de confirmer l'identification de notre souche. En effet, la séquence obtenue a été comparée avec des séquences connues prises à partir de banques de données. Les analyses ont démontré une homologie de plus de 99 % avec la séquence du gène de l'ARN 16S d'*Enterobacter cloacae*.

4.2 Purification de l'estérase

La première partie du projet consistait en la purification de l'enzyme produite par la souche qui hydrolyse les parabènes. Pour ce faire, différentes méthodes chromatographiques et plusieurs conditions de purification ont été utilisées. Il a fallu trouver les bonnes conditions de purification compte tenu que le poids moléculaire et le point isoélectrique de l'enzyme à purifier étaient inconnus.

4.2.1 Purification de l'échantillon initial à l'aide d'une colonne cationique.

La première étape de purification a été le passage de l'échantillon de départ sur une colonne cationique (CM Ap-2 de Waters). Afin d'optimiser la méthode de séparation, différents gradients d'éluion ont été utilisés. Le tampon utilisé lors de cette étape de

purification est le tampon MES/NaOH à 20 mM (pH 6.0). Tout d'abord, un gradient linéaire croissant de 0 à 1 M NaCl de 90 minutes fut utilisé à un débit de 4 ml/min. Cet essai avait pour but de vérifier si l'enzyme était retenue par la colonne dans ces conditions de tampon et de pH. Des tests d'activité enzymatique ont démontré que l'enzyme était adsorbée à la colonne et qu'elle éluait lorsque la concentration de sel du tampon se situe entre 0.26 et 0.36 M. Afin d'améliorer la séparation, le gradient a été modifié, et un gradient linéaire croissant en sel de 0 à 0.4 M en 60 minutes fut utilisé. Dans ces conditions, l'enzyme a été élue à une concentration de sel située entre 0.20 et 0.27 M. Une meilleure séparation des protéines fut observée dans ces conditions que dans les conditions d'élution précédentes.

Le degré de purification obtenu dans cette étape a été calculé. Un dosage de protéines a révélé que la fraction avant le passage sur la colonne (fraction initiale) contenait 1633 mg de protéines. Des tests d'activité enzymatique ont été effectués et le nombre d'unités totales d'enzyme et l'activité spécifique de l'échantillon de départ étaient respectivement de 616 unités et de 0.37 UI. Suite au passage de la fraction initiale sur la colonne cationique, des tests d'activité enzymatique ont été effectués ainsi qu'un gel SDS-Page afin d'identifier quelles fractions devaient être retenues pour la prochaine étape de purification. Chaque fraction fut diluée 1000 fois et celles qui démontrèrent une hydrolyse totale du propyle parabène (0.1mM) en 30 minutes furent rassemblées. Cette nouvelle fraction contenait 31 mg de protéines, pour un nombre total d'unités enzymatiques de 430 unités et une activité spécifique de 14 UI. Le taux de purification par rapport à la fraction initiale est de 37.8 et le pourcentage de rendement est de 69.8 %.

4.2.2 Purification de la fraction active à l'aide d'une colonne anionique

La deuxième étape de purification a été le passage de la fraction active sur une colonne QMA (Waters). Le tampon utilisé fut le Bis-Tris/HCl à 20 mM (pH 7.0). Des tests préliminaires effectués sur Sep-Pack selon différents écarts de pH (6.5, 7.0, 7.5) ont démontrés que l'enzyme n'était pas retenue par la colonne alors que d'autres protéines l'étaient. Les protéines n'ayant pas été retenues furent récoltées en 2 fractions distinctes (pic 1 et pic 2). La fraction qui a été retenue pour l'étape suivante de purification est celle du pic 2 car le degré de purification obtenu avec le pic 2 est supérieur à celui du pic 1. Il est à noter que la fraction 1 contient également une quantité appréciable d'enzyme.

Tout comme à la première étape de purification, des tests d'activité enzymatique ont été effectués. La quantité de protéines de la fraction retenue pour la deuxième étape de purification est de 12 mg, et contient 300 unités totales d'enzyme pour une activité spécifique de 25 UI. Le taux de purification obtenu par rapport à la fraction initiale est de 67.6 et le pourcentage de rendement est de 48.7 %.

4.2.3 Purification de la fraction active à l'aide d'une colonne cationique

La troisième étape de purification a été le passage sur colonne CM Avicell (Waters). Le tampon utilisé fut le même que celui de la première étape de purification soit le MES/NaOH à 20 mM (pH 6.0). Plusieurs conditions d'élution ont été testées. Tout d'abord, un gradient linéaire croissant en sel allant de 0 à 1M NaCl en 60 minutes a été appliqué. Dans ces conditions, aucune séparation n'a été observée. Les protéines ont élué toutes en même temps en un pic étroit lorsque le gradient était à 0.6 M de sel.

Une autre gradient d'élution a été tenté, soit un gradient linéaire croissant en sel de 0 à 0.3 M NaCl en 60 minutes, ce qui a permis une meilleure séparation des protéines.

Comme à l'étape précédente de purification, des tests d'activités enzymatique ainsi qu'un gel SDS- Page ont été effectués. Les fractions qui furent retenues avaient un contenu en protéine de 0.578 mg, ainsi que 107 unités totales d'enzymes pour une activité spécifique de 185 UI. Le taux de purification par rapport à la fraction initiale est de 500 et le pourcentage de rendement est de 17.3 %.

4.2.4 Purification des fractions actives à l'aide d'un tamis moléculaire

Plusieurs tamis moléculaires et plusieurs conditions ont été essayés. Le tampon utilisé est le tampon sodium phosphate à 50 mM (pH 7.0). Un premier essai a été effectué avec un tamis Protein Pack SW 300. Ce tamis à la particularité de pouvoir séparer les protéines entre 10 000 et 300 000 Daltons. Cependant, la séparation ainsi obtenue n'était pas suffisante. L'expérience a donc été reprise avec deux tamis moléculaires Protein Pack 125 en série. Ce tamis à la particularité de pouvoir séparer les protéines entre 3000 et 60 000 Da. Un test préliminaire a été effectué avec une toute petite quantité de protéines. L'obtention de la protéine pure a bel et bien eu lieu. Cependant, la quantité de protéines qui fut purifiée de la sorte était de l'ordre du nanogramme alors que la quantité à traiter était de l'ordre du milligramme. Une quantité plus importante en protéine appliquée sur ces colonnes a fait perdre la résolution de la séparation. Comme nous n'avons pas à notre disposition ce type de tamis (Protein Pack 125) mais de plus gros calibre, une nouvelle tentative a donc été effectuée avec deux tamis moléculaires Protein Pack SW 300 couplés en série. Dans ces conditions, une bonne séparation a été obtenue. Le chromatogramme démontre deux pics bien distincts. L'enzyme purifiée se retrouve dans le pic 1 du chromatogramme (voir Figure 6).

Cette dernière étape de purification a permis l'obtention de 0.461 mg de protéine pure. Le nombre d'unités totales d'enzyme fut déterminé à 98 et l'activité spécifique à 212 UI. Le taux de purification est de 572.9 et le pourcentage de rendement est de 15.9 %.

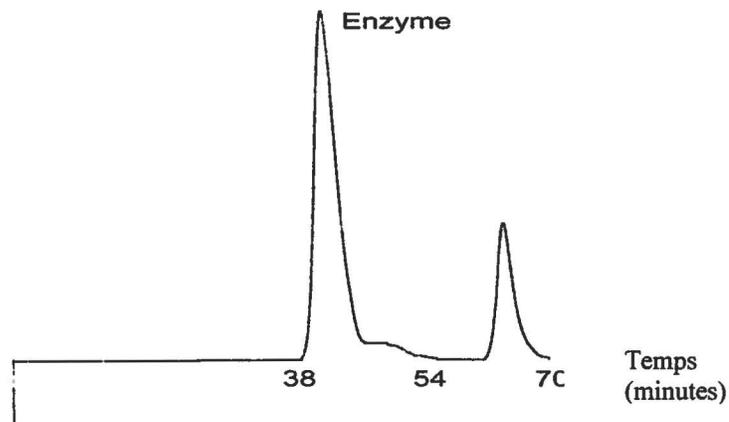


Figure 6 :Chromatogramme obtenu avec deux tamis moléculaires SW 300 en série. Le pic 1 contient l'enzyme pure.

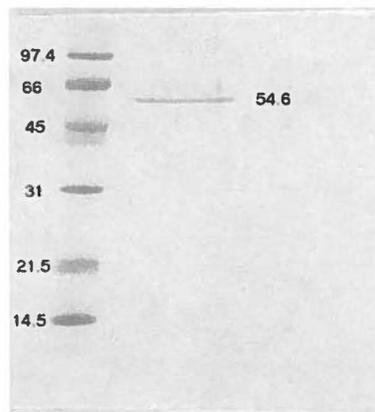


Figure 7: Gel SDS-Page 12% de l'échantillon du pic 1 obtenu après la chromatographie sur 2 tamis moléculaire SW 300 en série. Puit 1 : marqueur de poids moléculaire ; puit 2 : échantillon pic 1

4.2.5 Tableau de purification

| Étape de purification | Protéines totales (mg) | Unités totales | Activité spécifique UI | Taux de purification | Rendement % |
|-----------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------------|-------------|
| Extrait | 1663 | 616 | 0.37 | 1 | 100 |
| CM Ap-2 | 31 | 430 | 14 | 37.8 | 69.8 |
| QMA | 12 | 300 | 25 | 67.6 | 48.7 |
| CM avicell | 0.578 | 107 | 185 | 500 | 17.3 |
| Tamis | 0.461 | 98 | 212 | 572.9 | 15.9 |

4.3 Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique de l'enzyme.

Suite à la purification de l'enzyme, le poids moléculaire et le point isoélectrique de l'enzyme ont été déterminés. Le poids moléculaire fut tout d'abord déterminé approximativement grâce à la visualisation au bleu de Coomassie de la protéine sur un gel SDS-Page 12 % (Figure 7). Le poids moléculaire est d'environ 55 000 Daltons. Le poids moléculaire exact fut ensuite déterminé par spectrométrie de masse et évalué à 54 640 Daltons.

Un gel de focalisation isoélectrique a permis l'identification du point isoélectrique de l'enzyme (Figure 8). Le point isoélectrique est 6.9.

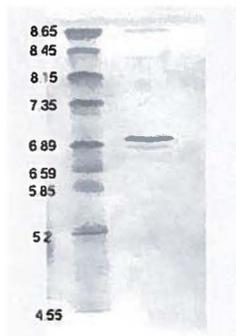


Figure8: Gel d'isofocalisation de l'enzyme pure. Le point isoélectrique est de 6.9.

