

50376
1990
95

69072

50376
1990
95

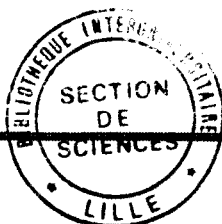
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

T H E S E

DE DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

JEAN-CHARLES JONCQUIERT



**CLONAGE ET EXPRESSION
CHEZ *ESCHERICHIA COLI* DE GENES DE *BACTEROIDES*
IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DES DEXTRANS**

Soutenue le 3 Juillet 1990 devant la Commission d'Examen:

Président: Professeur J.B. GUILLAUME

Rapporteurs: Professeur N. TRUFFAUT

Professeur S. BALL

Examineurs: Professeur B. COURTOIS

H.C. DUBOURGUIER, Directeur de Recherches INRA

N° d'ordre: 546

Je remercie Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME de m'avoir accueilli au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Lille Flandres Artois dont il assure la direction, ainsi que Madame le Professeur N. TRUFFAUT et Monsieur le Professeur S. BALL qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je suis également reconnaissant à Monsieur le Professeur B. COURTOIS et à Monsieur H.C. DUBOURGUIER d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur M. BECHET qui m'a apporté sa compétence et son aide scientifique avec la plus grande sympathie.

Je remercie également Messieurs P. PHEULPIN et Y. TIERNY pour leur aide et leur soutien dans une ambiance amicale ainsi que tout le personnel du Laboratoire.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de ces années d'études.

I - INTRODUCTION.

1 GENERALITES - HISTORIQUE.....	7
2 DONNEES TAXONOMIQUES.....	8
3 HABITAT DES BACTERIES DU GENRE <i>BACTEROIDES</i>.....	16
3.1 Généralités.....	16
3.1.1 Le modèle compétitif.....	16
3.1.2 Le modèle coopératif.....	17
3.1.3 Le modèle combiné compétitif/coopératif.....	18
3.2 <i>Bacteroides</i> du tractus digestif de l'homme.....	19
3.2.1 <i>Bacteroides</i> de la flore buccale.....	19
3.2.2 <i>Bacteroides</i> du côlon.....	20
3.3 <i>Bacteroides</i> du tractus digestif des ruminants.....	23
4 BESOINS NUTRITIONNELS ET METABOLISME ENERGETIQUE.....	28
4.1 Besoins nutritionnels.....	28
4.2 Métabolisme énergétique.....	29
4.2.1 Formation du pyruvate.....	29
4.2.2 Rôle du CO ₂ dans le catabolisme du PEP.....	29
4.2.3 Formation d'autres produits de fermentation.....	30
4.2.4 Phosphorylation oxydative.....	30
5 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	33
6 ACTIVITES ENZYMATIQUES DEGRADANT LES POLYSACCHARIDES.....	34
6.1 <i>Bacteroides</i> du tractus digestif de l'homme.....	34
6.1.1 <i>Bacteroides</i> de la cavité buccale.....	34
6.1.2 <i>Bacteroides</i> du côlon.....	35
* dégradation de l'amidon.....	36
* dégradation du pullulane.....	38
* dégradation des cyclodextrines.....	38
* dégradation des pectines et du PGA.....	39
* dégradation des galactomannanes.....	42
* dégradation de la chondroïtine-sulfate.....	43

* dégradation de la laminarine.....	46
* dégradation du dextran.....	47
* dégradation d'autres polymères.....	47
6.2 <i>Bacteroides</i> du tractus digestif des ruminants.....	49
6.3 <i>Bacteroides</i> des autres habitats.....	53
7 GENES DE BACTEROIDES CLONES.....	55
7.1 Gènes responsables d'activités enzymatiques de dégradation de polysaccharides.....	55
* chondroïtine-lyase de <i>B. thetaiotaomicron</i>	55
* pullulanase de <i>B. thetaiotaomicron</i>	55
* β -glucanases de <i>B. succinogenes</i>	56
* β -glucanases de <i>B. ruminicola</i>	57
* xylanase de <i>B. ruminicola</i>	58
* xylanase de <i>B. ovatus</i>	58
* neuraminidase de <i>B. fragilis</i>	59
7.2 Autres gènes.....	59
* piline de <i>B. nodosus</i>	59
* protéases de <i>B. nodosus</i>	60
* fimbriline de <i>B. gingivalis</i>	60
* <i>recA</i> de <i>B. fragilis</i>	60
* synthèse d'acides-amino.....	61
8 LE DEXTRAN.....	61
9 LES DEXTRANASES.....	64
9.1 Chez les champignons et les levures.....	64
9.2 Chez les bactéries autres que <i>Bacteroides</i>	65
9.3 Chez <i>B. ochraceus</i> (<i>Capnocytophaga ochracea</i>).....	69
9.4 Chez les espèces du genre <i>Bacteroides</i>	69

II - MATERIEL ET METHODES.

1 SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.....	72
1.1 <i>Escherichia coli</i>	72
1.2 <i>Bacteroides</i>	72
2 PLASMIDES.....	73
3 MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE.....	75
3.1 Culture d' <i>E. coli</i>	75
* Milieu LB.....	75
* Milieu TSA.....	75
* Milieu ML.....	75
* Milieu M9.....	76
3.2 Culture de <i>Bacteroides</i>	76
* Bouillon cerveau-coeur.....	76
* Milieu de Caspari et Macy.....	77
* Conditions de culture.....	78
3.3 Antibiotiques utilisés pour les milieux sélectifs.....	78
4 EXTRACTION DE DNA TOTAL DE <i>BACTEROIDES</i> ET D' <i>E. COLI</i>	78
5 EXTRACTION DE DNA PLASMIDIQUE (ISH-HOROWICZ ET BURKE).....	79
6 ELECTROPHORESES.....	81
6.1 Electrophorèse horizontale.....	82
6.2 Electrophorèse verticale: Lyse directe sur gel.....	83
6.3 Electroélution.....	84
7 ELUTION DE FRAGMENTS DE DNA PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE.....	85
8 TRANSFORMATION D' <i>E. COLI</i>	86

9 UTILISATION DES ENZYMES.....	86
9.1 Enzymes de restriction.....	86
9.2 Phosphatase alcaline.....	87
9.3 Ligase.....	87
10 HYBRIDATION DE DNA SELON SOUTHERN.....	87
10.1 Transfert du DNA sur la membrane d'hybridation.....	88
10.2 Hybridation par sonde biotinylée.....	89
10.3 Hybridation par sonde radiomarquée.....	92
11 PRESSE DE FRENCH.....	94
12 DOSAGE DE SUCRES REDUCTEURS SELON NELSON-SOMOGYI.....	94
13 DOSAGE DE PROTEINES SELON LOWRY.....	95
14 DOSAGE DU CHROMOPHORE DU BLEU DEXTRAN.....	96
15 UTILISATION DE LA CHAÎNE HPLC.....	97

III - RESULTATS - DISCUSSION.

1 SELECTION DES SOUCHES DEXTRANASIQUES DE <i>BACTEROIDES</i> ET DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	98
1.1 Sélection de la souche.....	98
1.2 Dosage de l'activité dextranasique.....	102
2 FABRICATION D'UNE BANQUE DE GENES DE <i>BACTEROIDES</i> CHEZ <i>E. COLI</i>.....	107
2.1 Plasmide vecteur: le pEAP37.....	107
2.2 Plasmide vecteur: le pKC7.....	110

2.3 Plasmide vecteur: le pBR322.....	111
3 CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS.....	114
3.1 Sélection des clones positifs.....	114
3.2 Vérification des souches.....	116
3.3 Tests d'activité dextranasique.....	118
4 ANALYSE DES PLASMIDES RECOMBINANTS.....	121
4.1 Analyse par lyse directe.....	121
4.2 Etablissement des cartes de restriction.....	123
5 HYBRIDATIONS ENTRE DNA CHROMOSOMIQUE ET PLASMIDES RECOMBINANTS.....	132
6 HYBRIDATIONS ENTRE PLASMIDES RECOMBINANTS.....	137
6.1 Hybridations avec la sonde 300/25.....	138
6.2 Hybridations avec la sonde 148/42.....	139
6.3 Hybridations avec la sonde 277/31.....	139
6.4 Hybridations avec la sonde 177/52.....	144
6.5 Hybridations avec la sonde 184/44.....	145
6.6 Hybridations avec la sonde 146/22.....	146
7 SOUS-CLONAGE DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION.....	151
7.1 Le vecteur d'expression.....	151
7.2 Préparation des inserts et transformation.....	152
7.3 Criblage des transformants.....	153
7.4 Etude du plasmide.....	154

IV - <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	158
V - <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	163

INTRODUCTION

1 - GENERALITES - HISTORIQUE.

Sur la terre, l'atmosphère primitive était constituée de méthane, d'azote, d'ammoniac, de gaz carbonique et d'hydrogène. C'est ainsi que les premiers êtres vivants se sont développés en absence d'oxygène en utilisant des processus métaboliques se déroulant en milieu réducteur.

Ensuite, progressivement, l'atmosphère terrestre a subi un enrichissement en oxygène. Ceci étant dû au développement des premiers organismes photosynthétiques et ayant pour conséquence de repousser dans des niches écologiques anaérobies les organismes qui jusqu'alors occupaient toute la surface de la terre. Les bactéries anaérobies ont ainsi pu survivre dans des habitats aussi différents que leur métabolisme leur permettait. On les trouve dans les lacs, les fonds des océans, l'humus ou encore le tractus digestif de l'ensemble des animaux.

Pasteur, en 1857, fut le premier à mettre en évidence l'activité de micro-organismes anaérobies (Boulangier, 1923; Hungate, 1985). Il montra successivement:

- que la fermentation alcoolique se déroule en absence d'oxygène, qu'elle est due à des levures qui demeurent parfaitement vivantes et peuvent se multiplier au cours du processus.

- que ces mêmes levures peuvent vivre et se multiplier en aérobiose en n'oxydant alors les sucres qu'en CO_2 (sans accumulation d'alcool). Dans ce cas, la quantité de sucres consommée étant plus faible (effet Pasteur).

- que différentes fermentations aboutissant aux accumulations d'acide butyrique ou d'acide lactique sont provoquées par des micro-organismes; que cette accumulation ne se fait qu'en anaérobiose et que l'oxygène tue les micro-organismes responsables.

- que la transformation de l'éthanol en acide acétique, lors de la fabrication du vinaigre, ne peut avoir lieu

qu'en présence d'une forte aération et qu'elle est due à un micro-organisme détruit dès que l'aération cesse.

C'est ainsi qu'il mit en évidence l'existence de grandes différences métaboliques selon qu'un organisme comme la levure (c'est à dire aéro-anaérobie) se développait en présence ou en absence d'oxygène.

A l'heure actuelle, l'étude des bactéries anaérobies est très intéressante aussi bien du point de vue médical que du point de vue biotechnologique. En effet, ces bactéries sont souvent responsables d'infections et, de plus, elles possèdent un métabolisme susceptible d'intéresser les industries. Parmi ces bactéries anaérobies se trouve le genre *Bacteroides*.

2 - DONNEES TAXONOMIQUES.

Dans la neuvième édition du Bergey's manual, Holdeman *et al.* (1984) classent *Bacteroides* dans la famille des *Bacteroidaceae*. Cette famille est constituée de bactéries anaérobies strictes, Gram-négatives, ne formant pas de spores, que l'on rencontre sous forme de bacilles droits, courbes ou en spirale. Ces bactéries sont également mobiles ou non et sont toutes chimio-organotrophes. L'anabolisme trouve son énergie grâce à l'oxydation des molécules organiques. Les bactéries de cette famille métabolisent les sucres, les peptones et les métabolites intermédiaires. La plupart de ces bactéries produisent des acides organiques tels que le succinate, l'acétate, le butyrate, le lactate, le propionate ou encore le formate.

Dans la famille des *Bacteroidaceae*, Holdeman a défini 13 genres dont les noms et les principales caractéristiques sont regroupées dans le tableau 1.

Le genre *Bacteroides* est le plus représenté en nombre et le plus connu. Ce genre a pour espèce type *B. fragilis*.

Les bactéries du genre *Bacteroides* sont des bacilles droits non mobiles qui produisent par fermentation des sucres et des peptones: du succinate, du propionate et de l'acétate.

Holdeman *et al.* (1984) ont subdivisé le genre *Bacteroides* en 39 espèces; celles-ci pouvant se classer en deux groupes: les asaccharoclastiques représentés par *Bacteroides ureolyticus*, *B. praeacutus*, *B. gracilis*, *B. nodosus*, *B. pneumosintes*, *B. putredinis*, *B. coagulans*, *B. gingivalis*, *B. asaccharolyticus*; les saccharoclastiques qui sont représentés par les 30 autres espèces. Toutes ces espèces sont reportées au tableau 2.

En fait, les différentes espèces composant le genre *Bacteroides* ont des caractéristiques assez peu homogènes que ce soit d'un point de vue habitat, composition chromosomique (% GC) ou encore d'un point de vue caractères métaboliques. De ce fait, on trouve régulièrement dans la littérature des propositions de reclassification d'espèces jusqu'alors apparentées à *Bacteroides* dans d'autres genres ou des propositions d'incorporation d'espèces nouvellement caractérisées.