4.3 Essais d'isolement du gène codant pour l'estérase purifiée

4.3.1 Production d'oligonucléotides dégénérés

Avant d'entreprendre les travaux de séquençage, des oligonucléotides furent obtenus à partir de séquences en acides aminés de la protéine. Dans un premier temps, un échantillon d'enzyme pure fut envoyé à un service de séquençage externe (Institut de Recherches en Biotechnologie, IRB) afin d'obtenir la séquence N-terminal des acides aminés de la protéine. Une séquence de 19 acides aminés a été obtenue:

Gln-Glu-Leu-Ser-Pro-Val-Gln-Met-Ser-Lys-Gly-Thr-Ile-Glu-Gly-Val-Lys-Asn-Asp

Un oligonucléotide dégénéré a été produit à partir de la séquence des 7 derniers acides aminés (EcoN) :

| | | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| | Ile | Glu | Gly | Val | Lys | Asn | Asp | |
| 5' | AT | GA | GG | GT | AA | AA | GA | 3' |
| | (TCA) | (GA) | (N) | (N) | (GA) | (TC) | GA | |

L'oligonucléotide fut produit en tenant compte de toutes les possibilités en acides nucléiques codant pour chacun de ces acides aminés. La dégénérescence est représenté en rouge.

4.3.1.1 Production d'un oligonucléotide dégénéré à partir d'une séquence obtenue par spectrométrie de masse en mode nanospray

Afin de pouvoir réaliser une amplification par PCR, l'obtention d'un deuxième oligonucléotide était nécessaire. Le séquençage des acides aminés d'une seconde partie de l'enzyme s'est fait par spectrométrie de masse. La protéine a été fragmentée en petits peptides par une digestion à la trypsine. L'échantillon est alors introduit dans le spectre de masse et l'on obtient un spectre de masse comportant les ions correspondants aux différents peptides obtenus (Figure 9).

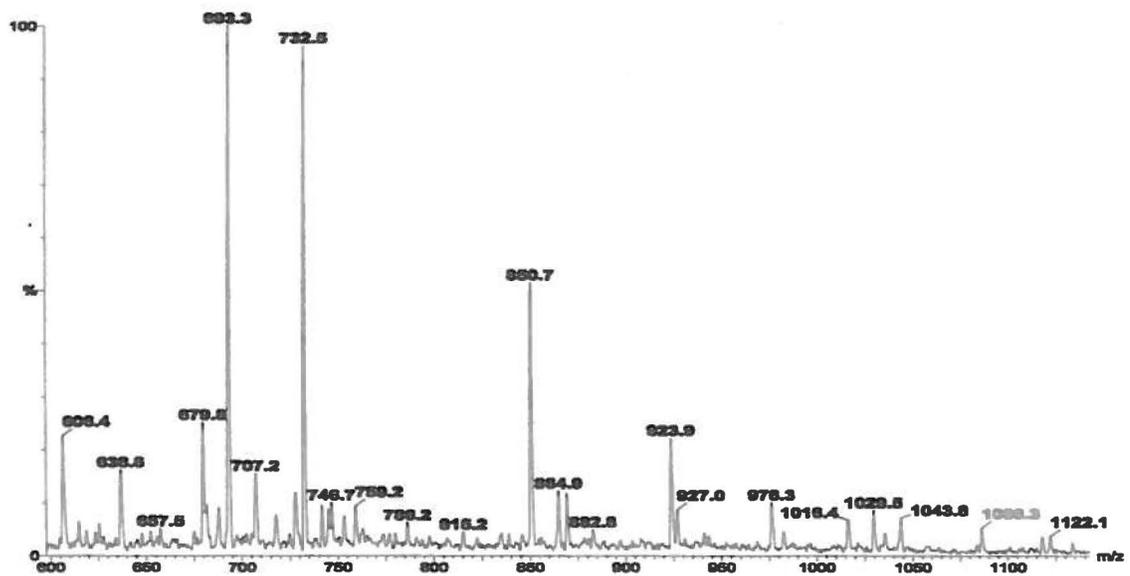


Figure 9: Spectre de masse de l'enzyme digérée à la trypsine

Ensuite, chaque peptide peut être séquencé en sélectionnant l'ion correspondant et en le fragmentant dans une cellule de collision d'un spectromètre de masse de type triple quadrupole. Le peptide correspondant à l'ion 1086 du spectre de masse fut retenu pour être séquencé. Les fragments obtenus peuvent ensuite être analysés avec des logiciels d'analyse (Figure 10) et la séquence du peptide peut alors être déterminée.

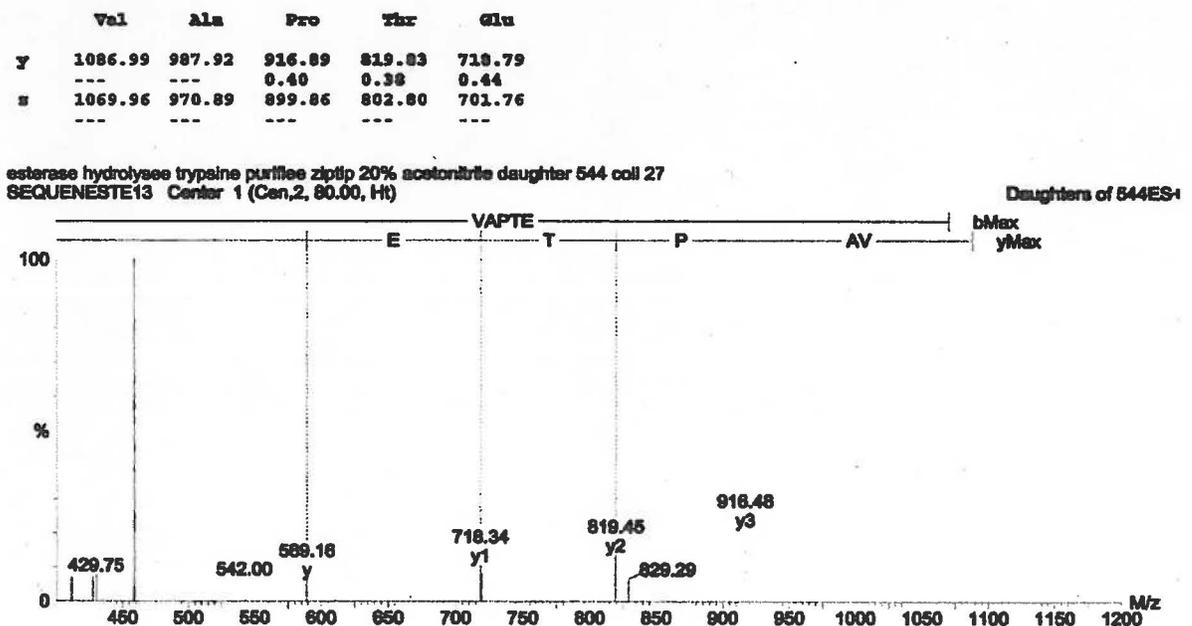


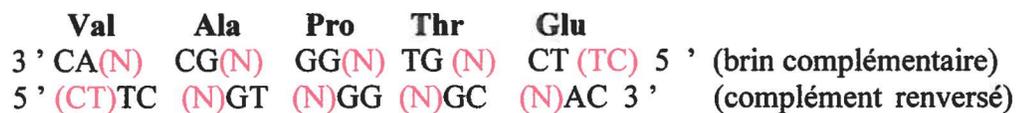
Figure 10: Spectre de masse de l'ion 1086 fragmenté et représentation de sa séquence en acides aminés.

La séquence en acides aminés s'obtient par la soustraction de la valeur d'un ion par celui qui le précède. Chaque valeur de soustraction devrait en principe correspondre à un fragment typique d'un acide aminé. Par cette méthode il est donc possible de

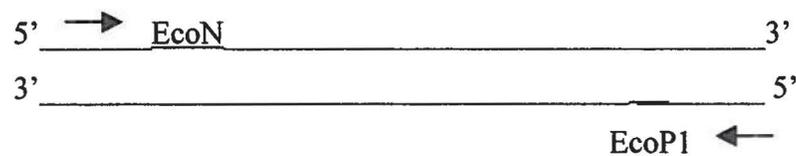
reconstituer une séquence en acides aminés. La séquence obtenue de l'ion 1086 est composée de 5 acides aminés :

Val-Ala-Pro-Thr-Glu

Un oligonucléotide dégénéré a été synthétisé à partir de la séquence des 5 acides aminés (EcoP1) :



La séquence retenue pour la production de l'oligonucléotide est celle du complément inversé. Cet oligonucléotide s'hybridera sur le brin complémentaire de l'ADN et amplifiera dans le sens contraire de l'oligonucléotide obtenu à partir de l'extrémité N-terminale :



4.3.1.2 Production d'un oligonucléotide à partir d'une séquence obtenue par le traitement au bromure de cyanogène.

Un troisième oligonucléotide a été synthétisé à partir d'une séquence en acides aminés de l'estérase obtenue de peptides générés par un traitement au bromure

de cyanogène. Le traitement et le séquençage a été effectué à l'IRB. Ce traitement a permis l'obtention d'une séquence de 18 acides aminés :

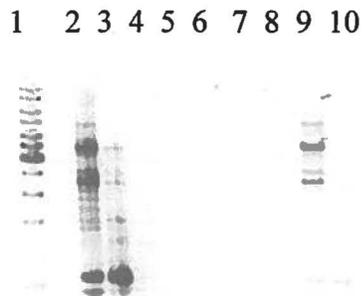
Ala-Gly-Tyr-Phe-Ala-Lys-Gly-Leu-Phe-Asn-Arg-Ala-Ile-Val-Ser-Lys-Gly-Tyr

Un oligonucléotide dégénéré a été synthétisé à partir des 7 premiers acides aminés :

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| Ala | Gly | Tyr | Phe | Ala | Lys | Gly | |
| 3'CG(N) | CC(N) | AT(A/G) | AA(G/A) | CG(N) | TT(T/C) | CC | 5' (brin complémentaire) |
| 5' CC | (C/T)TT | (N)GC | (A/G)AA | (G/A)TA | (N)AC | (N)GC | 3' (complément inverse) |

4.3.2 Amplification du gène par PCR

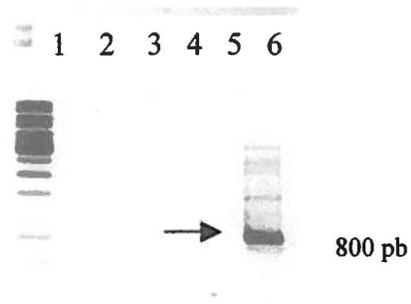
Une amplification par PCR du gène codant pour l'enzyme a été tentée dans plusieurs conditions d'hybridation. Tout d'abord, un PCR a été effectué avec l'amorce EcoN et EcoP1 à une température d'hybridation de 36 °C (Figure 11). Dans ces conditions, un produit de PCR fut observé en présence de EcoN seul et en présence des deux amorces ensemble. Par contre, aucun produit de PCR n'est observé en présence de EcoP1 seul. Ceci semble indiquer que l'amorce EcoP1 ne s'hybride pas dans ces conditions. De plus, on remarque que les patrons d'hybridation de EcoN seul et celui des deux amorces ensemble sont semblables. Ceci semble indiquer encore une fois que l'amorce EcoP1 ne s'hybriderait pas. On observe aussi qu'il n'y a aucune différence apparente entre le patron d'amplification obtenu à partir de l'ADN chromosomique et l'ADN plasmidique avec l'amorce EcoN seul. Donc, il n'y aurait aucune hybridation qui serait spécifique à un ou l'autre des deux types d'ADN.



- Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire (1 Kb)
 Puit 2 : Amorce EcoN + ADN plasmidique
 Puit 3 : Amorce EcoN + ADN génomique
 Puit 4 : Amorce EcoN sans ADN
 Puit 5: Amorce EcoP1 + ADN plasmidique
 Puit 6 : Amorce EcoP1 + ADN génomique
 Puit 7 : Amorce EcoN sans ADN
 Puit 8 : Amorce EcoN + amorce Ecop1 + ADN plasmidique
 Puit 9 : Amorce EcoN + amorce Ecop1 + ADN génomique
 Puit 10 : Amorce EcoN + amorce Ecop1 + sans ADN

Figure 11 : Produits de PCR effectué à 36°C séparés sur gel d'agarose (1 %)

Afin de favoriser l'hybridation, un second PCR a été effectué à 30 °C (Figure 12). À cette température, l'amorce EcoP1 ne s'hybride toujours pas. Par contre, on remarque un amplification importante avec les deux amorces pour l'ADN génomique à 800 paires de bases (pb). Compte tenu de son intensité, ce fragment d'ADN a été cloné et séquencé



Puit 1 : marqueur de poids moléculaire (1 kb)

Puit 2 : EcoP1 + ADN plasmidique

Puit 3 : EcoP1+ ADN génomique

Puit 4 : EcoP1 sans ADN

Puit 5: EcoP1+ EcoN + ADN plasmidique

Puit 6 : EcoP1+ EcoN + ADN génomique

Figure 12 : Produits de PCR effectué à 30°C séparés sur gel d'agarose 1 %

4.3.3 Clonage et séquençage du produit de PCR

Le fragment d'ADN désiré a été excisé du gel d'agarose, puis introduit dans un vecteur multicopie et transformé dans une souche de *E. coli*. Un transformant fut sélectionné suite à une digestion du vecteur avec l'enzyme EcoRI (X-L1 Blue). Le plasmide d'un transformant qui contient l'insert désiré a ensuite été séquençé (Figure13).

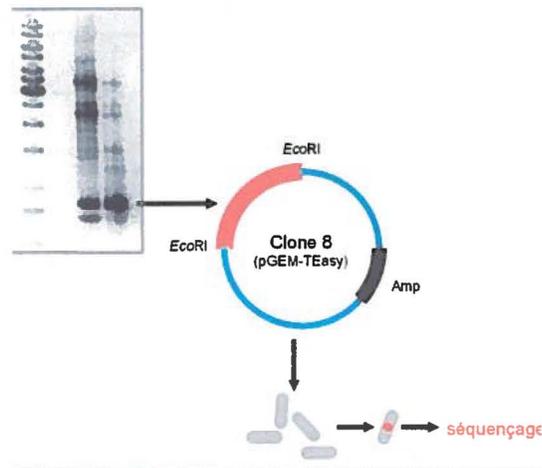


Figure 13: Clonage du fragment de 800 pb dans le vecteur GemPT-easy

Le séquençage a produit une séquence de 944 pb. Cette séquence en acides nucléiques a été convertie en séquence d'acides aminés dans les trois cadres de lecture possibles. Ensuite, une recherche a été effectuée afin de déterminer le cadre de lecture qui contient la séquence codante de l'amorce N-terminal (la séquence en acide nucléique est soulignée et la séquence en acides aminés est représenté en vert) :

```

      *G G * K * M D R L S E I F T W K S L K
      L R G L K M N G Q I K R D I Y M E K P E
      I E G V K N E W T D * A R Y L H G K A *
5' ATTGAGGGGGTTAAAAATGAATGGACAGATTAAGCGAGATATTTACATGGAAAAGCCTGA
      10          20          30          40          50          60
3' TAACTCCCCCAATTTTTACTTACCTGTCTAATTCGCTCTATAAATGTACCTTTTCGGACT
      N L P N F I F P C I L R S I * M S F G S
      Q P P * F H I S L N L S I N V H F L R F
      S P T L F S H V S * A L Y K C P F A Q L
  
```

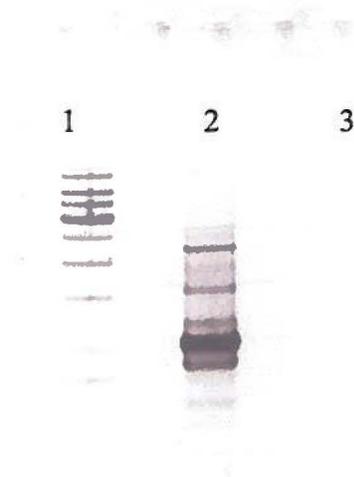
Dans le cadre de lecture de la séquence codant pour le N-terminal, il y a 2 codons stop (*) à proximité de la séquence. Ceci indique que la séquence présente dans ce cadre de lecture ne code pas pour un gène. Des recherches ont également été effectuées dans des banques de données. Les résultats obtenus révèlent que la

séquence présente dans un autre cadre de lecture a une homologie de 65 % avec une protéine de régulation (Glycosyl-3-phosphate). Le gène séquencé ne correspondrait donc pas au gène de l'estérase recherché.

4.3.4 Autres conditions d'hybridation

La séquence obtenue dans les conditions de PCR mentionnées précédemment n'a pas donné le résultat escompté. De nouvelles conditions d'hybridation furent tentées par "touch down PCR". Cette technique implique l'utilisation de diverses températures d'hybridation qui vont d'une température élevée à une température faible (55°C-33°C). Cette méthode vise à favoriser une hybridation plus spécifique de l'amorce à l'ADN-cible. Les amorces utilisées étaient EcoN et EcoP1. Dans ces conditions, un produit de PCR a été observé en présence de l'amorce EcoN seul ainsi qu'en présence des deux amorces. Les deux patrons d'amplification semblent identiques. Aucune amplification spécifique n'a été observée. Encore une fois, aucune amplification n'a été observée lorsque l'amorce EcoP1 est utilisée seule. L'amorce ne semble donc pas s'hybrider .

Afin de vérifier qu'une amplification spécifique aurait peut-être eu lieu en présence de l'amorce EcoP1 seule, mais qu'elle serait trop faible pour pouvoir visualiser le ADN amplifié sur gel, un PCR a été effectué avec les deux amorces (EcoN et EcoP1) à 36 °C à partir du produit de PCR obtenu par le " touch down" effectué précédemment. Dans ces conditions, un patron d'amplification a été observé sur gel. On remarque une amplification importante d'un fragment d'ADN de 1000 pb. qui a été cloné et séquencé (Figure14).



Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire (1Kb)

Puit 2 : Amorce EcoN + Amorce EcoP1 + produit de PCR du " touch down"

Puit 3 : Amorce EcoN + Amorce EcoP1 sans ADN

Figure 14 : Produit de PCR effectué à 36°C à partir du " touch down" PCR séparé sur gel d'agarose (1 %).

Un fragment de 1009 pb a été obtenu au séquençage. La séquence d'acides nucléiques fut convertie en séquence d'acides aminés dans les trois cadres de lecture possibles. Ensuite, le cadre de lecture où se retrouve la séquence codante N-terminal fut identifié :

```

      10      20      30      40      50      60
5' ATACAGGGGGTAAAGAATGACTATCCGGATGATTACAGCGAGAAGCACGAAGAAGAGCTG...
  I E G V K N D Y P D D Y S E K H E E E L
  * R G * R M T I R M I T A R S T K K S *
    R G G K E * L S G * L Q R E A R R R A D

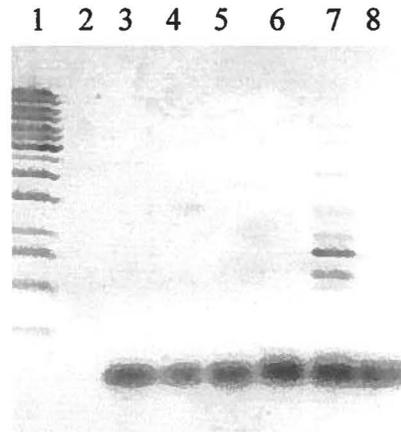
      670      680      690      700      710      720
...CGTCACCACGCGGACGTGCTGGCGCGTCGTCAATAAGGAGCATTGCCATGAAATTAAGTC...
  R H H A D V L A R R Q * G A L P * N * L
  V T T R T C W R V V N K E H C H E I N S
  S P R G R A G A S S I R S I A M K L T Q

```

Les recherches faites à partir des banques de données montrent une homologie de 79 % avec une séquence codante pour une perméase (glycerol-3-phosphate) retrouvée chez *E. coli*. La séquence codant pour cette protéine se retrouve dans le cadre de lecture de la séquence N-terminal. Donc, encore une fois, cette séquence ne code pas pour l'estérase recherchée. Ces recherches montrent également une séquence codante pour une estérase, mais cette séquence ne se retrouve pas dans le cadre de lecture de la séquence N-terminal. Elle ne correspond donc pas à l'estérase recherchée.

4.3.5 Nouvelles conditions de PCR

Deux tentatives ont été effectuées afin d'obtenir la séquence du gène codant pour l'estérase, mais elles ont été sans succès. Le principal problème était qu'une seule des deux amorces s'hybridait à l'ADN. Il devenait difficile de distinguer une hybridation spécifique d'une hybridation non spécifique. Une nouvelle amorce a donc été fabriquée (EcoP2) et un "touch down PCR" a été effectué avec les amorces EcoN et EcoP2 (Figure 15). Un patron d'amplification a été observé lorsque EcoN seul a été mis en présence de l'ADN chromosomique et plasmidique. Aucune amplification n'a été observée avec EcoP2 seul en présence des deux types d'ADN. Par contre, un patron d'amplification fut observé lorsque EcoN et EcoP2 étaient en présence de l'ADN plasmidique seulement. Aucun patron d'amplification ne fut observé lorsque les deux amorces ont été mises en présence de l'ADN chromosomique.



Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire (1 Kb)

Puit 3 : Amorce EcoP2 + ADN génomique

Puit 4 : Amorce EcoP2 + ADN plasmidique

Puit 5 : Amorce EcoP2 sans ADN

Puit 6 : Amorce EcoN + amorce Ecop2 + ADN génomique

Puit 7 : Amorce EcoN + amorce Ecop2 + ADN plasmidique

Puit 8 : Amorce EcoN + amorce Ecop2 + sans ADN

Figure 15: Produits de PCR fait à partir d'un "touch down PCR" séparés sur gel d'agarose (1 %)

Un second "touch down PCR" a été effectué avec le premier produit de PCR de l'amorce EcoP2 seul afin de s'assurer qu'il n'y avait aucune amplification, et non pas une amplification trop faible pour pouvoir la visualiser sur gel. Une très faible amplification a été observée sur gel avec le deuxième PCR. Contrairement à l'amorce EcoP1, l'amorce EcoP2 s'hybride à l'ADN.

Le patron d'amplification obtenu à partir des deux amorces et de l'ADN plasmidique démontre trois bandes intéressante à 1000, 800 et 600 pb. Le fragment de 600 paires de bases fut extrait du gel, cloné et séquencé. Ce fragment a donné une séquence de 591 paires de bases. La séquence fut convertie en séquence d'acides aminés dans les trois cadres de lecture possibles. La séquence codant pour le N-terminal ne fut pas retrouvée en entier, certains acides aminés étant remplacés par d'autres. La séquence obtenue codait pour une aminotransférase et n'était pas dans le bon cadre de lecture par rapport au N-terminal.

4.3.6 Alignement de séquences

Les séquences obtenues correspondant au N-terminal et à l'amorce EcoP2 ont été analysées dans des banques de données afin de déterminer s'il existe des gènes connus qui possèdent ces séquences (Annexe A). En ce qui concerne les recherches faites à partir du N-terminal, rien de concluant en est ressorti. Par contre, les recherches faites à partir du peptide interne montrent une forte homologie avec 11 séquences correspondant à des carboxylestérases provenant de différentes bactéries. Ces séquences furent alignées et analysées. Plusieurs séquences consensus ont été observées et deux d'entre elles sont composées de six acides aminés ou plus.

4.4 Test d'inhibition au DFP

Un test d'inhibition au DFP a été effectué dans le but de déterminer si le site catalytique de l'enzyme contenait une sérine active. Une certaine quantité d'enzyme a été incubée en présence du DFP et parallèlement une même quantité

d'enzyme fut incubée en absence de DFP. Suite au traitement, des tests d'activité enzymatique ont démontré qu'aucune activité enzymatique n'a été observée en présence de l'échantillon traité au DFP alors que l'activité résiduelle dans le témoin était de 16 %. Ce test semble confirmer qu'il y aurait une sérine active dans le site catalytique de l'enzyme .

Discussion

5.0 Discussion

5.1 Purification de l'estérase

La purification d'une protéine débute par la production en grande quantité de la protéine à purifier et implique l'utilisation de colonnes chromatographiques reposant sur des principes de séparation différents. Chaque protéine est unique et nécessite donc la mise au point de son propre protocole de purification. Différents facteurs doivent être pris en considération tel que le choix de la colonne, le choix du tampon et de son pH. Par exemple, lors d'une purification par échange ionique, les deux facteurs les plus importants sont le choix du tampon et le choix de son pH par rapport au type de matrice utilisée (cationique ou anionique). Il est important de s'assurer que le tampon choisi est adéquat, c'est-à-dire qu'il n'inhibe pas la fonction biologique de la protéine à purifier, dans le cas présent, son activité enzymatique. De plus, il doit favoriser les interactions de la protéine avec la matrice. Le pH, quant à lui, influence la charge de la protéine. Le choix d'un pH adéquat pour la purification est fait en fonction du point isoélectrique de la protéine à purifier, c'est-à-dire le pH à laquelle sa charge est neutre. Le pH de la phase mobile est alors ajusté afin d'obtenir la charge désirée sur la protéine selon le type de matrice choisie. Il est important de prendre en considération qu'une variation trop drastique du pH peut entraîner une inhibition irréversible de la fonction biologique ou une dénaturation de la protéine. Le poids moléculaire de la protéine à purifier est important lorsque la chromatographie d'exclusion (tamis moléculaire) est utilisée. Il existe sur le marché divers tamis moléculaires qui séparent les protéines selon différentes plages de masse moléculaire. Le poids moléculaire de la protéine à purifier est alors le facteur le plus important à considérer lors du choix d'une colonne chromatographique d'exclusion.

Pour la purification de l'estérase hydrolysant les parabènes, aucune information n'était disponible quant au poids moléculaire et au point isoélectrique de l'enzyme. Nous devons donc procéder par la méthode essai-erreur. La localisation de l'enzyme dans les différentes fractions ainsi que la quantification des paramètres de purification étaient suivies par des tests d'activité enzymatique en utilisant le propyle parabène comme substrat.

5.1.1 Purification de l'extrait initial à l'aide de la colonne cationique

Les colonnes à échanges ioniques sont très largement utilisées lors de purification de protéines. D'ailleurs Child et ses collaborateurs (1971) ont utilisé la colonne cationique CM Sephadex C-50 lors d'une étape de purification de l'estérase produite par *Aspergillus flavus*. Cette colonne a les mêmes propriétés que celle utilisée lors de la première étape de purification de l'estérase produite par *E. cloacae* (EM).

Donc, la première étape de purification a été effectuée à l'aide d'une colonne échangeuse faible de cations CM Sépharose AP-2. Cette colonne possède une matrice chargée négativement et retient au passage les protéines chargées positivement. La propriété échangeuse faible indique que la résine est chargée sur un petit écart de pH. Les colonnes échangeuses d'ions ont une bonne capacité de séparation puisque la résolution de la séparation est contrôlée par l'expérimentateur qui fait varier dans le temps la concentration du contre-ions. Cette méthode de séparation rend possible dès le début la départition de la majorité des protéines non désirées.

Un second facteur important à considérer est la capacité d'adsorption de la matrice. Ces matrices ne peuvent retenir qu'une certaine quantité de protéines, il est important de ne pas dépasser cette capacité, car le surplus sera automatiquement éliminé lors de l'étape d'adsorption. La colonne utilisée contenait 116 g de matrice dont la capacité était de 200 mg de protéines par gramme de matrice. La colonne pouvait donc adsorber jusqu'à 23 g de protéines. Comme il est cependant recommandé de ne pas dépasser 20 % de la capacité de la colonne, la capacité utile était donc de 4.6 g. La capacité de la colonne était donc adéquate pour nos besoins puisque l'échantillon de départ ne contenait que 1663 mg de protéines.

Le tampon MES/NaOH à 20 mM (pH 6.0) a été choisi pour cette étape de purification. Des tests d'activité enzymatique ont démontré que ce tampon n'inhibe pas l'activité de l'enzyme. Comme le point isoélectrique de l'enzyme était inconnu, des tests ont été effectués et ont démontré que l'enzyme est retenue par la matrice dans ces conditions de pH et de tampon.

Cette étape de purification a été très satisfaisante, plus de 98.2 % des protéines non désirées ont été éliminées pour un taux de récupération de l'activité enzymatique de 69.8 %.

5.1.2 Purification des fractions actives à l'aide de la colonne anionique

La seconde étape de purification a été la séparation des fractions actives sur une colonne échangeuse forte d'anions (QMA). La propriété échangeuse forte indique que la matrice est ionisée sur un large spectre de pH. Lors de la purification de l'estérase produite par *Bacillus circulans*, Kademi et ses collaborateurs (2000) ont utilisé la colonne Mono-Q dans l'une de leurs étapes de purification. Cette colonne

à échange anionique possède des propriétés semblables à celle utilisée pour purifier notre estérase.

La capacité d'adsorption de la colonne était de 360 mg de protéines et l'échantillon à purifier contenait 31 mg de protéines. Bien que plusieurs tentatives de purification furent effectués à différents pH (entre 6.5 et 8.0), l'enzyme n'a jamais été retenue par la colonne. Alors que d'autres protéines à des pH élevés (7.5-8.0) étaient si fortement accroché à la colonne qu'il était très difficile de les éluer. La molarité en sel a été augmentée jusqu'à 2 M afin de pouvoir décrocher toutes les protéines. Les raisons pour lesquelles l'enzyme n'a pas été retenue n'ont pas été élucidées, vraisemblablement le tampon utilisé n'était pas adéquat pour notre protéine et n'a pas favorisé son adsorption.

Lors de ces essais, il fut observé que de nombreuses protéines étaient retenues par la colonne. La fraction protéique qui n'a pas été retenue par la colonne a donc été conservée et les protéines qui ont été retenues par la matrice ont été rejetées. Les protéines qui n'ont pas été retenues par la colonne ont élué en deux pics bien distincts. La fraction qui a été conservée pour la prochaine étape de purification est celle correspondant au deuxième pic car elle présente l'activité enzymatique la plus élevée. L'activité enzymatique du premier pic était cependant relativement importante et il aurait été souhaitable de tenter de repurifier cette fraction. Mais, faute de temps, seule la deuxième fraction fut retenue.

Bien que le but de la purification par chromatographie d'affinité est l'adsorption de la protéine et son élution à l'aide d'un contre-ion, il arrive parfois qu'une purification négative s'avère efficace dans le protocole de purification. D'ailleurs, c'est ce qu'il fut démontré lors de la purification de la lipase produite par *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al.* 2000). Le protocole qui fut élaboré pour purifier cette enzyme comportait à l'étape 2 une purification sur une colonne Q-Sepharose. Or, l'enzyme

ne fut pas adsorbé sur cette colonne et l'éluant qui contenait l'enzyme fut conservé pour la prochaine étape de purification.

Finalement, cette étape de purification a quand même été relativement efficace, puisque 60 % des protéines ont été éliminées par rapport à la fraction précédent cette étape. Le taux de récupération de l'activité enzymatique est de 49 % par rapport au contenu de l'extrait de départ, ce qui est satisfaisant.

5.1.3 Purification de la fraction actives à l'aide de la colonne cationique

Pour la troisième étape de purification, une colonne cationique CM Avicell (Waters) a été utilisée. Cette matrice diffère de la première en ce qu'elle est échangeuse forte de cations. Ce qui veut dire qu'elle est ionisée sur une petite plage de pH. La colonne utilisée avait une capacité d'adsorption de 512 mg de protéines, pour un échantillon contenant 12 mg. Le tampon utilisé est le même que celui de la première étape. Le pH et le tampon n'ont pas été modifiés puisqu'ils n'affectent pas l'activité enzymatique et que dans ces conditions, l'enzyme était retenue par la matrice.

Plusieurs conditions d'élution furent tentées. Le gradient où la meilleure séparation fut obtenue était un gradient linéaire qui allait de 0 à 0.20 M en 40 minutes, avec un plateau de 10 minutes à 0.20 M NaCl qui a ensuite été utilisé. Dans ces conditions, il y a eu une bonne séparation des protéines à une concentration de 0.15 à 0.20 M de NaCl.

Cette étape de purification a permis d'éliminer 95 % des protéines et de récupérer 39 % de l'activité par rapport à la fraction précédent cette étape. Le taux de récupération de l'activité enzymatique par rapport à l'extrait de départ est de 17.3 %.

5.1.4 Purification de la fraction active à l'aide d'un tamis moléculaire

Suite à la séparation de la fraction active sur la colonne CM Avicell, il ne restait que très peu d'impuretés visibles sur gel d'acrylamide. Ces protéines contaminantes étaient en très faible concentration puisqu'elles n'étaient visibles qu'à la coloration au nitrate d'argent. La dernière étape de purification a été effectuée à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion. Cette méthode est fréquemment utilisée, dans les protocoles de purification (Child *et al.* 1971, Hiol *et al.* 2000, Kademi *et al.* 2000). La séparation s'effectue en fonction de la variation du poids moléculaire des protéines.