Shah et Collins en 1981 isolèrent de la bouche 3 nouvelles espèces qui ont été appelées *Bacteroides buccalis*, *B. denticola* et *B. pentosaceus*. En 1983, Watabe *et al.* isolent une autre espèce de la cavité buccale qui a pour nom *Bacteroides veroralis*. Cette souche étant proche de *Bacteroides oralis* et *B. buccalis* et ayant un % GC de 42. Des vases d'égout, Patel en 1983 a isolé *Bacteroides polypragmatus* qui est une souche ayant un % GC de 61. Du même habitat, Murray *et al.* (1984) isolent *Bacteroides cellulosolvens*. En 1985, le nom de *Bacteroides heparinolyticus* a été proposé pour une souche identifiée par Okuda *et al.* Enfin, en 1986, Jensen et Canale-Parola ont mis en évidence 2 espèces nouvelles. Il s'agit de *Bacteroides pectinophilus* et *B. galacturonicus* qui vivent

dans le tractus digestif de l'homme et qui ont respectivement pour valeurs de % GC, 45 et 36.

D'autre part, Shah et Collins (1982a; 1982b) ont proposé une reclassification pour 2 espèces. Ainsi, *Bacteroides hypermegas* serait reclassé en *Megamonas hypermegas* et *B. multiacidus* en *Mitsuokella multiacidus*. De plus, plusieurs autres espèces ont été reclassées comme *B. microfusus* en *Rikenella microfusus* (Collins et al., 1985), *B. termitidis* en *Sebaldella termitidis* (Collins et Shah, 1986a), *B. praeacutus* en *Tissierella praeacuta* (Collins et Shah, 1986b) et *B. furcosus* en *Anaerorhabdus furcosus* (Shah et Collins, 1986).

Parmi les bactéries asaccharolytiques pigmentées en noir, on note également des modifications. Ainsi, Van Winkelhoff et al. (1985) isolent de la bouche une nouvelle espèce: *Bacteroides endodontalis*. Celle-ci n'est pas restée longtemps classée parmi les espèces du genre *Bacteroides* car en 1988 Shah et Collins ont reclassé *Bacteroides asaccharolyticus*, *B. gingivalis* et *B. endodontalis* dans un nouveau genre: *Porphyromonas*. En effet, ces trois bactéries pigmentées asaccharolytiques ont des propriétés biochimiques nettement démarquées de celles de *Bacteroides fragilis*.

Parmi les *Bacteroides* du rumen, *B. succinogenes* a peu d'homologie avec d'autres *Bacteroides*. D'ailleurs, en 1988, Montgomery et al. l'ont reclassé dans le genre *Fibrobacter* et l'ont appelé *Fibrobacter succinogenes*. De plus, *Bacteroides amylophilus* a été affilié aux bactéries pourpres par Stackebrandt et Hippe (1986) et a été renommé *Ruminobacter amylophilus*. Scholten-Koerselman et al. (1986) ont isolé une nouvelle espèce dans le fumier de bovins; c'est une souche qui a un % GC compris entre 34 et 36 et qui a été nommée *Bacteroides xylanolyticus*.

Sur le plan génétique, le genre *Bacteroides* est distant des autres bactéries Gram-négatives. En effet, Paster *et al.* (1985) et Weisburg *et al.* (1985) ont démontré par analyse des rRNA 16S que *Bacteroides* et *Fusobacterium* sont proches des Flavobactéries et des *Cytophagaceae*. Ainsi, Salyers *et al.* en 1987 suggèrent que la séparation du groupe *Flavobacterium Bacteroides* des autres eubactéries se serait effectuée avant la séparation des bactéries Gram-positives, des bactéries pourpres ainsi que des Cyanobactéries. Afin de prouver qu'il existe une grande hétérogénéité dans le genre *Bacteroides*, Paster *et al.* (1985) ont déterminé des pourcentages d'homologie par hybridation DNA chromosomique / rRNA 16S entre les souches. Ils ont trouvé 3 groupes: un qui est représenté par les *Bacteroides* apparentés à *B. fragilis*, c'est à dire *B. fragilis*, *ovatus*, *vulgatus*, *thetaitaomicron* et *uniformis*; un représenté par *Bacteroides ruminicola* et *Fusobacterium* et le dernier représenté par *Bacteroides distasonis*. Ce dernier groupe étant phylogénétiquement relativement éloigné des deux premiers (se reporter à la figure 1).

Très récemment (avril 1990), des espèces ont été reclassées. Ainsi, *Bacteroides nodosus*, après analyse des rRNA 16S a été renommé *Proteobacteria* (La Fontaine et Rood, 1990). D'autre part, les espèces *B. melaninogenicus*, *B. bivia*, *B. buccae*, *B. buccalis*, *B. corporis*, *B. denticola*, *B. disiens*, *B. heparinolyticus*, *B. intermedius*, *B. loescheii*, *B. oralis*, *B. oris*, *B. ruminicola*, *B. veroralis* et *B. zooglyphiformans* ont été reclassées dans le genre *Prevotella* (Shah et Collins, 1990). Donc, parmi les 39 espèces du genre *Bacteroides* de la neuvième édition du Bergey's manual (Holdeman *et al.*, 1984), il ne reste à l'heure actuelle que 17 espèces. Ceci confirme bien la tendance actuelle de restreindre le genre *Bacteroides* à *B. fragilis* et aux espèces apparentées (Shah et Collins, 1989).

Genre	Mobilité, Ciliature	Métabolites produits
<i>Bacteroides</i>	Non mobile péritriche	Succinate, Acétate
<i>Fusobacterium</i>	Non mobile péritriche	Butyrate
<i>Leptotrichia</i>	Non mobile péritriche	Lactate
<i>Butyrivibrio</i>	Mobile monotriche	Butyrate
<i>Succinimonas</i>	Mobile flagelle polaire	Succinate, Acétate
<i>Succinivibrio</i>	Mobile flagelle polaire cellule en spirale	Succinate, Acétate
<i>Anaerobiospirillum</i>	Mobile avec flagelle bipolaire en touffe cellule en spirale	Succinate, Acétate
<i>Wolinella</i>	Mobile flagelle polaire	Formate
<i>Selenomonas</i>	Mobile flagelles en touffes	Propionate, Acétate
<i>Anaerovibrio</i>	Mobile flagelle polaire	Propionate, Acétate
<i>Pectinatus</i>	Mobile flagelle latéral	Propionate, Acétate
<i>Acetivibrio</i>	Mobile flagelle latéral	Acétate, Ethanol, H ₂ , CO ₂
<i>Lachnospira</i>	Mobile flagelle polaire	Acétate, Ethanol, H ₂ , CO ₂ , formate, lactate

Tableau 1: Famille des *Bacteroidaceae*. (Holdeman *et al.*, 1984)

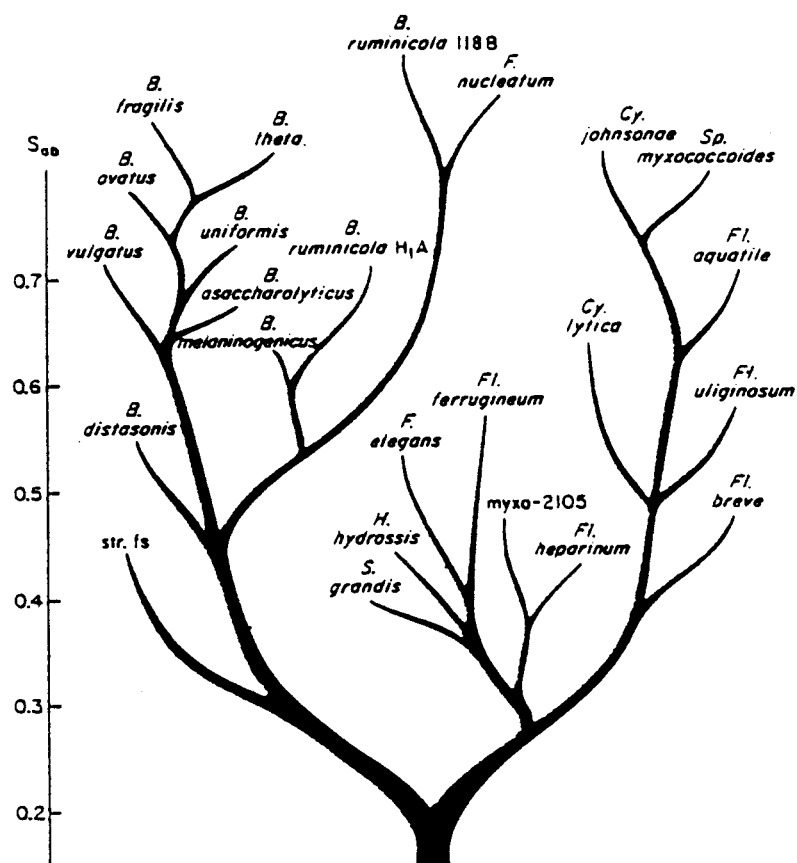
Espèces	% GC	Habitat naturel
<i>amylophilus</i>	40 - 42	Rumen
<i>asaccharolyticus</i>	50 - 52	Cavité buccale
<i>bivius</i>	40	Flore normale du vagin
<i>buccae</i>	50 - 52	Poches gingivales
<i>capillosus</i>	60	Côlon humain et porc
<i>coagulans</i>	37	Tractus digestif et uréogénital
<i>corporis</i>	43 - 46	
<i>denticola</i>	49 - 51	Poches gingivales
<i>disiens</i>	40 - 42	Flore normale du vagin
<i>distasonis</i>	43 - 45	Côlon humain
<i>eggerthii</i>	44 - 46	Côlon humain
<i>fragilis</i>	41 - 44	Côlon humain
<i>furcosus</i>	34	Abcès intestinaux
<i>gingivalis</i>	46 - 48	Abcès dentaires
<i>gracilis</i>	44 - 46	Crevasses gingivales
<i>hypermegas</i>	35	Côlon humain, volaille, chien
<i>intermedius</i>	41 - 44	Crevasses gingivales
<i>levii</i>	48	Rumen des bovins
<i>loescheii</i>	46 - 48	Poches gingivales
<i>macacae</i>	43 - 44	Cavité buccale des macaques

Tableau 2: Genre *Bacteroides* (Holdeman *et al.*, 1984)

Espèces	% GC	Habitat naturel
<i>melaninogenicus</i>	36 - 40	Poches gingivales
<i>microfusus</i>	60 - 61	Fèces du veau. Caecum du poulet
<i>multiacidus</i>	56 - 58	Côlon humain et porc
<i>nodosus</i>	45	Pied du mouton
<i>oralis</i>	43	Poches gingivales
<i>oris</i>	42 - 46	Intestin du poulet. Abscès
<i>ovatus</i>	39 - 43	Côlon humain
<i>pneumosintes</i>		Pharynx
<i>praeacutus</i>	28	Intestin humain
<i>putredinis</i>		Côlon du mouton
<i>ruminicola</i>		
<i>ss esp brevis</i>	50	Réticulo-rumen bovins, moutons
<i>ss esp ruminicola</i>	49	Réticulo-rumen bovins, moutons
<i>splanchnicus</i>		Côlon humain et vagin
<i>succinogenes</i>	47 - 49	Rumen des bovins et moutons
<i>termitidis</i>	34 - 36	Intestin des termites
<i>thetaitaomicron</i>	40 - 43	Côlon humain
<i>uniformis</i>	45 - 48	Côlon humain
<i>ureolyticus</i>	28 - 30	Cavité orale et intestin
<i>vulgatus</i>	40 - 42	Côlon humain
<i>zoogloiformans</i>	47	Cavité buccale

Tableau 2 (suite): Genre *Bacteroides* (Holdeman *et al.*, 1984).

1a



1b

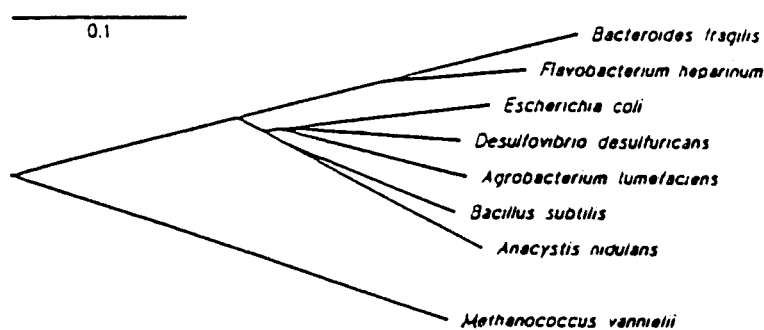


Figure 1 a: Relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Bacteroides* et des espèces apparentées.

Figure 1 b: Relations phylogénétiques entre les bactéries du genre *Bacteroides* et d'autres genres bactériens.

3 - HABITAT DES BACTERIES DU GENRE *BACTEROIDES*.

3.1 - Généralités.

Les habitats dans lesquels les bactéries anaérobies vivent et évoluent sont des milieux réducteurs. Ce sont principalement les tractus digestifs des animaux, les sédiments aquatiques, le sol et d'autres habitats dépourvus d'oxygène ayant des conditions d'humidité et de température favorables (Salyers, 1984).

Les tractus digestifs des animaux sont les habitats les plus faciles pour une étude écologique qualitative à cause de leur relative constance comparée aux autres habitats anaérobies. En effet, la température y est relativement haute et constante, et l'animal maintient dans son intestin un approvisionnement en eau et autres substrats. De plus, l'oxygène y est absent comme la lumière et les fermentations se déroulent rapidement.

Il existe deux grandes stratégies pour les tractus digestifs des animaux. Dans le premier cas, la nourriture est principalement d'origine animale et peut être digérée par les enzymes de l'animal la consommant. Dans l'autre cas, la nourriture est presque exclusivement d'origine végétale et une grande partie n'est pas susceptible d'être digérée par le consommateur. Dans le premier cas, on parle de compétition avec les microbes (modèle compétitif) alors que dans le second, on parle de coopération avec eux (modèle coopératif) (Hungate, 1985).

3.1.1 - Le modèle compétitif.

Dans ce modèle, l'animal sécrète dans l'estomac de l'acide chlorhydrique en concentrations bactéricides ainsi que des protéases telles que la pepsine. Ceci donc juste avant l'entrée de la nourriture dans l'intestin grêle où la plupart des enzymes de l'animal agissent.

De ce fait, beaucoup de micro-organismes sont soit tués, soit leur nombre est si réduit que quoique l'acidité soit neutralisée dans le duodénum et que les conditions deviennent alors très favorables à la prolifération bactérienne (sur la nourriture ou sur les produits des enzymes de l'hôte), le nombre de bactéries est insuffisant pour effectuer une fermentation avant que l'hôte absorbe les produits de la dégradation de ses enzymes. Ceci se couplant au fait que le passage de la nourriture dans l'intestin grêle est relativement rapide car le diamètre y est faible. Les quelques bactéries de l'intestin grêle vont se trouver dans le gros intestin en compétition avec les bactéries qui s'y développent.

Les bactéries du côlon vont décomposer les aliments non digérés par les enzymes de l'hôte, vont agir sur les mucines et sur les cellules desquamées dans la lumière de l'intestin. Les vitamines seront synthétisées et la fermentation des fibres végétales se fera.

Ce modèle compétitif se remarque dans l'embranchement des vertébrés tels que les carnivores, les pinnipèdes (phoque), les insectivores (taupes), les chéiroptères (chauve-souris) et la plupart des primates. Il correspond également à certains marsupiaux et à beaucoup d'oiseaux, de reptiles, d'amphibiens et de poissons. Enfin, beaucoup d'invertébrés correspondent sûrement à ce modèle.

3.1.2 - Le modèle coopératif.

Ceci se produit chez la plupart des animaux dont l'alimentation est principalement constituée par des matières végétales. Or les plantes possèdent des cellules à parois et très peu d'animaux ont les enzymes capables de dégrader ces parois. Par contre, ces enzymes sont produites par un grand nombre de bactéries.

Chez certains animaux se nourrissant de cellules végétales, la nourriture est soumise à une fermentation

microbienne avant d'entrer dans l'estomac acide. Donc, la digestion dépend de la capacité des micro-organismes à fermenter les substrats en éléments assimilables. Comme la fermentation par ces micro-organismes requiert plus de temps pour dégrader des composés végétaux tels la cellulose, l'hémicellulose ou la pectine que des composés non fibreux, une partie du tractus gastro-intestinal coopératif est élargie pour donner une chambre de fermentation dans laquelle les micro-organismes sont en présence des substrats végétaux suffisamment longtemps pour les convertir en composés plus simples assimilables.

Le modèle coopératif avec une chambre de fermentation décalée est caractéristique des ruminants ou encore de l'hippopotame. Ce même modèle avec modification de flux se produit chez certains marsupiaux herbivores, chez l'aï et probablement chez le panda qui consomme principalement des pousses de bambou.

3.1.3 - Le modèle combiné compétitif/coopératif.

Chez d'autres animaux se nourrissant exclusivement de végétaux, la digestion peut être soumise premièrement à l'action des acides et des enzymes de l'hôte avec absorption de produits et ensuite aux activités digestives des bactéries. L'hôte obtient non seulement les nutriments digérés par ses propres enzymes mais aussi les produits de fermentation des matériaux que ses enzymes ne peuvent digérer.

Le modèle combiné est rencontré chez le cheval, l'éléphant et les rongeurs. Les termites représentent également un très bon exemple de ce modèle; en effet, ils sont des consommateurs et des digesteurs actifs de bois. Enfin, ce modèle combiné correspond probablement à ce qui s'effectue chez la plupart des invertébrés se nourrissant de végétaux.

3.2 - *Bacteroides* du tractus digestif de l'homme.

Les bactéries du genre *Bacteroides* sont présentes dans la quasi-totalité du tractus digestif de l'homme et plus généralement des animaux monogastriques. Des espèces ont ainsi été isolées dans la bouche au niveau de la gencive ou de la plaque dentaire, dans l'intestin grêle et au niveau du côlon. Par contre, aucune espèce n'a été isolée de l'estomac qui par sa forte acidité ne permet pas la survie de ces espèces.

3.2.1 - *Bacteroides* de la flore buccale.

Bacteroides gingivalis, *endodontalis*, *melaninogenicus* et *asaccharolyticus* sont des bactéries asaccharolytiques. Elles ont donc un métabolisme essentiellement protéolytique. Elles sont pigmentées en noir et sont responsables de nombreuses infections (Mayrand *et al.*, 1984; Mayrand et Holt, 1988).

Dans la cavité buccale, la présence de *Bacteroides gingivalis* semble être associée à plusieurs maladies. En effet, cette espèce est habituellement absente des gencives saines alors qu'elle représente de 1 à 5 % de la microflore gingivale en cas de gingivite et que ce pourcentage est beaucoup plus élevé en cas de parodontite (affection des tissus de soutien de la dent). *Bacteroides gingivalis* a également été mis en évidence au niveau de la salive, des amygdales ou de la langue.

De nombreux auteurs associent la capacité infectieuse de cette bactérie avec ses activités protéolytiques, surtout collagénasiques (Van Steenberghe et De Graaff, 1986; Otsuka *et al.*, 1987; Birkedal-Hansen *et al.*, 1988; Mayrand et Holt, 1988; Naito et Gibbons, 1988; Van Winkelhoff *et al.*, 1988; Fujimura et Nakamura, 1989).

Ces bactéries pigmentées en noir se fixent sur les cellules épithéliales de la gencive (Kolenbrander, 1988).

Elles présentent une résistance à la phagocytose cellulaire car elles sont capsulées. De plus, elles sécrètent des substances leucotoxiques inhibant les leucocytes polynucléaires et elles sont capables de dégrader des protéines anti-inflammatoires comme les immunoglobulines (Van Winkelhoff *et al.*, 1988).

Dans la flore buccale, on rencontre aussi des espèces saccharolytiques du genre *Bacteroides* telles que *B. oralis*. Ces bactéries synthétisent des dextranases qui hydrolysent les principaux polysaccharides de la plaque dentaire que sont les dextrans (Takahashi, 1982; Takahashi *et al.*, 1985). Ces dextrans y sont synthétisés par *Streptococcus mutans* à partir du saccharose et grâce à une enzyme appelée dextranase (Mooser et Iwaoka, 1989).

3.2.2 - *Bacteroides* du côlon.

Le côlon humain contient une flore microbienne nombreuse et complexe. Parmi les 400 espèces de bactéries qui y vivent, 5 genres représentent environ 70 % de la population totale. *Bacteroides* est un des 5 genres prédominants avec 30 % de la flore du côlon.

Les espèces de *Bacteroides* les plus importantes en nombre sont *Bacteroides vulgatus*, *distasonis* et *thetaiotaomicron* que l'on trouve à raison de 10^{10} bactéries par gramme de matière fécale sèche. *Bacteroides fragilis*, *ovatus*, *eggerthii* et *uniformis* sont moins nombreux (10^9 /g de matière fécale sèche)

* Rôle écologique.

Dans l'organisme humain, la majeure partie des substances simples et assimilables est absorbée dans l'intestin grêle. De ce fait, on ne trouve comme seule source de carbone dans le côlon que des substances non assimilées par l'homme telles que des polysaccharides complexes des parois des cellules végétales (xylanes,

pectines, etc..) ou des sécrétions de la muqueuse intestinale (ex: chondroïtine sulfate). C'est pour cette raison que *Bacteroides* possède une grande variété d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides complexes. Il a été montré que plus de la moitié des polysaccharides de cellules végétales que l'hôte ingère sont dégradés durant le passage dans le côlon (Salysers, 1984).

De plus, ces bactéries peuvent s'adapter très rapidement aux variations du régime alimentaire de l'hôte car la plupart de leurs enzymes sont inductibles et ne sont donc produites qu'en présence de leurs substrats spécifiques (Salysers *et al.*, 1977; Salysers et Kotarski, 1980b). Ainsi, il a été montré que quand *Bacteroides thetaiotaomicron* se trouve en présence d'un mucopolysaccharide tel que le chondroïtine sulfate, la synthèse de l'enzyme capable de le dégrader commence après 30 mn et que le maximum d'activité spécifique est atteint au bout de 2 heures (Salysers et Kotarski, 1980b).

Enfin, l'hydrolyse de ces polysaccharides est accompagnée d'une production d'acides gras volatils et de vitamines qui sont assimilées par l'hôte au niveau de la muqueuse intestinale. Pour ces différentes raisons, on peut dire que *Bacteroides* est une bactérie du côlon dont la présence est avantageuse et indispensable à l'hôte.

* Pathogénicité.

Mais, malheureusement pour l'hôte, *Bacteroides* est un pathogène opportuniste. De ce fait, quand les conditions écologiques du côlon ne sont plus normales, il peut être la cause d'infections variées telles que des septicémies ou des oedèmes aux poumons, au cerveau ou à l'abdomen. C'est le cas de *Bacteroides fragilis* et des espèces apparentées. Le traitement de ces infections est complexe du fait des nombreuses résistances aux antibiotiques que présentent les souches (Salysers, 1984; Salysers *et al.*, 1987). En effet, ces souches sont résistantes à tous les aminoglycosides et

de plus, la résistance à la clindamycine, qui est l'antibiotique de choix pour le traitement d'infections à *Bacteroides*, semble être en augmentation. Ceci serait dû, ainsi que pour l'augmentation de la résistance à la tétracycline, à des transferts conjugatifs de gènes de résistance entre les souches (Salyers, 1984).

* Relation *Bacteroides*/étiologie du cancer du côlon.

80 à 90 % des cancers humains sont en rapport avec des facteurs d'environnement. Plus spécialement au niveau du côlon, il a été suggéré que la microflore indigène était impliquée dans les causes de cette maladie de part sa faculté de synthétiser des composés carcinogènes ou cocarcinogènes. La synthèse de ces composés dépendant en grande partie du régime alimentaire de l'hôte. Ainsi, l'ingestion d'une grande quantité de viandes (surtout de boeuf), de graisses ou de sucres raffinés serait en corrélation avec le cancer du côlon. Par exemple, il a été démontré que des composés carcinogènes sont synthétisés par l'action de bactéries intestinales sur les sels biliaires; ces derniers étant excrétés dans l'intestin suite à une alimentation riche en graisses (Macy et Probst, 1979).

Des produits du métabolisme des acides aminés et des protéines seraient également impliqués dans les mécanismes de la carcinogenèse. Ainsi, le métabolisme de la tyrosine amène la formation de composés phénoliques; quelques souches de *Bacteroides thetaiotaomicron* peuvent former des composés cancérigènes possédant un noyau indole à partir du tryptophane; *Bacteroides* peut aussi métaboliser des composés polycycliques aromatiques hydrocarbonés.

Par contre, il est intéressant de noter que *Bacteroides* peut également inactiver des substances mutagènes; d'ailleurs, des nitropyrènes-réductases ont été caractérisées chez *Bacteroides fragilis*.

Bien que le genre *Bacteroides* soit impliqué dans la formation de composés carcinogènes dans le côlon, leur rôle actuel dans les causes de cancers n'est pas connu. Autant il est acquis qu'il existe une corrélation régime alimentaire/cancer, autant la corrélation risque de cancer du côlon/type de bactéries n'a jamais été mise en évidence. Ceci montre que les activités métaboliques des bactéries intestinales sont en rapport étroit avec le régime alimentaire alors que la composition de la flore dépend plus de la physiologie de l'hôte que du régime.

3.3 - *Bacteroides* du tractus digestif des ruminants.

Le caractère le plus singulier des ruminants est leur appareil digestif. L'estomac est divisé en 4 compartiments qui sont la panse (ou rumen), le bonnet, le feuillet et la caillette. Chez ces ruminants, l'hydrolyse des polysaccharides des parois des cellules végétales se fait avant le passage dans l'intestin grêle. Cela se passe dans le rumen et la totalité de la dégradation est due à l'action de micro-organismes.

La panse, qui représente 80 % du volume total de l'estomac atteint des valeurs d'environ 250 litres chez la vache. Dans le rumen, les débris végétaux sont broyés et désolidarisés par les actions conjuguées de la mastication et de la rumination. Les papilles qui tapissent sa paroi interne augmentent beaucoup la surface de cet organe. C'est à son niveau que s'effectue l'absorption d'eau et de métabolites essentiels comme les acides gras volatils, l'ammoniaque, résultant de la fermentation microbienne.

Le rumen constitue une parfaite chambre de culture pour les bactéries et les protozoaires qui s'y trouvent en abondance. La prise fréquente de nourriture assure un substrat nourricier permanent; les produits solubles sont absorbés et ne peuvent donc s'accumuler et inhiber

l'activité enzymatique; la température est maintenue stable autour de 40°C (+/- 2°). De plus, une partie de la population microbienne est régulièrement éliminée de l'enceinte et enfin une énorme quantité de salive (de 50 à 80 litres par jour) maintient des conditions stables de pH (6 à 7) et de concentration ionique. Ce milieu est totalement anaérobie et son atmosphère est constituée de 60 à 70 % de CO₂, de 25 à 35 % de CH₄, de quelques % de N₂ et de traces d'H₂ et d'H₂S. L'oxygène qui pénètre dans la panse lors de la mastication et de la rumination est très rapidement réduit par les micro-organismes anaérobies facultatifs. De plus, un certain nombre de bactéries est digéré par le ruminant, ce qui lui assure un approvisionnement en protéines et en vitamines.