Comme le poids moléculaire de l'enzyme était inconnu, plusieurs tamis moléculaire ont été essayés dont le Protein Pack SW 300. Ce tamis permet de séparer des protéines ayant un poids moléculaire entre 10 000 et 300 000 Da. Avec ce tamis, une certaine séparation des protéines a été observée, mais il restait encore des impuretés dans les fractions actives. Une seconde tentative a été effectuée à l'aide de deux tamis moléculaire Protein Pack 125 couplés en série. Ce tamis permet de séparer des protéines ayant un poids moléculaire entre 2000 et 80 000 Da. Ce type de tamis était composé d'une matrice plus fine que la précédente et permettait un meilleur pouvoir de séparation pour les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 80 000 Da. L'utilisation de deux tamis en série augmente le pouvoir de séparation du système. Dans ces conditions l'enzyme a été obtenue pure. Or, les tests préliminaires furent effectués avec une très petite quantité d'échantillon dans

l'ordre du ng de protéine. Mais, dans la réalité nous avons une quantité beaucoup plus importante à purifier qui était dans l'ordre du μg de protéines. Lorsque que nous avons tenté la purification avec une plus grosse quantité en protéine, la résolution de la séparation n'était pas aussi bonne et l'enzyme ne fut pas purifiée. Afin d'augmenter la résolution de la séparation en fonction de la quantité en protéine que nous avons, une purification a été tentée à l'aide de deux tamis moléculaire Protein Pack SW 300 couplé en série. Dans ces conditions il fut possible de purifier l'enzyme en fonction de la quantité que nous avons.

Lors de cette dernière étape de purification, 30 % des protéines contenues dans la fraction précédente ont été éliminées pour une récupération de l'activité de 91 %. Le taux de récupération de l'activité enzymatique par rapport à l'extrait initial est de 15.9 % .

5.1.5 Tableau de purification

La purification de l'enzyme consistait à éliminer toutes les protéines étrangères, tout en perdant le moins possible de l'enzyme en cours de route. Il s'agissait donc d'obtenir des fractions successives où le rapport activité totale/protéines totales (activité spécifique) va en augmentant. Le maximum de ce rapport est atteint quand l'enzyme est pure (Pelmont, 1993). Le tableau de purification (Tableau 4, voir p.48) démontre que l'activité spécifique augmente à chaque étape de purification, ce qui indique que la démarche entreprise pour purifier l'enzyme semble adéquate.

Lors de cette purification, l'enzyme fut purifiée 572.9 fois et 15.9 % de l'activité enzymatique de départ a été récupérée. Il faut prendre note que les valeurs exactes du rendement et du taux de purification peuvent être entachées d'erreurs si le

dosage de l'activité dans l'extrait brut pose problème. Il est possible que l'extrait de départ contienne des substances étrangères qui interfèrent avec la mesure de l'activité enzymatique alors qu'elles seront éliminées par la suite. Par exemple, si la quantité d'enzyme dans l'extrait de départ est sous-évalué suite à la présence d'un inhibiteur, le rendement et le facteur de purification seront surévalués. Cela ne semble pas le cas ici vu l'importante activité enzymatique observé dans l'extrait de départ. Dans cette purification, le pourcentage de rendement est de 15.9 %. Un pourcentage plus important aurait pu être observé car il y a eu une perte importante de protéines lors du passage sur la colonne Avicell. Plusieurs conditions de purification ont été tentées sur la colonne Avicell avant d'obtenir une séparation acceptable. C'est lors de ces essais successifs que des quantités appréciables d'enzyme furent perdues. Il est vraisemblable que le pourcentage de rendement serait plus important lors d'une prochaine purification avec les conditions optimisées.

Une comparaison fut faite entre le tableau de purification de notre estérase avec celui de l'estérase produite par *B. circulans* (Kademi *et al.* 2000) et celui de l'estérase produite par *A. flavus* (Child *et al.* 1971). Les trois protocoles contiennent chacun 4 étapes de purification. Dans tous les cas on observe une augmentation de l'activité spécifique après chaque étape de purification. Ce qui diffère entre eux c'est le degré de purification et le pourcentage de rendement. En effet, dans le cas de l'estérase produite par *B. circulans* le taux de purification obtenu était de 711 et le rendement était de 1 %. Par contre, l'estérase produite par *A. flavus* l'enzyme a été purifiée 149 fois et le rendement obtenu était de 45 % comparativement à l'estérase produite par *E. cloacae* (EM) où l'enzyme fut purifiée 572.9 fois et le rendement obtenu fut de 15.9 %. On remarque que plus l'enzyme doit être purifiée, moins le taux de récupération de l'enzyme est important.

5.1.6 Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique de l'enzyme.

La purification de l'enzyme a permis d'identifier le poids moléculaire de l'enzyme qui est de 54 640 Daltons. Son point isoélectrique fut également identifié à 6.9. Ces résultats nous permettent de mieux comprendre ce qui c'est passé lors de la purification. Lors du passage de l'échantillon sur les colonne cationiques (CM AP-2 et Avicell), le pH du tampon était ajusté à 6.0. Dans ces conditions, l'enzyme était chargée positivement puisque le pH se situait en dessous de la valeur du point isoélectrique. Les échanges avec la matrice étaient alors favorisés. Par contre, lors du passage des fractions actives sur la colonne anionique QMA, le pH du tampon était ajusté à 7.0. Dans ces conditions, la charge de l'enzyme est neutre, ce qui vient expliquer pourquoi l'enzyme n'a pas été retenue sur la matrice.

En ce qui concerne le choix du tamis moléculaire, il était adéquat puisque l'enzyme était dans l'intervalle de séparation de la colonne (10 000 et 300 000 Daltons). Par contre, il faut comprendre que l'on doit tenir compte non seulement du pouvoir de séparation de la colonne, mais également de sa résolution. Comme la présence d'un seul tamis n'était pas suffisant pour séparer adéquatement l'enzyme des autres protéines, l'ajout d'un deuxième tamis a permis d'augmenter la résolution de la séparation et l'obtention de la protéine pure.

5.2 Essais d'isolement du gène codant pour l'estérase

Suite à l'obtention de la protéine pure, l'isolement du gène responsable de la synthèse de l'estérase purifiée a été tenté par l'utilisation d'amorces dégénérées. Cette méthode permet de cloner un gène nouveau ou non caractérisé appartenant a

une famille de gènes déjà connues (Compton,1990). Les deux facteurs les plus importants à considérer lors de l'utilisation de ce type d'oligonucléotides sont la dégénérescence et les conditions de PCR. Les amorces doivent être fabriqués à partir d'une région en acides aminé qui induira le moins possible de dégénérescence. Les conditions de PCR devront être optimisées afin qu'il y ait un équilibre entre l'efficacité de l'amplification et la spécificité du gène recherché.

La première étape consistait à obtenir deux amorces à partir de la séquence de l'enzyme purifiée. Une des approches a consisté à l'utilisation de la séquence du N-terminal pour produire une amorce dégénérée, tout comme l'on fait Fernandez et ses collaborateurs (2000) lors du séquençage du gène de la tributyrin esterase produite par *Lactococcus lactis*. Une autre séquence fut obtenue à partir d'un peptide généré par clivage au bromure de cyanogène. Une troisième séquence fut obtenue par séquençage par spectrométrie de masse de peptides obtenu par hydrolyse de l'enzyme à l'aide de la trypsine.

5.2.1 Séquençage d'un peptide par spectrométrie de masse

L'analyse de peptides et de protéines par spectrométrie de masse a connu un essor important au cour de la dernière décennie. C'est par cette technique que nous avons tenté d'obtenir une séquence peptidique de l'enzyme.

La première étape de l'analyse en spectrométrie de masse a été digestion à la trypsine de l'enzyme. Après purification avec un ZipTip, l'échantillon digéré est placé dans un fin capillaire qui est introduit dans le spectre de masse. Un courant est appliqué sur le capillaire et l'échantillon est nébulisé en fines gouttelettes chargées. Les peptides chargés sont expulsés des gouttelettes et amenées au premier

quadrupole où ils sont analysés en fonction de leur rapport m/z (masse/charge). Subséquemment, on peut sélectionner un ion et l'amener dans une cellule à collision où il est fragmenté par collision avec un gaz. Les fragments obtenus sont ensuite analysés avec le troisième quadrupole. L'analyse des fragments détectés permet la détermination de la séquence du peptide (Yates, 1998).

L'analyse d'une séquence en acides aminés par spectrométrie de masse est délicate. Tous les peptides détectés ne fragmentent pas de la même manière dans la cellule de collision et les fragments observés ne permettent pas nécessairement de reconstituer une séquence. Plusieurs acides aminés ont des masses identiques, tel la leucine et l'isoleucine ou la glutamine et la lysine, ou très voisines, comme l'asparagine et l'acide aspartique ou l'acide glutamique et la lysine. De plus, certaines séquences de deux acides aminés présentent la même masse que certains acides aminés plus lourds. La détermination de la séquence se fait par l'étude des différences de masse entre les différents ions qui correspondent généralement à la fragmentation du lien peptidique. Comme l'intensité des ions fragmentés est souvent faible, le bruit de fond est souvent relativement fort, ce qui complique d'autant l'analyse.

Dans l'expérimentation faite avec l'estérase, il a été possible d'obtenir la séquence d'un seul peptide bien que plusieurs peptides furent détectés et fragmentés. Une séquence de seulement 5 acides aminés fut obtenue. Plusieurs des ions fragmentés n'étaient pas des peptides alors que les autres avaient un bruit de fond trop important. Pour certains peptides, des séquences de seulement 2 ou 3 acides aminés ont été obtenues, ce qui était trop court pour nos besoins. Finalement, dans d'autres cas la séquence obtenue était trop dégénérée pour pouvoir l'utiliser. Un oligonucléotide dégénéré fut quand même produit à partir de la séquence de cinq acides aminés obtenue.

5.2.2 Amplification par PCR et séquençage.

Les premières tentatives d'amplification du gène par PCR ont été effectuées avec les amorces obtenues à partir du N-terminal (EcoN) et de la séquence obtenue en spectrométrie de masse (EcoP1). Des amplifications ont été effectuées avec de l'ADN plasmidique et chromosomique à des températures de 30°C et 36°C. Ces températures, plutôt basses, furent choisies afin de favoriser l'hybridation des amorces à l'ADN (Dominguez et Larrea, 1994.). La dégénérescence des amorces a entraîné l'amplification de plusieurs gènes. Dans ces conditions, l'amorce EcoP1 ne s'est pas hybridé à l'ADN. Il est possible que la dégénérescence de l'amorce soit trop importante ou que l'amorce soit trop petite pour s'hybrider. En effet, l'amorce faite à partir du N-terminal est composée de 21 nucléotides comparativement à EcoP1 qui en a seulement 15. De plus, nous remarquons que les patrons d'amplification de l'ADN génomique et plasmidique sont identiques. Il est possible que, dans ces conditions, l'amorce EcoN s'hybride seulement à l'ADN génomique. Lors d'une extraction de plasmide, il reste toujours un peu d'ADN génomique et se serait à ce dernier que l'amorce se serait hybridé. Une amplification importante fut observée à 800 paires de bases. Ce fragment fut cloné et séquençé. Malheureusement, les analyses de séquence ont révélé que ce gène codait pour une protéine de régulation (glycosyl-3-phosphate) et ne correspondait donc pas à l'estérase recherchée.

Une seconde approche fut tentée avec les deux même amorces en utilisant la technique du "touch down PCR". Ce PCR passe de températures élevées d'hybridation à des températures moins élevées (55°C-30°C). Cette technique est utilisée dans le but de favoriser une hybridation plus spécifique des amorces à l'ADN et ainsi éviter une amplification de gènes non recherchés (Don *et al.* 1991).