La population du rumen est donc constituée de protozoaires et de bactéries. Entre ces différentes espèces, il existe de complexes relations de symbiose ou de compétition car chacun des micro-organismes a besoin pour se développer de substances synthétisées par les autres espèces. La microflore du rumen apparaît dès le sevrage du jeune animal. A l'âge adulte, on a environ 10⁸ protozoaires par gramme de contenu gastrique et environ 10¹⁰ bactéries. Ces bactéries sont surtout des *Streptococcus*, des *Lactobacillus* et de nombreuses bactéries cellulolytiques des genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter*, etc. Ces dernières étant responsables des processus de fermentation permettant à la cellulose d'être dégradée en produits assimilables. Dans le rumen, 200 espèces bactériennes vivent et coexistent mais seules 30 espèces sont spécifiques du rumen (Hungate, 1985). Le tableau 3 donne quelques caractéristiques de bactéries du rumen.

On peut classer les glucides du rumen en 3 catégories:

- les glucides simples (ex: glucose, saccharose) qui sont utilisés immédiatement par les bactéries pour leur métabolisme.
- les polysaccharides cytoplasmiques comme l'amidon qui sont facilement dégradés par une bactérie amylolytique comme *Bacteroides amylophilus*.
- les polysaccharides pariétaux comme la cellulose, l'hémicellulose ou les pectines.

La cellulose et ses produits d'hydrolyse seront fermentés par des bactéries comme *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens*. D'ailleurs, *Bacteroides succinogenes* serait la souche cellulolytique du rumen la plus active (Lin et al., 1985). *Bacteroides ruminicola* hydrolyse les pectines et l'hémicellulose. Beaucoup de ces espèces s'attachent aux fibres qu'elles dégradent; ainsi, *B. succinogenes* adhère aux parois des cellules végétales et les hydrolyse en y creusant des cavités.

Dans le rumen, il y a un grand nombre de polymères à hydrolyser; ceci nécessite une variété d'enzymes. Chez *B. succinogenes*, on a pu mettre en évidence un complexe multienzymatique formé de 19 protéines différentes possédant une activité β -endoglucanasique (Forsberg et Groleau, 1982; Schellhorn et Forsberg, 1984).

Parfois, ces enzymes proviennent de plusieurs bactéries qui vont collaborer à une digestion totale des structures complexes. Il a été montré que l'on obtient une meilleure dégradation lorsque des souches sont cultivées en cocultures plutôt qu'en cultures pures (Osborne et Dehority, 1989). Ainsi, *B. succinogenes* dégrade l'hémicellulose mais ne l'utilise pas. Mais quand il est combiné avec *B. ruminicola* (hémicellulolytique), on a une meilleure utilisation de l'hémicellulose qu'avec *B. ruminicola* seul. De plus, ces auteurs ont montré que

l'isolement et la caractérisation des bactéries du rumen sur des substrats purifiés peuvent induire en erreur sur leurs rôles dans la fermentation du rumen.

Enfin, la lignine qui est un polymère des cellules végétales représente un facteur limitant la digestion de ces cellules dans le rumen. En effet, elle n'est pas dégradée par les micro-organismes.

Certains auteurs (Forsberg *et al.*, 1986; Russell et Wilson, 1988; Patterson, 1989) pensent qu'il serait intéressant de manipuler génétiquement la microflore du rumen. D'après Forsberg *et al.* (1986), il serait possible d'envisager par exemple:

- d'introduire des améliorations ou des nouvelles voies de dégradation pour les aliments du bétail.
- de modifier la répartition des substances produites dans le rumen par fermentation afin d'optimiser cette même fermentation.
- de produire dans le rumen des métabolites (ex: vitamines, hormones) afin d'améliorer la croissance des ruminants.
- de supprimer la croissance et les activités métaboliques d'organismes indésirables.

Ces manipulations génétiques seraient en effet d'un intérêt considérable pour les nutritionnistes des ruminants.

Substrat	Bactéries utilisatrices
Cellulose, xylane	<i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminicoccus flavefaciens</i> et <i>R. albus</i> , quelques protozoaires
Amidon	<i>Bacteroides amylophilus</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Succinimonas amylolytica</i>
Pectine, Saccharose	<i>Bacteroides ruminicola</i> , <i>Lachnospira multiparus</i>
Hémicellulose	<i>Bacteroides ruminicola</i> , <i>Ruminicoccus albus</i> et <i>R. flavefaciens</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
CO ₂	Tous les <i>Bacteroides</i> , <i>Methanobacterium</i> spp.
Lipides	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Ac lactique, succinique	<i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Veillonella</i> spp.

Tableau 3: Substrats utilisés par les bactéries du rumen.
(Hungate, 1985; Lin *et al.*, 1985; Patterson, 1989)

4 - BESOINS NUTRITIONNELS ET METABOLISME ENERGETIQUE.

4.1 - Besoins nutritionnels.

Les bactéries saccharoclastiques du genre *Bacteroides* ont besoin du CO₂ pour leur croissance. Elles peuvent ainsi synthétiser des acides gras volatils. Ces acides à faible nombre de carbones vont abaisser le pH des cultures de 7,2 à 5,0, d'où la nécessité de tamponner le milieu.

Les températures de croissance sont comprises entre 25 et 45°C selon leur habitat. D'après la définition du Bergey's manual (Holdeman *et al.*, 1984), ces bactéries sont anaérobies strictes. Néanmoins, elles peuvent survivre à des expositions à l'air de 6 à 8 heures. Ceci serait en rapport avec la présence ou l'absence de superoxyde-dismutase; les bactéries les plus sensibles à l'oxygène en étant dépourvues. De plus, certaines bactéries de la flore buccale comme *Bacteroides gingivalis* et *B. asaccharolyticus* sont encore moins sensibles à l'oxygène; elles peuvent survivre à des expositions de plus de 24 heures (Van Winkelhoff *et al.*, 1986).

Les *Bacteroides* du côlon sont des bactéries faciles à cultiver car peu exigeantes. Leur temps de génération sur milieu riche complémenté en hémine et en vitamine B12 est de 1 heure à 37°C. Il est nécessaire de compléter les milieux de culture en hémine car cette molécule est indispensable à la formation du cytochrome b et de la NADH-fumarate-oxydo-réductase qui catalyse la synthèse d'acide succinique à partir d'acide fumarique. L'acide succinique formé étant excrété à l'extérieur de la cellule (Macy et Probst, 1979). Donc, en présence d'hémine, les principaux produits formés par fermentation sont l'acide succinique et l'acide fumarique. Par contre, en absence d'hémine, ce sont l'acide fumarique et l'acide lactique qui sont produits.

Les *Bacteroides* du rumen sont beaucoup plus exigeants que les précédents. En effet, ils nécessitent un grand nombre de facteurs de croissance qui ne seront fournis que par l'adjonction de jus de rumen au milieu de culture.

4.2 - Métabolisme énergétique.

Les *Bacteroides* intestinaux dégradent les produits non digérés par l'hôte. De ce fait, ils hydrolysent une grande variété de polysaccharides complexes pour donner des monosaccharides à 5 ou 6 carbones.

4.2.1 - Formation du pyruvate.

Les monosaccharides produits par hydrolyse des polysaccharides vont passer à travers la membrane cytoplasmique par un mécanisme qui n'est pas encore très connu. Une fois dans la cellule, ces monosaccharides vont être dégradés par la voie d'Embden-Meyerhof. D'ailleurs, une activité fructose-1,6-diphosphate-aldolase a été mise en évidence chez *Bacteroides eggerthii*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ruminicola*, *B. succinogenes* et *B. amylophilus* (Macy et Probst, 1979).

4.2.2 - Rôle du CO₂ dans le catabolisme du phospho-énolpyruvate.

Chez *Bacteroides fragilis* et *B. ruminicola*, une PEP carboxykinase ATP-dépendante permet le passage du phospho-énolpyruvate (PEP) en acide oxaloacétique (AOA) avec formation d'ATP. L'AOA formé est ensuite réduit en malate sous l'action d'une malate-déshydrogénase à NAD. Du malate, on passe au fumarate qui est ensuite réduit en succinate par la NADH-fumarate-oxydoréductase. Cette réaction permet la formation d'ATP par un système primitif transporteur d'électrons. C'est ce succinate formé qui est le principal produit de la fermentation.

D'autres espèces sont capables de produire du propionate à partir du succinate. Dans ce cas, le succinate donne du succinyl-CoA, puis du méthyl-malonyl-CoA par transfert d'un groupement méthyl par la méthyl-malonyl-CoA-mutase qui est exigeante en vitamine B12. Ce méthyl-malonyl-CoA, par libération de CO₂, donne le propionyl-CoA qui lui-même conduit au propionate.

4.2.3 - Formation d'autres produits de fermentation.

En plus du succinate et du propionate, d'autres produits normaux de la fermentation peuvent être formés comme l'acétate, le formate, le butyrate, le lactate et l'hydrogène.

Le lactate est probablement produit par réduction du pyruvate par une lactate-déshydrogénase à NAD. Pour former l'acétate, l'acétyl-CoA est préalablement synthétisé par décarboxylation oxydative du pyruvate; la flavine réduite lors de cette réaction étant utilisée pour la réduction du fumarate en succinate.

4.2.4 - Phosphorylations oxydatives.

L'énergie nécessaire aux synthèses peut être fournie par des réactions de phosphorylation du catabolisme. Mais elle peut aussi être générée par des réactions de phosphorylation oxydative, par un système primitif transporteur d'électrons qui utilise le NADH, des quinones et des cytochromes.

D'ailleurs, *Bacteroides fragilis* et *B. ruminicola* synthétisent un cytochrome de type b qui est formé d'un noyau porphyrinique dont la synthèse nécessiterait l'apport d'hémine dans le milieu de culture. Le cytochrome b est impliqué dans la réaction de réduction du fumarate en succinate. Chez *Bacteroides*, le fumarate est l'accepteur final des électrons du catabolisme et l'enzyme catalysant la réduction forme un complexe lié à la membrane

cytoplasmique, auquel sont associés le cytochrome b et la ménaquinone.

Les donneurs d'électrons pour la réduction du fumarate varient selon les espèces (ex: NADH, formate, H_2 , FMN). Mais le donneur d'électrons le plus commun est le $NADH+H^+$ qui procure les électrons à la fumarate-réductase par une déshydrogénase liée à la membrane. L'utilisation d'hydrogène moléculaire a été mise en évidence chez *Bacteroides ruminicola*; en effet, quand cette bactérie est cultivée sous atmosphère de H_2/CO_2 , on remarque une augmentation de la synthèse de propionate (donc une utilisation plus accrue du fumarate).

Le NAD^+ pourra être réduit par une déshydrogénase à condition que le potentiel d'oxydoréduction intracellulaire soit très bas.

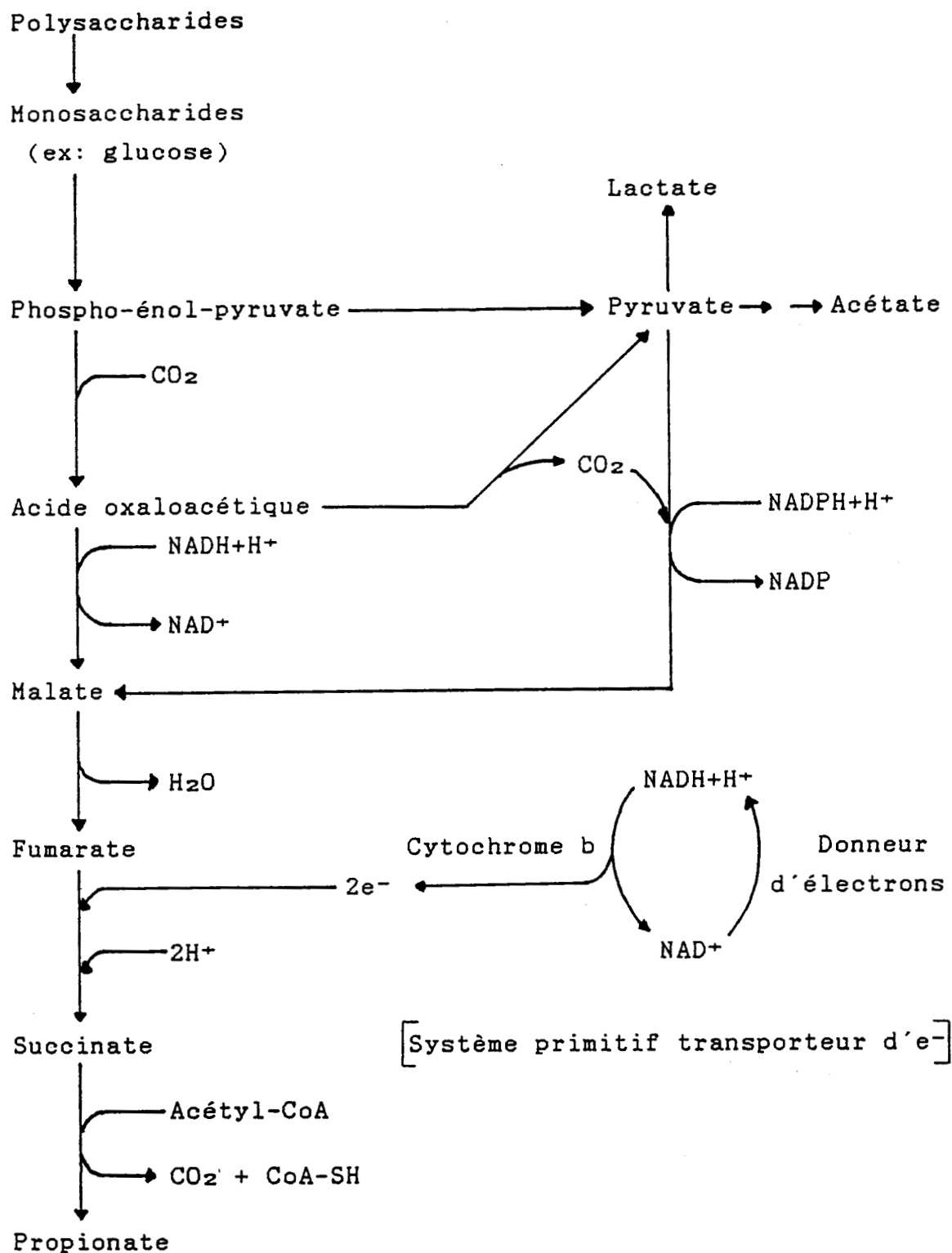


Figure 2: Résumé des voies métaboliques des sucres chez *Bacteroides fragilis* (Macy et Probst, 1979).