Le but de cette tentative était de faire s'hybrider l'amorce EcoP1 afin de pouvoir observer une amplification plus spécifique. Dans ces conditions, l'amorce EcoP1 ne s'hybride toujours pas à l'ADN. Par contre, une amplification importante avec l'amorce du N-terminal a été observée à 1000 paires de bases. Ce fragment fut cloné et séquencé. Les analyses de séquence ont révélé que ce gène codait pour une perméase (glycerol-3-phosphate).

Un troisième essai d'amplification fut tenté avec l'amorce EcoN qui s'hybride à l'ADN et une nouvelle amorce, EcoP2. L'approche qui fut utilisée est celle du "touch down PCR" en présence de l'ADN génomique et plasmidique. Contrairement à l'amorce EcoP1, l'amorce EcoP2 s'hybride à l'ADN. Par contre, une amplification ne fut observée qu'en présence de l'ADN plasmidique seulement. Un fragment de 591 paires de bases fut cloné et séquencé. Les analyses de séquences ont révélé que ce gène codait pour une aminotransférase. Ce gène codant pour une aminotransférase était également localisé sur un plasmide.

5.2.3 Alignement de séquences

La principale difficulté des différentes tentatives de séquençage du gène codant pour l'estérase décrites précédemment est l'utilisation d'amorces dégénérées. Bien qu'aucune de ces tentatives n'a permis d'identifier le gène codant pour l'estérase, des analyses dans des banques de données ont été effectuées avec la séquence des peptides qui ont servi à la fabrication des amorces. Les résultats révèlent une forte homologie de la séquence correspondant au peptide interne (EcoP2) avec 11 séquences connues de carboxylestérases chez différentes bactéries. Ces résultats laissent croire que l'estérase qui fut purifiée serait une carboxylestérase. Parmi les séquences consensus il y en a deux de six acides aminés et plus (référer à l'annexe

A). Des oligonucléotides moins dégénérés pourraient être produits à partir de ces séquences, ce qui favoriserait une hybridation plus spécifique à l'ADN et permettant ainsi la localisation et le séquençage de l'estérase recherchée.

5.3 Test d'inhibition au DFP

Des tests d'inhibition enzymatique au DFP ont été effectués en présence de l'enzyme. Ce test visait à démontrer la présence d'une sérine active dans le site catalytique de notre estérase. Le DFP réagit avec la sérine activée, inhibant ainsi l'activité enzymatique. Ce test est couramment utilisé pour la caractérisation enzymatique, à savoir si l'enzyme est sensible ou résistante au DFP (Goullet et Picard, 1990, Gillot et André, 1995, Tesch *et al.* 1996, Manco *et al.* 2000)

Le test que nous avons effectué démontre une inhibition complète de l'activité enzymatique et 16 % de l'activité enzymatique fut retrouvé dans le témoin. Ceci semble indiquer que notre estérase aurait dans son site catalytique une sérine activée comme on en retrouve dans un grand nombre d'estérases (Winkler *et al.* 1994). Le faible pourcentage d'activité retrouvé dans le groupe témoin fut expliqué par les rigueurs du traitement. En effet, l'incubation de l'échantillon à la température de la pièce, l'évaporation des solvants sous jet d'azote et les dialyses sont toutes des étapes où l'enzyme est susceptible de perdre une partie son activité.

Conclusion

6.0 Conclusion

Ce travail met en relief un nouveau mécanisme de résistance des bactéries vis-à-vis les parabènes. Bien qu'un certain nombre d'études eurent été effectuées sur la résistance bactérienne envers les parabènes, aucune estérase n'avait été mise en évidence ou isolée jusqu'à présent.

L'objectif principal de ce travail était donc de purifier et d'effectuer une première caractérisation de l'estérase produite par la souche d'*Enterobacter cloacae* (EM) hydrolysant les parabènes. Les différentes purifications effectuées à l'aide de diverses méthodes chromatographiques nous ont amené à obtenir une certaine quantité de l'enzyme pure. Nous avons déterminé son poids moléculaire (54 640 Daltons) et son point isoélectrique (6.9).

Les travaux de séquençage ont été entamés sans toutefois pouvoir être terminés. Des essais ont été effectués à l'aide d'amorces dégénérées obtenues à partir du N-terminal et de deux séquences peptidiques internes. Plusieurs essais furent effectués mais aucuns d'entre eux n'a permis l'obtention de la séquence de l'enzyme. Cela est dû vraisemblablement à la dégénérescence des amorces qui provoque plusieurs amplifications non spécifiques du gène recherché.

Une comparaison de séquence effectuée avec un séquence peptidique interne (EcoP2) dans les banques de données a démontré une forte homologie avec 11 séquences connues de carboxylestérase. Ces séquences furent alignées et plusieurs régions consensus furent identifiées. Dans le futur, il serait intéressant de produire des

oligonucléotides à partir des séquences conservées afin de compléter le séquençage de l'enzyme. De plus il serait intéressant de vérifier si cette estérase contient le motif Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly hautement conservé au site actif des estérases.

Des tests d'inhibition enzymatique effectués à l'aide du DFP ont permis de démontrer que l'estérase possède une sérine active dans son site catalytique comme on en retrouve chez plusieurs estérases.

Finalement, aucun test n'a permis de démontrer l'implication du plasmide dans la résistance de la bactérie face aux parabènes. Il serait intéressant de tenter d'introduire le plasmide de la souche résistante chez la souche sauvage. Il serait alors possible de déterminer si la résistance est due au plasmide ou non.

Annexes

Annexe A

**Alignement des séquences obtenues dans les banques
de données (Blast) à partir de EcoP2**

Annexe A

Alignement des 11 séquences ressorties par les analyses effectuées avec le peptide interne EcoP2 et EcoN

| | | |
|-----------------|-----------------------------|----------|
| est.msf{dinol} | = Dinococcus radiodurans | AA12163 |
| est.msf{dion2} | idem | H75522 |
| est.msf{comaci} | Comamonas acidovorans | BAA76305 |
| est.msf{stco2} | Streptococcus coelicolar | CAB55678 |
| est.msf{stco3} | idem | T35910 |
| est.msf{ps23} | Pseudomonas sp BP-23 | CAB32083 |
| est.msf{ps7} | Pseudomonas sp BP-7 | CAB93516 |
| est.msf{mtub} | Mycobacterium Tuberculosis | CAA17259 |
| est.msf{arthro} | Arthrobacter oxidans | Q01470 |
| est.msf{myzo} | Myzus persicae (eucaryotes) | X74555 |
| est.msf{cele} | C. elegans (eucaryotes) | JC1374 |

```

est.msf{dinol} mnravtllaalslsaslgps alaqsapvtsatpastaap aaparvqapaGtfvG...qd raG..vrswlGIPYAqPPVG daRwqpPralpasqaeRttt
est.msf{dion2} ~~~~~~mkrwlawtaltlgglaq aaapqlrveqGtlnG...ka vns..vqqflGvPfAaPPVG plRwqpPqP.pvWsgQRdat
est.msf{comaci} ~mnsrsltkairfptilala gfsvlqacggsdndssnnq gapavaiTvaGqvqa...vd rlG..mrryfGIPfAaPPVG nlRwmpPaPpqsWaaplakt
est.msf{stco2} ~~~~~~mqrea vpvvvfkTrhGsvrG...fr asG.dvvavlGvPYAaAaPfg vhrFREPaPapaWtGvRdgr
est.msf{stco3} ~~~~~~mrsq qtnpvvrTvhGavG...r yeh.dvavfrGIPYAaPPfG pgRFrpPlPpepWdGvRdag
est.msf{ps23} ~~~~~~mr elqv..qTkyGkvqG...el lqG..asvwkGIPYAaPPVG emRFqaPtqpesWdGiRqat
est.msf{ps7} ~~~~~~ms esvv..kTqyGtvkG...is knG..vqtwkGIPYAaPPVG qlRFkaPdPaaWeGvldat
est.msf{mtub} ~~~~~~malesatvgsmh ertvvarTatGiveG...ft rdG..vhrwrsIPYAraPVG slRFraPqPaqpWpGvRhch
est.msf{arthro} ~~~~~~mi trpi.ahTtaGdlG...cl edG..lyvfrGvPYAePPVG dlRwraarPhagWtGvRdas
est.msf{myzo} ~~~~~~mkn tcgillnflflfigcfltcsa sntpkvqvhSgeiaGgfeyt ynGrkiysflGIPYAaPPVq nnRFkePqPvqWlGvwnat
est.msf{cele} ~~~~~~mvllflflstllhisist rvqlstgTieGkiltstysp lgnhtgigflGIPfvePPaG nlRFrkPrPpipWdGiletK
Consensus -----T--G--G----- --G-----GIPYA-PPVG --RF--P-P---W-G-R---

```

QELSP VVQMSKGTIEGVKND (EcoN)

```

101
est.msf{dinol} qpGaacvQtlsvpqmdkq... . . . . .vrgaEDCLfLNVyaP. . . . .tnaqka.PvMVWIHGG sfqmGagsd...y.DlsvL AreqgvVaVslNYRLGalGF
est.msf{dion2} qfGPacaQg...dg..... . . . . .gsEDCLtLNiyrP. . . . .pnakna.PllVWvHGG fftgDasl...f.DgsaL ArergvVvatvNYRLGlyGF
est.msf{comaci} qsnapcmQtgatdpl.rl.. . . . .pngtEDCLyLdVhaP. . . . .atgeppfPvMVWIHGG afsiGgtit...yaDpspL v.skgvivVniaYRmGamGF
est.msf{stco2} sfGPvapQs.....arlpq apvwspgdEDiLtvNlwtP. . . . .ap.dggplPvMVWIHGG aytfGssaQ...pdfDgtvL Arag.lVvVtlnYRiGfeGF
est.msf{stco3} sfGPTapkpypseafaryls dpa.ipgd.DCLnLNvwtP. . . . .epgpgarlPvMVWIHGG altrGssav...pvyDgstf Ardg.vVcVsvNYRLGveGy
est.msf{ps23} efGPeniQprh...dsew.m ggqkppesEDsLyLNiwaP. . . . .ekesshplPvMVWIHGa sfvtGsgsl...pvyDgtqL AvrgdvivVtiNYRLGplGF
est.msf{ps7} ayGPvcpQppd...llsy.s ypelprqsEDCLyVNVfaP. . . . .dtpgkn.rPvMVWIHGG tfylGagse...plyDgsnL AaggdviviVtlnYRLGpfGF
est.msf{mtub} tfancapQqrr...ytvm.g igryqtrsEDCLtLNvvtP. . . . .eepatqplPvMVWIHGG gyilGssat...piyDgaal Arrg.cVyVsvNYRLGalGC
est.msf{arthro} ayGPSapQpvepggspl.g thgdppfdEDCLtLNlwtP. . . . .nldggs.rPvMVWIHGG glltGsgnl...pnyatdtf ArdgdLVgisiNYRLGplGF
est.msf{myzo} vpGsac.....lgiefg sgskiigqEDCLfLNVytPk lpqensagdlmnViVhIHGG gyyfGegil....ygphyL ldnddfVyVsiNYRLGvlGF
est.msf{cele} eykPacmsdak....ktyk ngvggpisEDCLyaNVftnq ycmk...rkncsVmivvHGG riltesasafnpeilvnnfv gqgrniVvVtfnYRLGtfgf
Consensus --GP---Q----- EDCL-LNV--P- -----PV-VWIHGG ----G-----D---L A-----V-V--NYRLG--GF