5 - RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.

La résistance aux antibiotiques est difficile à estimer car il existe une réelle différence entre les sensibilités *in vitro* et *in vivo*. En ce qui concerne les bactéries anaérobies, la méthode de mesure reconnue repose sur la culture des souches en milieux gélosés en présence de différentes concentrations en antibiotiques (Aldridge et Sanders, 1987).

Les *Bacteroides* du côlon et de la bouche sont tous résistants aux aminoglycosides comme la kanamycine, et à l'acide nalidixique car leur membrane est imperméable à ces molécules. La plus grande partie des souches est sensible au chloramphénicol et au métronidazole. 15 % des souches sont résistantes à la tétracycline. Pour la résistance à la tétracycline qui est de nature chromosomique, *Bacteroides* est capable de la transférer par conjugaison (Salyers *et al.*, 1987).

La résistance aux β -lactames de ces bactéries est due à la synthèse de β -lactamases dans l'espace périplasmique; cette résistance provient donc d'une compétition entre le passage de la molécule d'antibiotique et le taux de synthèse d'enzyme capable de la dégrader. Cependant, chez *Bacteroides distasonis*, on a une synthèse très faible de β -lactamases et une résistance forte. Dans ce cas, c'est l'antibiotique qui ne peut pénétrer dans la bactérie.

La clindamycine est l'antibiotique de choix dans le traitement des infections à *Bacteroides*. Néanmoins, 8 % des souches sont résistantes et ce nombre apparaît être en augmentation. En fait, comme pour la résistance à la tétracycline, ce serait dû à des transferts conjugatifs.

Les *Bacteroides* du rumen ont un profil de résistance aux antibiotiques très proche des autres *Bacteroides*. Ils

sont tous résistants à la kanamycine et à l'acide nalidixique; la plus grande partie des souches est sensible à la clindamycine, à la tétracycline et à l'ampicilline (Flint et Stewart, 1987).

6 - ACTIVITES ENZYMATIQUES DE BACTEROIDES DEGRADANT LES POLYSACCHARIDES.

6.1 - *Bacteroides* du tractus digestif de l'homme.

6.1.1 - *Bacteroides* de la cavité buccale.

La plupart des espèces de *Bacteroides* vivant dans la bouche sont des bactéries asaccharolytiques telles *Bacteroides melaninogenicus*, *B. asaccharolyticus*, *B. endodontalis* ou *B. gingivalis*. Ces bactéries ont un métabolisme essentiellement protéolytique.

Chez *Bacteroides oralis*, on a mis en évidence une dégradation de polysaccharides. Cette bactérie est saccharoclastique et possède l'équipement enzymatique capable de dégrader le dextran qui est un polymère de molécules de glucose liées en α -1,6. Sur cette chaîne principale sont greffées en α -1,3 des chaînes plus courtes. Cette bactérie possède 2 dextranases (une périplasmique et une cytoplasmique) qui hydrolysent les liaisons α -1,6 et α -1,3 glucaniques ainsi qu'une mutanase cytoplasmique qui n'hydrolyse que les liaisons α -1,3 (Takahashi *et al.*, 1985).

Chez *Bacteroides ochraceus* qui a été renommé *Capnocytophaga ochracea* par Leadbetter *et al.* (1979) a été également mise en évidence une activité dextranase (Staat et Schachtele, 1976).

6.1.2 - *Bacteroides* du côlon.

Les monosaccharides et les disaccharides ne sont pas ou très peu présents dans le côlon car ils sont absorbés pendant le passage dans l'intestin grêle. De ce fait, la source principale de glucides dans le côlon pour des bactéries saccharolytiques comme *Bacteroides* est constituée par les polysaccharides non digérés par les systèmes enzymatiques de l'hôte; ces polysaccharides provenant des parois des cellules végétales ou des sécrétions de l'hôte (mucines, mucopolysaccharides).

Quelques espèces comme *Bacteroides thetaiotaomicron* peuvent fermenter une grande variété de polysaccharides; ceci représente un avantage car, dans le côlon, les bactéries sont confrontées continuellement à des variations d'apport alimentaire.

Parmi ces multiples polysaccharides, on pouvait se demander si certains contribuaient plus à la nutrition *in vivo* que d'autres. En utilisant des mutants par transposition de *Bacteroides thetaiotaomicron* déficients dans la capacité d'utiliser certains polysaccharides, Salyers et Pajeau (1989) ont montré que cette bactérie utilise *in vivo* de petites quantités d'une grande variété de polysaccharides plutôt qu'une quantité plus importante d'un ou de deux polysaccharides particuliers. En effet, si *Bacteroides* comptait principalement sur un ou deux polysaccharides *in vivo*, les mutations affectant l'utilisation de ces composés particuliers seraient létales pour la bactérie alors que les mutations affectant celle des autres polysaccharides n'auraient aucun effet. En fait, les mutations les plus létales pour *B. thetaiotaomicron* sont celles intervenant sur les systèmes enzymatiques de dégradation et d'utilisation de plusieurs polysaccharides.

Une quantité assez importante d'enzymes participant à la dégradation de polysaccharides tels que l'amidon, les

pectines ou l'acide polygalacturonique, le dextran, la chondroïtine sulfate a été caractérisée. Leurs caractéristiques et leurs modes d'action sont développés à la suite de ce paragraphe.

* Dégradation de l'amidon.

Chez deux souches prédominantes du côlon, *Bacteroides vulgatus* et *B. thetaiotaomicron*, les systèmes enzymatiques associés à la dégradation de l'amidon ont été caractérisés. L'amidon est le plus souvent constitué d'amylose et d'amylopectine. L'amylose étant un polyholoside à chaînes linéaires de D-glucose liés en α -1,4 et l'amylopectine étant constituée de chaînes principales d'amylose avec des branchements en α -1,6 de chaînes de 20 à 25 molécules de glucose en α -1,4.

Bacteroides vulgatus représente un cas plus ou moins particulier parmi le genre *Bacteroides*. En effet, *B. vulgatus* n'utilise pas une grande variété de polysaccharides. Les seuls substrats qui lui permettent une bonne croissance sont l'amylose et l'amylopectine. Des polysaccharides comme ceux des parois des cellules végétales ou ceux sécrétés par l'hôte sont dégradés très difficilement. Cette bactérie dégrade donc dans le côlon les petites quantités d'amidon qui ne l'ont pas été dans l'intestin grêle à l'aide de 2 enzymes qui sont une α -glucosidase et une amylase (McCarthy *et al.*, 1988). Aucune de ces 2 activités n'est extracellulaire mais toutes les 2 sont inductibles par l'amylose et l'amylopectine.

60 % des activités enzymatiques sont solubles (donc périplasmiques ou cytoplasmiques) et 40 % sont membranaires. D'autre part, une grande partie de l'activité α -amylase cellulaire se copurifie avec l'activité α -glucosidase, ce qui permet de penser que l' α -glucosidase aurait une certaine activité α -amylasique. L' α -glucosidase

a été plus particulièrement étudiée; cet enzyme a une masse moléculaire de 79000 Da.

Bacteroides thetaiotaomicron peut utiliser l'amylose et l'amylopectine comme seule source de carbone et d'énergie. Les enzymes qui dégradent ces polysaccharides sont associés à la cellule (espace périplasmique); de plus, deux autres enzymes impliqués dans la dégradation ont été localisés dans le cytoplasme: il s'agit d'une α -glucosidase et d'une maltase. D'autre part, Anderson et Salyers (1989a) ont remarqué que des cellules intactes de *B. thetaiotaomicron* se lient à de l'amidon marqué au ^{14}C .

Cette fixation serait due à une protéine car il existe un niveau de saturation et la fixation est réduite par traitement des cellules à la protéinase K. Ainsi, les auteurs estiment qu'il y aurait 400000 sites de fixation par cellule. Le taux de fixation d'amidon est beaucoup plus élevé en cas de croissance bactérienne sur des milieux induisant la synthèse des enzymes de dégradation; donc on peut parler de corégulation pour les gènes codant les composants des sites de fixation et pour ceux codant pour les activités enzymatiques de dégradation. Ceci a d'ailleurs été démontré par l'intermédiaire de mutants incapables de se développer sur amidon mais capables de synthétiser les enzymes de dégradation (Anderson et Salyers, 1989b). Enfin, les enzymes de dégradation tout comme les protéines se liant à l'amidon sont induits par le maltose.

Ces résultats montrent que l'utilisation de l'amidon par *Bacteroides thetaiotaomicron* n'implique pas d'enzymes extracellulaires. En fait, l'attachement de la molécule d'amidon à la surface cellulaire représente une première étape permettant aux molécules de passer la membrane externe et de se retrouver dans l'espace périplasmique.

* Dégradation du pullulane.

Le pullulane est un polysaccharide linéaire parfois classé dans les amidons. En effet, comme ce dernier, il est un polymère de D-glucose. Il est constitué d'une répétition régulière d'unités de maltotriose reliées en α -1,6; le maltotriose étant une structure de 3 molécules de glucose liées en α -1,4. La pullulanase coupe les liaisons α -1,6 pour donner comme produit final de réaction du maltotriose.

Smith et Salyers (1989) ont caractérisé cette activité enzymatique. La pullulanase est un enzyme inductible par la présence de son substrat; celui-ci a un pH optimum de réaction de 6,5 et une masse moléculaire de 77000 Da. En ce qui concerne sa localisation cellulaire, l'activité est associée à la cellule et se répartit comme suit: 80 % soluble et 20 % associée à la membrane.

Cette activité a été clonée par les mêmes auteurs chez *E. coli*. Ensuite, une mutagenèse dirigée effectuée par insertion a été faite chez *Bacteroides*. Les résultats montrent qu'il existerait une seconde activité pullulanase. En fait, l'observation que l'on ait 20 % d'activité associée à la membrane pourrait indiquer que l'on ait deux enzymes. D'ailleurs, ce type de distribution a déjà été montré dans le cas de deux polygalacturonases de *Bacteroides thetaiotaomicron* (McCarthy et al., 1985) et de galactomannases de *B. ovatus* (Gherardini et Salyers, 1987a et b).

* Dégradation des cyclodextrines.

Les cyclodextrines ne sont pas réellement des polymères; ce sont en fait des oligosaccharides composés de 6 unités ou plus de glucose liées en α -1,4. Leur caractéristique principale étant le fait que ces molécules sont cycliques. Ce caractère explique pourquoi ces molécules ne sont hydrolysées que très doucement par les amylases salivaires et intestinales. Cependant, elles

peuvent être fermentées par les bactéries anaérobies du côlon pour produire des produits reconnus pour leur valeur nutritionnelle (ex: acides gras).

Plusieurs *Bacteroides* du côlon sont capables de dégrader les cyclodextrines; il s'agit entre autres de *Bacteroides distasonis*, *B. ovatus*, *B. eggerthii*, *B. uniformis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus* et *B. fragilis*. Antenucci et Palmer (1984) ont étudié plus particulièrement les activités cyclodextrinases des deux premières espèces. Ces activités sont en majorité liées à la cellule et elles sont inductibles. La dégradation s'effectue à pH 6,8 et à 37°C. Dans ces conditions, la dégradation commence après 1 à 2 heures et elle est quasiment complète en 18 heures. Comme le temps de transit dans le côlon est évalué à une trentaine d'heures et que l'enzyme est inductible, on voit que la bactérie a suffisamment de temps pour réagir à la présence du substrat et pour le dégrader.

Par contre, même si les enzymes de *B. distasonis* et *B. ovatus* agissent dans des conditions similaires, elles n'ont pas les mêmes mécanismes d'action car les produits d'hydrolyse sont différents. En effet, la cyclodextrinase de *B. ovatus* ne produit que du glucose à partir des cyclodextrines alors que celle de *B. distasonis* engendre la production d'une série de composés (glucose, maltose, maltotriose).

* Dégradation des pectines et du polygalacturonate.

Les matières pectiques sont des polysaccharides situés dans les parois cellulaires et dans les ciments intercellulaires des tissus végétaux. Elles sont formées de chaînes d'acide D-galacturonique lié en α -1,4 (acide polygalacturonique), partiellement estérifiées par le méthanol et associées à des arabanes et à des galactanes.

Bacteroides thetaiotaomicron est capable d'utiliser l'acide polygalacturonique (PGA) comme seule source de carbone et d'énergie (McCarthy *et al.*, 1985). Quand cette bactérie est mise en culture en présence de PGA comme seule source de carbone, deux polygalacturonases sont produites. Il s'agit d'une PGA-lyase (EC 4.2.2.2) soluble, associée à la cellule mais non périplasmique et d'une PGA-hydrolase (EC 3.2.1.15) associée à la membrane interne. Ces 2 enzymes sont inductibles par le PGA. La lyase libère un disaccharide insaturé alors que l'hydrolase engendre la libération d'acide galacturonique. Ces 2 enzymes semblent régulés de la même façon.

Il semble curieux que ces 2 enzymes soient internes à la cellule car on peut se demander comment de grosses molécules chargées négativement peuvent passer la membrane externe pour se retrouver en contact avec les enzymes de dégradation. En fait, puisque les polysaccharides sont trop gros pour diffuser librement à travers des pores de la membrane externe (qui admettent mono et disaccharides), des auteurs pensent qu'il existe des protéines membranaires spécialisées permettant le passage de polysaccharides au travers de la membrane externe. De plus, tous les enzymes de dégradation de polysaccharides qui ont été étudiés jusqu'à présent sont inductibles et donc il se pourrait que ce soit le cas d'autres protéines comme des protéines membranaires nécessaires au catabolisme de polysaccharides.

Pour déterminer si certaines protéines de la membrane externe sont associées à la croissance de *Bacteroides* sur polysaccharides, Kotarski et Salyers (1984) ont mis au point un protocole de séparation des membranes externes et internes. En analysant la composition de ces membranes, ils ont remarqué que plusieurs polypeptides n'étaient présents dans la membrane externe que quand la bactérie était cultivée en présence de polysaccharides (ex: chondroïtine sulfate, arabinogalactane ou PGA). Ces polypeptides étaient

absents de la membrane quand la bactérie était mise en culture sur les monosaccharides composants des polymères. C'est ainsi qu'un polypeptide de 104000 Da a été plus particulièrement mis en évidence en forte concentration quand la bactérie se développe sur un milieu nutritif contenant des polysaccharides chargés négativement tels le PGA ou la chondroïtine-sulfate.

Kotarski et Salyers (1984) pensent que quelques-uns de ces polypeptides pourraient être des enzymes dégradant les polysaccharides en grands fragments, des protéines se liant au substrat ou encore des protéines constitutives de pores qui agiraient en synergie pour faciliter le passage des polysaccharides au travers de la membrane externe.

McCarthy et Salyers (1986) ont testé d'autres espèces de *Bacteroides* que *B. thetaiotaomicron*. Ainsi, *B. vulgatus*, *B. ovatus* et *B. fragilis* dégradent le PGA. Les PGA-lyases de ces organismes ont été comparées à celle de *Bacteroides thetaiotaomicron* précédemment décrite (McCarthy *et al.*, 1985). En fait, toutes les PGA-lyases sont inductibles par le PGA, sont solubles et sont associées à la cellule. Elles ont toutes des valeurs de pH optimum comprises entre 8,4 et 8,8 et une masse moléculaire de l'ordre de 50000 Da. Ces PGA-lyases donnent la formation de disaccharides insaturés. Pour ces espèces, le PGA ne semble pas être une source majeure de carbone et d'énergie puisque les activités PGA-lyases sont toujours inductibles.

Enfin, Jensen et Canale-Parola (1986) ont isolé du côlon 2 nouvelles espèces nommées *Bacteroides pectinophilus* et *Bacteroides galacturonicus*. Chez celles-ci, la dépolymérisation de la pectine se fait sous l'action de 2 enzymes: le premier est une pectine-méthyl-estérase (EC 3.1.1.11) extracellulaire qui désestérifie la pectine avec libération de groupements méthyl-esters; le second est une exopectate-lyase extracellulaire originale car elle libère des composés trigalacturoniques insaturés (et non

digalacturoniques) à partir du polymère déméthylé. Ce polymère déméthylé étant le PGA qui est le principal constituant de la pectine désestérifiée. Ces 2 espèces utilisent des exopectate-lyases distinctes car elles ont des valeurs de pH optimum différentes: 9,5 pour *B. pectinophilus* et 8,3 pour *B. galacturonicus*. Ces enzymes sont tous deux inductibles.

* Dégradation de galactomannanes.

La gomme guar est un galactomannane constitué de longues chaînes de mannoses liés en β -1,4 avec des branches de galactoses liés en α -1,6. Pour dégrader cette structure, il faut un ou plusieurs enzymes qui coupent le squelette mannane (β -mannanase) et un ou plusieurs enzymes qui libèrent les résidus de galactose (α -galactosidase).

Quand *Bacteroides ovatus* est cultivé sur gomme guar, il produit une α -galactosidase I qui est différente des α -galactosidases II produites lors de cultures sur galactose, mélibiose, raffinose ou stachiose (Gherardini *et al.*, 1985). Les 2 enzymes (I et II) semblent être des trimères avec des valeurs de pH optimum semblables (enzyme I, pH 6,2; enzyme II, pH 6,4). Cependant, les poids monomériques sont de 85000 Da pour l'enzyme I et de 80500 Da pour l'enzyme II. Aucun des 2 enzymes ne peut libérer du galactose de la gomme guar native mais tous les 2 le peuvent si cette gomme a été partiellement dégradée par une mannanase.

Ces enzymes ne sont pas extracellulaires. Ils sont solubles et sont associés à la cellule. Comme tous les enzymes énumérés auparavant, ils sont inductibles par leurs substrats respectifs. Les α -galactosidases I et II semblent être régulées séparément; par contre, l' α -galactosidase I serait régulée en même temps que les activités mannanases.

Gherardini et Salyers (1987a et b) ont isolé de la même souche 2 activités mannanases associées à la cellule; l'une est liée à la membrane externe et l'autre est cytoplasmique. L'activité liée à la membrane externe représente 30 % de l'activité totale associée à la cellule. L'enzyme soluble est beaucoup plus stable que l'enzyme membranaire. Par contre, les 2 enzymes sont inductibles et ont le même mécanisme d'action; ils donnent tous les 2 de grands fragments par mécanisme endolytique. Les 2 mannanases ne peuvent amener la formation de monosaccharides que si les résidus de galactose ont été préalablement libérés par une α -galactosidase.

Il semblerait qu'en fait la gomme guar soit dégradée en grands fragments par la mannanase membranaire; que ces fragments soient transportés dans le cytoplasme où ils seraient totalement dégradés par les actions conjuguées des α -galactosidases et mannanases solubles. Les 2 mannanases et les α -galactosidases semblent suffisantes pour dégrader la gomme guar en monosaccharides.

Chez *Bacteroides fragilis*, Berg et al. (1980) ont isolé une α -galactosidase extracellulaire. Cet enzyme a un pH optimum de 5,5 et un poids moléculaire non dénaturé de 125000 Da. La localisation de l'enzyme est surprenante. Les auteurs ont bien isolé l'enzyme du surnageant de culture mais n'ont pas mesuré l'activité liée à la cellule; la possibilité d'une lyse cellulaire n'a pas été envisagée.

* Dégradation de la chondroïtine-sulfate.

La chondroïtine-sulfate est un polymère linéaire et soluble. Il est formé par la répétition d'un dimère d'acide glucuronique lié en β -1,3 avec une N-acétyl-galactosamine. Cette N-acétyl-galactosamine porte un ester de sulfate sur le carbone 4 dans le cas de la chondroïtine-sulfate A ou sur le carbone 6 pour la chondroïtine-sulfate C. Ce

polymère a un poids moléculaire variant entre 10000 et 20000.

Bacteroides thetaiotaomicron peut utiliser ce mucopolysaccharide comme seule source de carbone (Salyers et O'Brien, 1980a). Les enzymes impliqués sont tout d'abord une chondroïtine-sulfate-lyase (EC 4.2.2.4) qui libère des disaccharides sulfatés insaturés par β -élimination; ensuite, une chondroïtine 4- ou 6-sulfate-hydrolase (EC 3.1.6.4) élimine le résidu sulfate du disaccharide insaturé; enfin, une β -glucuronidase coupe le disaccharide désulfaté pour libérer de la N-acétyl-galactosamine et un acide glucuronique insaturé.

Malgré le haut poids moléculaire de la chondroïtine-sulfate, aucun des enzymes impliqués dans sa dégradation n'est extracellulaire. 2 chondroïtine-sulfate-lyases ont été mise en évidence (Linn et al., 1983). Ces 2 enzymes sont actifs sur les chondroïtine-sulfate A, B et C mais ne le sont pas sur des polymères très sulfatés comme l'héparine. Sinon, ces 2 enzymes sont très semblables: ils sont tous les deux périplasmiques, les poids moléculaires sont de 107000 pour la chondroïtine-lyase I et de 104000 pour la lyase II, les valeurs de pH optimum sont identiques à 0,2 ou 0,4 unités près. La sulfatase est un enzyme intracellulaire; donc les disaccharides sulfatés insaturés doivent être transportés dans la cellule avant d'être désulfatés et coupés en monosaccharides par la glucuronidase.

Les activités chondroïtine-sulfate-lyases sont inductibles. Quand la bactérie est cultivée sur glucose, une très faible quantité de lyase est présente constitutivement alors que lorsque *B. thetaiotaomicron* est incubé en présence de chondroïtine-sulfate A, l'activité spécifique de la lyase est multipliée par 10 en 90 mn (Salyers et Kotarski, 1980b). Les inducteurs de ces enzymes sont soit la chondroïtine-sulfate elle-même soit ses

oligomères s'ils sont constitués d'au moins 8 monosaccharides. Si la souche est en présence d'un substrat plus facilement fermentescible que les inducteurs, l'induction des chondroïtine-sulfate-lyases n'aura pas lieu (Salyers *et al.*, 1983).

Les taux de croissance sur chondroïtine-sulfate en conditions limitantes sont de 48 g de cellule sèche par mole d'équivalent monosaccharides pour un temps de génération de 3,5 heures et de 32 g pour un temps de 24 h (Salyers *et al.*, 1982). Ces taux de croissance sont comparables avec ceux obtenus par Kotarski et Salyers (1981) sur acide glucuronique qui est un des composants de la chondroïtine-sulfate. Par contre, l'activité spécifique des chondroïtine-sulfate-lyases diminue de 40 % quand on passe d'un temps de génération de 12 à 24 h. Ceci est contraire au comportement de beaucoup d'enzymes glycolytiques et de disaccharidases dont les activités spécifiques restent constantes quels que soient les temps de génération (Kotarski et Salyers, 1981).

Comme dans le cas de la dégradation du PGA, des protéines de la membrane externe associées à la croissance sur chondroïtine-sulfate ont été mises en évidence (Kotarski *et al.*, 1985). Ces protéines sont distinctes de celles associées à la croissance bactérienne sur d'autres polymères chargés négativement comme le PGA ou l'héparine. En fait, 4 protéines semblent régulées en coordination avec la synthèse de 2 enzymes dégradant la chondroïtine-sulfate: les chondroïtine-sulfate-lyases I et II.

La chondroïtine-sulfate-lyase II a été clonée chez *E. coli* (Guthrie *et al.*, 1985). Le gène cloné a ensuite été utilisé par Guthrie et Salyers (1986) pour approfondir les connaissances des mécanismes de dégradation. Ainsi, à l'aide d'un vecteur suicide de *Bacteroides*, ils ont obtenu par mutagenèse par insertion des coupures dans le gène de la chondroïtine-lyase II. Les mutants obtenus ne peuvent

produire de lyase II mais sont tout de même capables d'utiliser la chondroïtine-sulfate comme seule source de carbone. Donc, malgré que l'activité lyase I ne représente que 30 % de l'activité lyase totale, elle est suffisante pour la croissance. D'ailleurs, ce mutant est capable de coloniser et de ne pas se laisser supplanter par le type sauvage dans le tractus digestif exempt de germes d'une souris (Salyers et Guthrie, 1988a; Salyers *et al.*, 1988b).

Enfin, Guthrie et Salyers (1987) ont mis en évidence l'existence d'un opéron où les gènes de la chondroïtine-sulfate-lyase et de la chondro-4-sulfatase sont adjacents. D'autre part, la chondroïtine-sulfate-lyase I a une plus forte affinité pour la chondroïtine-6-sulfate et la lyase II pour la chondroïtine-4-sulfate. Donc, l'opéron mis en évidence semble approprié à une utilisation préférentielle de la chondroïtine-4-sulfate. On peut ainsi penser qu'il existe un second opéron plus approprié à la dégradation de la chondroïtine-6-sulfate.

Bacteroides ovatus est également capable d'utiliser la chondroïtine-sulfate (Lipeski *et al.*, 1986). Cette espèce produit 2 chondroïtine-sulfate-lyases qui ont des caractéristiques cinétiques identiques à celles de *B. thetaiotaomicron* déjà décrites. Cependant, des anticorps dirigés contre la chondroïtine-lyase II de *Bacteroides thetaiotaomicron* clonée chez *E. coli* ne réagissent pas avec les enzymes de *B. ovatus*. Ces enzymes sont inductibles, solubles et associés à la cellule. Il existe une autre différence entre les 2 espèces, elle se situe au niveau des polypeptides de la membrane externe (qui sont induits par le même substrat que les enzymes) qui n'ont pas les mêmes poids moléculaires.

* Dégradation de la laminarine.