```

```

201
est.msf{dino1} Latpaldtaqgt.agNlGLL DQqALkKWvRDNIAAFGGDa qnVTvfGeSAGgmSicaqLA sPgAaGLFdkAIiqSgpc.. ta.p.gimqsræaynl...
est.msf{dion2} Lavpgv....t.dgNaGLy DilgAvrWlkqNaAsiGaDP gniTlaGqSAGaaaiCTLLa aPsAaGLFqkAIlqSgsc.. aa.p.ifqtplgdarrk...
est.msf{comaci} Lghpslraadgt.vgNyGim DQqaALrWVqDNIAAFGGDk snVTifGeSAGgfSvmthLA sPlskGLFakAIvqSggy.. gf.drqltqaqleaqstsiv
est.msf{stco2} ghvpp..dgpiaphdNrGLL DQvaALrWVreNIAAFGGEP gnVTvaGqSsGaaSvacLmv mdrArGLFhrAIahSpas.. pc..yprdiaaattrevaaa
est.msf{stco3} g.lfp..dapa....NaGLr DQiaALqWvRDNIAAFGGDP drVTvaGqSAGaiStgaLLa aPrArGLFrrAvlqSgap.. ea..adrkvrmmvrrmasr
est.msf{ps23} Lhmaplgegyv...sNaGLL DQvaALqWvkdNItaFGGDP nqVTvfGeSAGsmSiaaLma mPaAkGLFqrAImeS.ga.. s.qfmpaeqasalregmlkv
est.msf{ps7} Lhlssideays...dnlGLL DQtaALkWWkdNIAFGGDP enVTvfGeSAGgmSiaaLLa mPaAkGLFqkAileS.gs.. s.rtmteekaastahafLri
est.msf{mtub} LdlsslstpqtildsNvyLr DlvlALrWVhDNIAeFGGDP gnVTifGeSAGahitatLLa vPaAkGLFarAiseSpaa.. g.mvrsrevaaeafarfanl
est.msf{arthro} L..agmg.....deNvWlt DQveALrWiaDNvAAFGGDP nriTlvGqSgGaySiaaLaq hPvArqLFhrAIlqSppf.. gmqphTveestartkalarh
est.msf{myzo} ....astgdgvlpgNnGLk DQvaALkwiqqNiVAFGGDP nsVTitGmSAGasSvhhnLi sPmskGLFnrAIiqSgsa.. fchwstaenvaqkkyianl
est.msf{cele} gvlng....ekgdsNvGmf DmleAvkWtrkevhnFGGnk dklTmvGhSAGslvgafTs sPlskGmlnqqIimSgalyq mgklanfkgmtamaqkagcl
Consensus L-----N-GL- DQ--AL-WV-DNIAAFGGDP --VT--G-SAG--S---LLA -P-A-GLF--AI--S-----

```

A GYFAKGLFNRAIVSKGY (EcoP2)

301

400

| | | | | | |
|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| est.msf{dinol} | .Gsrfaaav.gcdpad.aac | Lravpadklvltrspnaafp | gavp..fpPVyg....dstv | PraPaevlrqGqn.a.Vp1l | iGtnlnEGtlFaafvg.... |
| est.msf{dion2} | .Gelfsral.rcdrgetatc | Lrgksraeldgvrltgrgpv | dpvp..lpPVyg....dali | PlrPqdafaqGqslk.Vavm | lGinreEGqiFepy1p.... |
| est.msf{comaci} | nsalaaagv.scptvd.aac | Lrglsaelvnnqlataftta | nwsp..vpsVdg....kvL | PksikatfvaGennk.Vplv | nGsnqdEwsyFvasre.... |
| est.msf{stco2} | aGcpa..tsaglrsttpqal | vaaadqvadvgyrrdpasgr | hydpslyPVld....ddvL | PtdPltgmaaG.aardVdl1 | vchteEy..wlldav.... |
| est.msf{stco3} | lkipa..taeafaaardrdql | Lraqaev..grfsspvlgg. | ...pg.fglVvd....gdvL | PrdPlealvdGdaapgVdlm | mGwtrdEyrlwlvpg.... |
| est.msf{ps23} | lGv.drdnleklnsipveqi | maaa.evkvqqsg.....a | gm.allfqPVld....getL | PqvPlqavseG.sakdVsil | iGttlhEGalFigphv.... |
| est.msf{ps7} | lGi.dghhldrlhtvsaedl | Lkaa.dqlrkten.....e | nifqlffqPald....pktL | PaePeqaiiaeG.aadgipl1 | iGtnrdEGylFftpds.... |
| est.msf{mtub} | iGartqdaanalmqaspaql | veaqhh1irggmr.....k | rlgafpigPVfg....ddyL | PmdPveamrsG.rvhaVpli | vGtnaeEGrlFtrflg.... |
| est.msf{arthro} | lG...hddiealrhepwerl | iqgtigvlmehtk.....f | gewplafyPVfd....eati | PrhPiesiids....dieii | iGwtrdEGtfpfafdp.... |
| est.msf{myzo} | lGcptnnsveiv.....ec | Lrsrpakaiaksylnfmpwr | nfpftpfGptvevagyekfL | PdiPeklv.....phdipvl | isiaqdEGliFstflgleng |
| est.msf{cele} | pevfgrkrlsqvridktysc | Lrnisaqevldaqlwvlqnt | tyy.....isvphidgefL | lnysdeilasG.tihpinsm | iGttaE.....1rdpiyi |
| Consensus | -G----- | L----- | -----PV-----L | P--P-----G-----V--- | -G----EG--F----- |

401

500

| | | | | | |
|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| est.msf{dinol} |dprrdlnaaeflg. | lnavlngnnapra...llay | nsrtsgrtqa.aaasatDs | lFacpssnlArd.isrf.tP | vysYeFrdpnPprpaqlrpt |
| est.msf{dion2} |dllrgsrtlyrag. | l.tlinplqawal...ggry | plrsdeqpira.vtrlltDq | vFacptswlAgk.lgag.lP | tyfYeFsdprP..plqlagk |
| est.msf{comaci} |lvagpltaaqypsy | lqtslglpplslatvypltdy | gtntaqqpsla.ataagtDm | hFscpalnlskrvlsqa.tP | ifmYeFrd.rtaipsigrnt |
| est.msf{stco2} |gssakvtt..daql | arfa..edfglpdglvagYr | aalprapvldv.ylavfgDl | lFgeyanrlA.evhara.g. | graflsrfdrrradp.... |
| est.msf{stco3} |glvervdr1gaval | agar..archcgnevvrqYr | aarpgaetaei.vgqlvtDh | llripmhrvA.d..arp.gs | shvYeFawpsnlpdl.... |
| est.msf{ps23} |pyskdidmvqgvnf | mtp...dlen.rvaiadsY. | .pk..tadgqa...qvmtDm | fFwsalqyA.aaqqqh.aP | vwmYrFdwvmPehpl.... |
| est.msf{ps7} |evhsqetidealey | llg...qpla.kka.adlY. | .pr..slesqi...himtDl | lFwrpavacA.sagsry.aP | vwmYrFdw.hPdkpp.... |
| est.msf{mtub} |mlptnepmve..el | lsgm..kpad.reritaaY. | .pnypapsaci...qlggDf | aFssaawqiA.eahgan.aP | tylYrydya.Prtlr.... |
| est.msf{arthro} |qv.sqadrdqvesw | lqkr..fgdh.aasayeah. | .agdgtspwtv.ianvvgDe | lFhsagyrvA.deratr.rP | vraYqFdvvsPlsd.... |
| est.msf{myzo} | fnelnnwnehlphilidyny | tisnenlrfktaqdikefYf | gdkpisketksnlskmisDr | sFgygtskaAqhiaakntaP | vyfYeFgysgnysyvaiffdp |
| est.msf{cele} | ndlknadkkeellknlcehi | gyelytepeefsrkckfYg | ngdda.....fladDm | eFydgsikvA.nahaskntk | vfiYdykdagP.....af |
| Consensus | ----- | -----Y- | -----D- | -F-----A-----P | ---Y-F---P----- |

501

600

| | | | | | |
|-----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| est.msf{dinol} | vgvp.sfgAfHgsEivsV.. | .tgtp.sglgnpsdftpaq. | aeLsrtmqtyWanFArtGnP | ngag..lpqWaaftteqpqV | lgl...apgevtvpqdfrae |
| est.msf{dion2} | vnvp.nlqAyHgaElayV.. | .ldtpvvgvsdpaqfssaqa. | akLaaqmgeyWtnFARsGqP | aslg..ltvWPtfnpafpqV | mtl...epgatalpknfdgr |
| est.msf{comaci} | isf..nqgAgHtyElqy... |lfnlrdletaeh | rdLqasmaryWtnFARtsnP | nngdpvatsWPaftgp.tkV | lglldvasaggirelatfetd |
| est.msf{stco2} | ..ga.vvrAwHcadvpfaFg | nldderlaf1ig.gaptaad | qgLarrmvraWadFAatGsP | g.....WP.....p.V | r...dssteateateateak |
| est.msf{stco3} | ..ga.c....HalElgfVFd | sgdgpdar1lagegap.... | qeLadamhgaWvrFAetGdP | g.....Wgawdaahp.V | rvfgdgaphtaygpldpeyd |
| est.msf{ps23} | ..lk...rAiHsiEmffVFn | tldal..kfm..kaepdeaa | kaLalkvqdaWiaFAkdGkP | svag..ik.WPeyskd.rat | lifnhe.ievvhd...pess |
| est.msf{ps7} | ..yn...kAfHalElpfVFg | lnngl..krmv.qaditdev | kqLshtiqaWlaFAktGnP | sced..vg.WPaytedkret | lilnse.lsiehd...pdge |
| est.msf{mtub} | ..ws.gfgAtHatElfaVFd | iyrrtrfgallt.aaadrrea | lrvsnevqrrWrcFsqiGvP | ...g..dd.WPaytqddraV | lvfdrd.criefd...phqh |
| est.msf{arthro} | ..g.algAvHciEmpftFa | nldrwtgkpfv.dgldpdvv | arvtnvlhqaWiaFvrtGdP | thdq..lpvWPtfraddpaV | lvvgdegaevardlarpdhv |
| est.msf{myzo} | ksysrgssptHgdEtnyVl | kvdgftv.....ydneed | rkmiaktmzniWatFiksGvP | dtensei..Wlpvsknpadl | frftkitqqgtfeareqstm |
| est.msf{cele} | kkyaqappphHsedliyVFg | t.....srgnftekd | yvieiqisygmfadFvnfGnP | spske..qkWkeyspekrey | flidfdknftmpgtrdgys |
| Consensus | -----A-H--E--VF- | ----- | --L-----W--FA--G-P | -----WP-----V | ----- |

Bibliographie :

Aalto, T.R.; Firman, M.C; Rigler, N.E. 1953. P-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. Antibacterial and antifungal studies, properties and determination. J.Am. Pharm. Assoc. **42** :449-457

Bernner, S. 1988. The molecular evolution of gene and proteins-a tale of 2 serines. Nature. **344** : 528-530.