La laminarine est un polymère de glucose en β -1,3 semblable à certains polysaccharides des parois des

cellules végétales. Chez 3 espèces de bactéries du côlon (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. distasonis* et *B. fragilis*), les activités laminarase (EC 3.2.1.6) et β -glucosidase (EC 3.2.1.21) ont été étudiées (Salyers *et al.*, 1977). La laminarase est un complexe enzymatique qui implique 3 types d'activités: une β -glucosidase qui hydrolyse les di- ou trisaccharides, une exoglucanase qui enlève les résidus de glucose des extrémités réductrices de la laminarine, et une endoglucanase qui libère des oligomères constitués de 2 monosaccharides ou plus.

La laminarinase est un enzyme inductible par la laminarine et son activité est associée à la cellule. Cet enzyme agit différemment suivant les espèces. En effet, le produit majeur d'hydrolyse est le glucose dans le cas de *B. thetaiotaomicron* alors qu'il s'agit d'oligomères de glucose (de 2 à 5) pour *B. distasonis*.

La β -glucosidase est présente chez les trois espèces, elle est liée à la cellule et est induite aussi bien par les disaccharides de glucose que par la laminarine.

* Dégradation du dextran.

Holbrook et McMillan (1977) ont testé 334 souches appartenant à la famille des *Bacteroidaceae*. Les souches de *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus* dégradent et utilisent le dextran. Ceci sera vu plus en détail dans le paragraphe consacré aux dextranases.

* Dégradation d'autres polymères.

Beaucoup d'autres polymères ou de composés non dégradés par l'homme peuvent être hydrolysés par les souches de *Bacteroides* du côlon. Les activités impliquées ont été mises en évidence mais n'ont pas pour le moment été caractérisées.

Ainsi, *B. thetaiotaomicron* possède le potentiel enzymatique pour dégrader les arabinogalactanes qui sont des polymères en β -1,3 de galactose et d'arabinose (Salyers *et al.*, 1981). Chez *B. fragilis*, 6 glycosidases ont été mises en évidence. Il s'agit d' α - et de β -glucosidase, d' α - et de β -galactosidase, d'une α -fucosidase et d'une β -N-acétyl glucosaminidase (Berg *et al.*, 1980)

Il existe d'autres composés que des souches de *Bacteroides* sont capables d'utiliser. Ce ne sont pas de gros polysaccharides, mais des composés polyphénoliques produits par les végétaux: les glucoflavonoïdes. Ceux-ci ne sont pas dégradés par l'homme. *Bacteroides distasonis*, *B. fragilis*, *B. ovatus* et *B. uniformis* produisent une β -glucosidase non inductible pouvant dégrader certains de ces composés. *B. distasonis* produit également une α -rhamnosidase et une β -galactosidase. Dans le cas des glucoflavonoïdes, il apparaît qu'il soit nécessaire d'avoir un enzyme spécifique par sucre conjugué mais également un enzyme spécifique de la position de la liaison du sucre conjugué sur le flavonoïde (Bokkenheuser *et al.*, 1987).

Tout dernièrement, des activités xylanase, xylosidase et arabinosidase ont été mises en évidence chez *Bacteroides ovatus* et clonées chez *E. coli* (Whitehead et Hespell, 1990b).

En conclusion sur les systèmes enzymatiques de dégradation de polysaccharides des *Bacteroides* du côlon, nous voyons qu'ils sont plus répandus dans la nature associés aux cellules qu'extracellulaires; ceci tout spécialement dans des environnements où les compétitions sont très actives comme le côlon. En effet, dans ces environnements, la production d'enzymes extracellulaires n'est pas envisageable et souhaitable si les produits d'hydrolyse sont volontiers utilisés par les autres bactéries.

6.2 - *Bacteroides* du tractus digestif des ruminants.

Dans le rumen se trouvent 3 espèces du genre *Bacteroides*. Il s'agit de *B. succinogenes*, *B. ruminicola* et *B. amylophilus*. Ces 3 bactéries sont capables de dégrader les composés des parois des cellules végétales que le bovin ingère; elles ne peuvent pas séparément digérer tous les polysaccharides végétaux mais leurs actions conjuguées amènent l'hydrolyse de ces polysaccharides. *B. succinogenes* est une bactérie cellulolytique, xylanolytique, amylolytique et dextrinolytique; *B. ruminicola* est hémicellulolytique, xylanolytique, amylolytique et dextrinolytique alors que *B. amylophilus* est amylolytique et dextrinolytique (Lin *et al.*, 1985; Patterson, 1989). A l'heure actuelle, *B. succinogenes* a été renommé *Fibrobacter succinogenes* (Montgomery *et al.*, 1988) et *B. amylophilus* en *Ruminobacter amylophilus* (Stackebrandt *et* Hippe, 1986).

* *Bacteroides succinogenes*.

C'est la bactérie cellulolytique prédominante du rumen et c'est le seul microorganisme cellulolytique capable de dégrader activement les fibres de coton. Le mécanisme par lequel elle dégrade les fibres végétales dans le rumen fait intervenir plusieurs enzymes parmi lesquels on trouve: endoglucanases (carboxyméthyl-cellulase), exoglucanases, xylanases et cellobiohydrolases (Stewart *et* Flint, 1989).

Lorsque les cellules de *B. succinogenes* sont cultivées sur cellulose, 80 % de l'activité endoglucanase sont présents dans le surnageant de culture (Groleau *et* Forsberg, 1981; 1983). De 50 à 60 % de cette activité extracellulaire ont été trouvés associés à des fragments membranaires sédimentables (Forsberg *et al.*, 1981; Groleau *et* Forsberg, 1983) qui sont des vésicules membranaires se fixant sur le substrat pour le dégrader. La preuve qu'il existe plusieurs endoglucanases a été donnée par Forsberg

et Groleau (1982) et par Schellhorn et Forsberg (1984). Ainsi, d'après Forsberg *et al.* (1986), il y aurait 19 protéines différentes portant une activité β -endo-glucanasique.

2 endoglucanases ont d'ailleurs été purifiées de la fraction non sédimentable (McGavin et Forsberg, 1988); elles diffèrent dans leur poids moléculaire et dans les produits qu'elles libèrent de la cellulose. Des xylanases extracellulaires (80 % de l'activité totale) sont aussi détectables de cellules cultivées sur cellulose (Forsberg *et al.*, 1981).

2 enzymes ayant une activité cellobiosidase, mais très peu d'activité carboxyméthyl-cellulase, ont été purifiés. L'activité du premier (MM 75000), purifié du surnageant de culture, est stimulée par des anions comme le chlore (Huang *et al.*, 1988b), et ne peut hydrolyser la cellulase cristalline. Le second enzyme (MM 50000), non stimulé par les ions chlore, se trouve dans l'espace périplasmique et dans le milieu extracellulaire (Huang et Forsberg, 1987; 1988a). La cellobiosidase extracellulaire a une faible affinité pour la cellulose cristalline donc elle doit agir à un stade tardif de la dégradation de la cellulose. De plus, *B. succinogenes* possède une activité cellobiase (β -glucosidase) largement associée à la cellule (Groleau et Forsberg, 1981).

La multiplicité des endoglucanases provient de modifications post-traductionnelles et de la multiplicité de gènes (McGavin et Forsberg, 1988). Ainsi, Crosby *et al.* (1984) ont cloné 6 gènes différents.

D'autres activités enzymatiques de *Bacteroides succinogenes* ont été étudiées puis clonées chez *E. coli*. Il s'agit entre autres d'une xylanase extracellulaire synthétisée en présence de cellulose comme seule source de carbone (Sipat *et al.*, 1987), d'une lichenase (1,3-1,4- β -

glucanase; EC 3.2.1.73) (Irvin et Teather, 1988) ou d'une cellodextrinase (Gong et al., 1989).

* *Bacteroides ruminicola*.

Cette bactérie est un des seuls microorganismes du rumen qui soit hémicellulolytique. Ce polysaccharide est chimiquement le plus complexe des polysaccharides végétaux. Il est constitué de chaînes linéaires de xyloses liés en β -1,4 sur lesquelles sont fixées des branches contenant d'autres sucres comme l'arabinose, le glucose, le mannose, le galactose ou le rhamnose.

Beaucoup d'activités enzymatiques ont été mises en évidence chez *B. ruminicola*. Ainsi, cette bactérie peut dégrader les composés pectiques; elle possède en effet une activité poly- α -1,4-galacturonate-lyase (EC 4.2.2.2), libérant des composés insaturés, qui a été partiellement purifiée avec une activité pectine-estérase, ainsi qu'une pectine-hydrolase (EC 3.2.1.15) (Wojciechowicz, 1971; 1972). Gradel et Dehority (1972) ont montré que *B. ruminicola* utilise l'acide galacturonique comme seule source de carbone; de plus, il est capable d'utiliser la pectine.

Si cette bactérie peut hydrolyser de nombreux polymères complexes, c'est parce qu'elle possède de nombreuses activités enzymatiques. Williams et Withers (1985) ont mesuré les activités hydrolases en fonction du cycle de croissance. Ils ont mis en évidence les activités suivantes: α - et β -glucosidases, α - et β -galactosidases, β -mannosidase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, hémicellulase B, xylanase et pectinase. Ces enzymes sont principalement associés à la cellule et leurs activités spécifiques sont maximales en fin de phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire.

Une β -glucosidase (EC 3.2.1.21) a été purifiée par Strobel et Russell (1987); cet enzyme n'est pas extracellulaire et il subit une répression catabolique par le glucose.

B. ruminicola produit également une amylase quand il est cultivé sur maltose ou amidon; en cas de croissance sur glucose, cette activité est très réduite. D'autre part, il est intéressant de remarquer que la localisation de l'enzyme est différente suivant la source de carbone utilisée. Ainsi, si la croissance se fait sur amidon, l'activité amylasique est fortement associée aux cellules, alors qu'en cas de croissance sur maltose, l'activité est extracellulaire (Cotta, 1988).

Des gènes responsables de la synthèse d'enzymes de dégradation de polysaccharides ont été clonés chez *E. coli*. Il s'agit des gènes d'une endoglucanase (Woods et al., 1989) et d'une xylanase (Whitehead et Hespell, 1989; 1990a).

* *Bacteroides amylophilus*.

Depuis 1986, cette espèce de *Bacteroides* a été reclassée parmi les bactéries pourpres sous le nom de *Ruminobacter amylophilus* (Stackebrandt et Hippe, 1986) et elle n'apparaît plus sous la dénomination *Bacteroides*.

Afin de démontrer que la dégradation des parois des cellules végétales s'effectue à l'aide d'une synergie entre plusieurs microorganismes, Osborne et Dehority (1989) ont étudié les capacités dégradatives de 3 bactéries spécialisées chacune dans l'hydrolyse d'un composé différent des cellules végétales. Ils ont utilisé en cultures pures et mixtes *Bacteroides* (*Fibrobacter*) *succinogenes* (cellulolytique), *Bacteroides ruminicola* (hémicellulolytique) ainsi que *Lachnospira multiparus* (pectinolytique). Ces cultures furent donc inoculées

séparément et ensemble avec toutes les combinaisons possibles pour être ensuite analysées pour la digestion de la cellulose et pour la dégradation et l'utilisation de l'hémicellulose et de la pectine.

Ainsi, une bactérie comme *B. succinogenes* dégrade mais ne peut utiliser l'hémicellulose; par contre, quand cette bactérie est combinée avec *B. ruminicola*, on a une meilleure utilisation de l'hémicellulose qu'avec *B. ruminicola* seul. Les mêmes résultats sont obtenus avec la pectine que *B. succinogenes* peut dégrader mais non utiliser alors que *B. ruminicola* peut la dégrader et l'utiliser; quand ces 2 bactéries sont ensemble, la dégradation et l'utilisation sont beaucoup plus fortes.

6.3 - *Bacteroides* des autres habitats.

* *Bacteroides* isolés des vases d'égout.

La souche de *Bacteroides cellulosolvens* a été isolée par Patel (1983). Cette souche possède une activité cellulasique dont 75 % sont associés à la cellule. Cette activité est inhibée par le cellobiose (Murray, 1987; Giuliano et Khan, 1985). La morphologie des souches est différente selon que la souche est cultivée sur cellulose ou sur cellobiose (Murray *et al.*, 1986b). Sur cellulose, les cellules produisent des sortes d'excroissances autour de la cellule; ce sont ces structures qui possèdent les activités cellulasiques et qui aident à l'attachement des cellules sur le substrat. D'ailleurs, Lamed *et al.* (1987) ont montré l'existence de structures spécialisées au niveau de la surface des cellules des bactéries cellulolytiques. Comme dans le cas d'autres cellulases, Murray (1986a) montre que l'on a une meilleure dégradation de la cellulose si un deuxième microorganisme est cultivé en coculture. Ainsi, une coculture de *B. cellulosolvens* et de *Clostridium saccharolyticum* fermente 30 % de cellulose en plus qu'une culture de *B. cellulosolvens* seul.

En fait, *B. cellulosolvens* hydrolyse la cellulose et fournit en sucres *C. saccharolyticum* qui est une bactérie saccharolytique et qui va faire disparaître du milieu des inhibiteurs comme le cellobiose formé par la dégradation de la cellulose.