Blow, D.M.; Birkhoff, J.J.; Hartley, B.S. 1969. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. Nature. **221** : 337-340.

Blum, H.; Beier, M.; Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**, 93-98.

Bourne, C.P.; Isupov, M.N.; Littlechild, J. A. 2000. The atomic-resolution structure of a novel bacterial esterase. Structure. Vol.8 , **2** : 143-151.

Cheetham, P.S.J. 1991. The flavour and fragrance industry. Dans : Biotechnology, the science and the business, Eds. V. Moses et R.E. Cape., Harwood Acad., London. P. 481-506.

Child, J. J.; Oka, T.; Simpson, F.J.; Krishnamurty, H.G. 1971. Purification and properties of a phenol carboxylic acid acyl esterase from *Apergillus flavus*. Can. J. Microbiol. **17** :1455-1463.

Compton, T.1990. Degenerate primers for DNA amplification. PCR protocols : Guide to methods and applications. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.;insky, J.J.; White, T.J. (Eds). Academic Press, London. P. 39-45.

Cygler, M.; Shrag, M.J.; Sussman, L.J.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, K.M.; Bupendra, P. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related protein. Prot. Sc. **2** : 366-382.

DiPersio, L.P.; Fontaine, R.N.; Hui, D.Y. 1990. Site-specific mutagenesis of an essential histidine residue in pancreatic cholesterol esterase. J. Biol. Chem. **266** : 4033-4036.

DiPersio, L.P.; Fontaine, R.N.; Hui, D.Y. 1991. Identification of the active serine in pancreatic cholesterol esterase by chemical modification and site-specific mutagenesis. J. Biol. Chem. **265** : 16801-16806.

Dominguez, O.; Lopez-Larrea, C. 1994. Gene walking by unpredictably primed PCR. Nucleic acids research. **22** : 3247-3248.

Don, R.H.; Cox, P.T.; Wainwright, B.J.; Baker, K.; Mattick, J.S. 1991. Toutch down PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic acids reasearch. **14** : 4008.

Dziedzic, J.D. 1986. Biotechnology and flavor development : an industrial research perspective. Food Technol. **40**(4) : 108-113,120.

Eklund, T. 1980. Inhibition of growth and uptake process in bacteria by some chemical food preservatives. Appl. Bact. **48** : 423-432.

Fernandez, L.; Beerthuyzen, M. M.; Brown, J.; Siezen, R; Coolbear, T.; Holland, R.; Kuipers, O. 2000. Cloning, characterisation, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. Appl. And Env. Microbiol. Apr. 2000, 1360-1368.

Freese, E.; Levin, B.C . 1978. Action mecanisms of preservatives and antiseptics. Developements in Industrial Microbiology. **19** :207-227.

Freese, E.; Sheu, C.W. ; Galliers, E. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, London **241**, 321-325.

Furr, J.R.; Russell, A.D. 1972. Effects of esters of p-hydroxybenzoic acid on spheroplasts of *Serratia marcescens* and protoplasts of *Bacillis megaterium*. Microbios. **6** : 47-54.

Gibney, G.; Camp, S.; Dionne, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P. 1990. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87** : 7546-7550.

Gilliland, D.; Li W. P.; A.; Scott, E. 1978. Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinaison using a factorial design. J. Appl. Microbiol. 72 : 258-261.

Gillot, P.; André, P. 1995. Characterization of five esterases from *Listeria monocytogenes* and use of their electrophoretic polymorphism for strain typing. Appl. And Env. Mocirobiol. Apr. 1995, 1661-1665.

Gottfried, N.S. 1962. Alkyl P-hydroxybenzoate esters as pharmaceutical preservatives. A review of the parabens. Am. J. Hosp. Pharm. 19 : 310-314

Gould, W.G. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. Int. J. of Food Microbiol. 33 : 51-64.

Goulet, P.; Picard, B. 1990. Charaterization of enterobacteria by esterase specific-activity profile. Journ. Of Gen. Microbiol. 136 : 431-440.

Haag, E. T.; Loncrini, F. D.1988. Esters of para-hydroxybenzoic acid. Cosmet. Scie. Technol. Ser. (Cosmet. Drug. Preserv.) 1 : 63-77.

Haruki, M.; Ohashi, Y.; Mizuguchi, S.; Matsuo, Y.; Morikawa, M.; Kanaya, A. 1999. Identification of catalytically essential residues in *Escherichia coli* esterase by site-directed mutagenesis. FEBS Letters. 454 : 262-266.

Hiol, A.; Jonzo M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. 2000. Purification and charaterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Tech. 26 : 421-430.

Huis in't Veld 1996. General introduction to food spoilage. Int. J. Food Microbiol. 46 :63-65.

Ingolf, F. N.; Eklund, T. 1983. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Journ. of Appl. Bact. 54 : 237-242.

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

Keweloh, H.; Diefenbach, R.; Rehm H-J. 1991. Increase of phenol tolerance of Escherichia coli by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. Arch. Microbiol. **157** : 49-53.

Komagata, K.; Suzuki K.I. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. Meth. in Microbiol. **19** : 161-207.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, vol. 227, **259** : 680-685.

Le Gendre, N.; Matsudaira, P. 1988. Direct protein microsequencing from immobilized-P transfert membrane. Biotechniques. Feb, vol 6, **2** : 154-159.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L.; Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

Ma Y., R.E. Marquis 1996. Irreversible paraben inhibition of glycolysis by Streptococcus mutans GS-5. Letters in Applied Microbiology, **23** : 329-333.

Manco, G.; Giosue, E.; D'Auria, S.; Herman, P.; Carrea, G.; Rossi, M. 2000. Cloning, Overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon Archaeoglobus fulgidus. Arch. of Bioch. and Biophys. Vol. **373**, **1** : 182-192.

Nikaido, H.; Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. **49** : 1-32.

Ollis, D.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franksen, S.; Harel, M.; Remington, S.J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J. L.; Verschueren, K.G.H.; Goldman, A. 1992. The α/β hydrolase fold. Protéin Eng. **5** : 1997-211.

Oka, S. 1964. Mechanism of antimicrobial effect of various food preservatives. In microbial inhibitors in food, Almquist et Wiksell ed., Stockholm N., p2-16.
Pelmont, Jean 1993. Enzymes. Collection Grenoble sciences. Presses universitaires de Grenoble, p.167-169.

Roberts, T.A. 1989. Combination of antimicrobial and processing methods. Food Technol. **43** : 156-163.

Russell, N.J. 1989. Functions of lipids: structural roles and membrane functions. Microbial Lipids. **2** : 279-365.

Russell, A.D.; Jenkins, J.; Harrison I. H. 1967. The inclusion of antimicrobial agents in pharmaceutical products . Adv. Appl. Microbiol. **9** : 1-38.

Pelmont, Jean 1993. Enzymes. Collection Grenoble sciences. Presses universitaires de Grenoble, p.167-169.

Sabalitschka, T. 1924. Chemische Konstitution and Conservierungsvermogen. Chem. ZTG., **48** : 703

Sarda, L.; Desnuelle, P.1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochim. Biophys. Acta **30** : 513-521.

Schrag, J.D.; Li, Y.; Wu, S.; Cygler, M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of lipase from *Geotrichum candidum*. Nature. **351** : 761-765.

Shiralkar, N.D.; Rege, D.V. 1978. Mechanism of action of p-hydroxybenzoates. Indian Food Packer **32** (2) : 34-41.

Slabas, A.R.; Windust, J.; Sidebottom, C.M. 1990. Does sequence similarity of human choline esterase, *Torpedo* acetylcholine esterase and *Geotrichum candidum* lipase reveal the active site serine residue ? Biochem. J. **269** : 279-280

Sokolski, W.T.; Chidester, CG.; Honeywell,G.E.1962. The hydrolysis of methyl P-hydroxybenzoate by *Cladosporium resianae*. Dev. Ind. Microbiol. **3** :179-187.

Suemitsu, R.; Horiuchi, K.; Yanagawase, S.; Okamatsu, T. 1990. Biotransformation activity of *pseudomonas cepacia* on p-hydroxybenzoates and Benzalkonium chloride. J. Antibact. Antifung. Agents. Vol. 18, **12** : 579-582.

Sussman, J. S.; Harel, M.; Frolov, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L. Silman, I. 1991: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* : A prototypic acetylcholine-binding protein. Science. **253** : 872-879.

Tesch, C.; Nikoleit, K.; Gnau, V.; Götz, F.; Bormann, C.1996. Biochemical and molecular characterisation of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. Journ. of Bact. Vol. **178**, **7** : 1858-1865.

Tsujita, T.; Shirai, K.; Saito, Y.; Okuda, H. 1990. Relationship between lipase and esterase. Isoenzymes : structure, function, and use in biology and medicine, Wiley-liss Inc. p.915-933.

Tsuchido, T.; Takano, M. 1988. Sensibilisation by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antimicrobial compounds. Food technol. **43** : 143-147, 155.

Valéanu, L. 1993. Élucidation de la résistance aux parabènes chez *Enterobacter geroviae* et *Enterobacter cloacae*. Mémoire présenté à l'Intitut Armand-Frappier, Laval Canada. 158 P.

Venger, R.; Haas, G. H. 1973. Enzyme reaction in a membrane model. 1 : A new technique to study enzyme reactions in monolayers. Chem Phys Lipids. **10** : 127-136.

Wei, Y.; Schottel, J.L.; Derewenda, U.; Sweson, L.; Patkar, S.; Derewenda, Z.S. 1995. A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. Nat. Struct. Biol. **2** :218-223.

Wills, E.D. 1965. Dans : advances in lipid research. Vol.3 (Aoletti R. and Kritchevsky, D, ed.) Academic press, New York . p.197-240.

Wilson, C.O.; Gisvold, O. 1956. Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, 3rd Ed., Lippincott, Philadelphia., Pa. P.11

Winkler, FK; Gubernator, K. 1994. Structure and mecanism of human pancreatic lipase: In Woolley P., Petersen SB (ed) Lipases : Their structure, biochemistry and applications. Cambridge University press, p.139-157.

Yates, J.R. 1998. Mass Spectrometry and age of the proteome. Journal of Mass Spectrometry. **33** :1-19.

Zedan, H. H.; Serry M. F. 1982. Utilisation of p-hydroxybenzoic acid ester combination for growth by microbial contaminants recovered from non sterile pharmaceuticals and manufacturing areas. Egypt. J. Pharm. Sci., **23**, No. 1-4, pp 69-79

Zedan, H. H. ; Serry, M. F. 1982 (a). In vitro resistance of microbial contaminants recovered from non sterile pharmaceuticals and manufacturing areas to various preservatives. Egypt. J. Pharm. Sci., **23**, No. 1-4, pp 81-99.

Zedan H. H.; Serry, M. F. 1982 (b). Utilisation of preservatives for growth by microbial contaminants recovered from non sterile pharmaceuticals and their manufacturing areas. Egypt. J. Pharm. Sci., **23**, No. 1-4, pp 51-67.

Zedan, H. H.; Serry, M. F. 1982. Metabolism of esters of p-hydroxybenzoic acid by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Egypt. J. Pharm. Sci., **19**, No. 1, pp 41-54.