Une autre bactérie du genre *Bacteroides* isolée des vases d'égout est *B. polypragmatus*. Cette bactérie possède une activité β -galactosidase (Patel, 1983; Patel *et al.*, 1985) qui est associée à la cellule et qui est inductible. De plus, cette souche a une activité β -glucosidase intracellulaire (McKenzie et Patel, 1986). Ceci lui permet de dégrader les cellodextrines qui sont des hydrolysats de cellulose. C'est le cellobiose qui est inducteur de la β -glucosidase. En fait, *B. polypragmatus* est une des seules bactéries connues incapables de dégrader la cellulose mais capable d'hydrolyser les cellodextrines. Ceci est très intéressant car les β -glucosidases sont souvent les facteurs limitants au passage de la cellulose en glucose. En effet, en utilisant un microorganisme qui est capable de se développer sur les sucres solubles de la cellulose, il ne sera plus nécessaire de supplémenter en β -glucosidase les préparations de dégradation de cellulose. De plus, contrairement à beaucoup d'activités semblables, cet enzyme n'est pas inhibée par un rapport glucose / cellobiose de 2; donc, la dégradation vers le glucose n'est pas ralentie par le produit final de la réaction. Enfin, d'un point de vue applications, cet enzyme est très intéressant de part sa stabilité; il a une demi-vie de 12 heures à 50°C en absence de glycérol.

* *Bacteroides* isolés du fumier de bovins.

Scholten-Koerselman *et al.* (1986) ont isolé de ce milieu une nouvelle espèce: *Bacteroides xylanolyticus*. Cette bactérie a 2 activités enzymatiques inductibles: une carboxyméthyl-cellulase et une xylanase. De plus, elle produit un petit peu d'activité cellulase mais ne peut

pousser sur cellulose. La localisation des activités n'a pas été recherchée précisément mais les activités semblent soit intracellulaires soit associées à la cellule.

7 - GENES DE BACTEROIDES CLONES.

7.1 - Gènes responsables d'activités enzymatiques de dégradation de polysaccharides.

* Chondroïtine-lyase de *B. thetaiotaomicron*.

Cette espèce synthétise 2 chondroïtine-sulfate-lyases I et II inductibles localisées dans l'espace périplasmique (Linn *et al.*, 1983). A partir d'une banque cosmidique dans le pH79, 2 clones ont été isolés; ensuite, un sous-clonage a été effectué dans le pBR328 (Guthrie *et al.*, 1985). La protéine clonée a été identifiée à la chondroïtine-lyase II de *Bacteroides thetaiotaomicron*; elle lui est similaire mais pas identique. En effet, sa masse est d'environ 95000 à 100000 Da alors que la protéine originelle a une masse de 104000; de plus, l'enzyme semble associé à la membrane chez *E. coli*. Un plasmide suicide a été utilisé pour inactiver par insertion le gène de la chondroïtine-lyase II de *B. thetaiotaomicron*. Ainsi, il a été remarqué que ce gène n'est pas essentiel pour l'utilisation de la chondroïtine-sulfate (Guthrie et Salyers, 1986). Des études suivantes ont montré que le gène d'une chondro-4-sulfatase (qui est la protéine qui intervient dans la dégradation du substrat juste après l'action de la lyase) est adjacent au gène cloné. En fait, ces 2 gènes seraient organisés en opéron (Guthrie et Salyers, 1987).

* Pullulanase de *B. thetaiotaomicron*.

De la même banque dans le pH79, 2 clones capables de dégrader le pullulane ont été isolés (Smith et Salyers, 1989). La taille minimale de l'insert conférant une activité est de moins de 3000 pb; comme chez *Bacteroides*,

la plus grande partie de l'activité est cytoplasmique. L'enzyme est exprimé chez *E. coli* à un niveau très élevé. A la différence de la souche d'origine, l'activité clonée est constitutive. A l'aide du gène cloné, il a été réalisé une mutagenèse par insertion chez *Bacteroides* qui a montré qu'il existerait une seconde activité pullulanase.

* Activités β -glucanases de *B. succinogenes*.

Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes est un des plus importants microorganismes cellulolytiques du rumen car il possède une grande quantité d'endoglucanases (Schellhorn et Forsberg, 1984). 6 gènes correspondant furent clonés chez *E. coli* à l'aide du vecteur d'expression pUC8 (Crosby *et al.*, 1984). Le sous-clonage d'un fragment de 1900 pb augmente l'activité; celle-ci étant localisée dans l'espace périplasmique. L'activité est réprimée par le glucose et la dégradation de la carboxyméthyl-cellulose se fait plus au hasard qu'avec le complexe enzymatique de *Bacteroides*. En effet, l'enzyme cloné donne des valeurs de K_m 17 fois plus fortes pour l'hydrolyse de la carboxyméthyl-cellulose que le complexe endoglucanase extracellulaire de *B. succinogenes* (Taylor *et al.*, 1987). De plus, cette activité est associée avec les activités cellobiosidase et lichenase; ce qui montre que la spécificité d'action serait moins grande chez *E. coli* (Taylor *et al.*, 1987).

Bacteroides succinogenes possède une activité xylanolytique extracellulaire qui lui permet de dégrader l'hémicellulose (Forsberg *et al.*, 1981). Le plasmide vecteur utilisé fut le pBR322. 2 clones ayant le même insert de 9400 pb furent sélectionnés (Sipat *et al.*, 1987). Un sous-clonage dans les vecteurs pUC18 et 19 a été réalisé et un clone possédant un insert de 3000 pb a été isolé mais son activité xylanase est 10 fois moindre qu'avec le pBR322. L'enzyme cloné se trouve à 46 % dans l'espace périplasmique. Le niveau d'expression du gène est identique

si les cellules sont cultivées sur glucose ou non; donc l'expression de ce gène n'est pas sujette à la répression catabolique contrairement aux gènes de l'endoglucanase clonés chez *E. coli* (Taylor *et al.*, 1987). De plus, l'enzyme n'est pas induit par le xylane ou le xylose.

Un gène codant pour une activité cellodextrinase a été clonée avec le pBR322 chez *E. coli* (Gong *et al.*, 1989). De 100000 clones testés, 2 furent positifs; ils possèdent tous deux un insert de 7700 pb qui fut réduit à 2500 pb sans altérer l'activité. Bien que non induit par le cellobiose, l'enzyme était sensible à la répression catabolique par le glucose et avait des propriétés semblables à l'enzyme de départ. La localisation de l'enzyme est différente: cytoplasmique chez *E. coli*, extracellulaire chez *Bacteroides*.

D'une banque génomique dans le pUC8, Irvin et Teather (1988) ont isolé 6 clones parmi 20000 ayant une forte activité contre les composés contenant des liaisons β -1,3 et β -1,4 comme le lichénane. Ces 6 clones possèdent le même insert de 5200 pb; celui-ci a été réduit à une taille de 1350 pb, et la forte activité exprimée est sous le contrôle de son promoteur propre. Les propriétés physico-chimiques de l'enzyme cloné sont très semblables à celles de la β -1,4 glucanase isolée de *B.succinogenes* par Huang et Forsberg (1987). L'enzyme cloné hydrolyse le lichénane et non l'amidon, la carboxyméthyl-cellulose, la laminarine et le xylane (Erfle *et al.*, 1988).

* Activité β -glucanase de *B. ruminicola* ss. esp. *brevis*.

Un gène codant pour l'activité endo β -1,4-glucanase a été cloné chez *E. coli*. Un clone contenant un insert de 6400 pb a été sélectionné pour sa capacité à dégrader la carboxyméthyl-cellulose et le xylane soluble. Le sous-clonage dans les vecteurs pUC18 et 19 a permis de réduire la taille du gène à 2200 pb et de conclure que le promoteur

Bacteroides est présent chez *E. coli* mais n'est pas fonctionnel (Woods et al., 1989).

* Activité xylanase de *B. ruminicola*.

Whitehead et Hespell (1989) ont cloné le gène de la xylanase de *B. ruminicola* ss. esp. *ruminicola* chez *E. coli* à l'aide du vecteur pUC18. 6 clones ont donné un halo de dégradation sur agar au bleu brillant Rémazol xylane. Ceux-ci ont tous un insert de 5700 pb qui fut réduit à 2700 pb. Le gène cloné apparaît être sous le contrôle de son propre promoteur et l'activité produite est beaucoup plus forte chez *E. coli* que chez *Bacteroides*.

Récemment, ce gène cloné chez *E. coli* a été mis sur le plasmide pVAL1 qui a été transféré par conjugaison chez 2 souches de *Bacteroides* du côlon: *B. fragilis* et *B. uniformis* (Whitehead et Hespell, 1990a). Le gène cloné s'est exprimé dans les 2 espèces et l'activité spécifique de la xylanase s'est révélée être 1400 fois plus grande que chez la souche d'où provient le gène; c'est-à-dire *Bacteroides ruminicola*. Ce résultat est important car c'est la première fois qu'il est montré que des souches de *Bacteroides* du côlon puissent exprimer un gène introduit par conjugaison provenant d'un *Bacteroides* du rumen.

* Activité xylanase de *B. ovatus*.

Tout récemment, Whitehead et Hespell (1990 b) ont cloné chez *E. coli* les gènes codant pour les activités xylanase, xylosidase et arabinosidase. Le plasmide utilisé est le pUC18 et l'insert de DNA codant pour les 3 activités a une taille de 3800 pb. Par sous-clonage, il semble que le fragment codant pour la seule activité xylanase ait une taille d'environ 2000 pb. Ces 3 activités clonées sont associées à la cellule et donnent la formation d'un halo de dégradation sur agar au bleu brillant Rémazol xylane.

* Activité neuraminidase de *B. fragilis*.

L'activité neuraminidase n'est pas réellement une activité de dégradation de polysaccharides. En effet, elle ne permet que de retirer les acides sialiques terminaux des chaînes d'oligosaccharides complexes ou des glycoprotéines. L'activité *nanH* a été clonée chez *E. coli* sur le vecteur navette pJST61 par Russo *et al.* (1990) et elle aurait un poids moléculaire d'environ 50000 Da; elle n'est pas inductible chez *E. coli* alors qu'elle l'est chez *Bacteroides*.

7.2 - Autres gènes.

* Gènes de la piline de *B. nodosus*.

Cette espèce asaccharolytique est responsable de la maladie du pied du mouton. Les pilis portés par la bactérie sont responsables de l'attachement sur le pied du mouton et provoquent une réponse immunitaire de l'hôte. 9 sérogroupes ont été identifiés par réactions immunologiques croisées (Finney *et al.*, 1988). Pour fabriquer des vaccins multivalents, le clonage de sous-unités de la piline a été entrepris. Des banques génomiques de 6 souches de *Bacteroides nodosus* de sérogroupes différents ont été faites chez *E. coli*. Les gènes de sous-unités de piline clonées appartiennent aux sérogroupes A (Anderson *et al.*, 1984; Elleman *et al.*, 1984), B (Boulos *et al.*, 1986), C (Finney *et al.*, 1988), G (Elleman *et al.*, 1987), H1 (Elleman *et al.*, 1986b) et H2 (Hoyne *et al.*, 1989). Les séquences des gènes clonés montrent de 77 à 98 % d'homologie avec les gènes originaux.

La piline, chez *E. coli*, se trouve dans la membrane interne; aucun pili mature n'a été trouvé à la surface des cellules. Par sous-clonage dans un plasmide portant un promoteur *trp* puissant, la synthèse de piline de séro groupe A a été multipliée par 1000 (Elleman *et al.*, 1986a). Le gène de cette piline a été sous-cloné dans *Pseudomonas*

aeruginosa (Elleman *et al.*, 1986c); comme il existe de fortes homologues entre les pilines des 2 espèces, la piline de *B. nodosus* a été synthétisée et a généré des pilis chez *Pseudomonas* (Elleman *et al.*, 1986c; Elleman et Stewart, 1988).

* Gènes de protéases de *B. nodosus*.

Des protéases extracellulaires de *B. nodosus* furent purifiées et utilisées pour la fabrication d'un antisérum afin de tester une banque génomique dans le pBR322 chez *E. coli*. Un clone contenant un insert de 2800 pb fut sélectionné mais aucune activité protéase ne fut détectée. Après sous-clonage dans le pUC8, un fragment de 1400 pb donne encore une réponse immunologique. L'hybridation de ce fragment cloné avec des profils de digestion totale de DNA de *B. nodosus* suggère l'existence de plusieurs gènes codant pour la synthèse de protéases (Moses *et al.*, 1989).

* Gènes codant pour la fimbriline de *B. gingivalis*.

Une banque génomique a été construite dans le vecteur pUC13. La protéine clonée a une masse de 36000 Da alors que la protéine native a une masse de 43000 Da. De plus, aucune homologie n'a été trouvée avec les sous-unités de piline de *B. nodosus* clonée chez *E. coli* (Dickinson *et al.*, 1988).

* Gènes *recA* de *B. fragilis*.

Une banque de gènes fut testée afin d'isoler un mutant *recA*⁻. Le plasmide utilisé comme vecteur est le pEcoR251. Un plasmide fut caractérisé avec un insert de 5200 pb de *B. fragilis*; cet insert n'a aucune homologie avec un profil de digestion totale de DNA d'une souche d'*E. coli recA*⁺. Par contre, il y eut réponse immunologique contre des anticorps spécifiques de protéines d'*E. coli recA*⁻; ceci a montré que le clone sélectionné produit 2 protéines qui ont pour masses moléculaires 37000 et 39000 Da (Goodman *et al.*, 1987).

* Gènes impliqués dans la synthèse d'acides-amino.

Un gène glutamine-synthétase *glnA* fut cloné à l'aide du plasmide pJS139 chez un mutant d'*E. coli* délété sur le gène *glnA*. Le gène fut localisé dans un fragment de 4200 pb de l'insert de 8000 pb. L'activité est réprimée par le glutamate et la glutamine, ce qui montre que le gène est sous le contrôle de son promoteur propre. Aucune homologie ne fut trouvée avec le gène *glnA* d'*E. coli*. La taille apparente du produit du gène est de 75000 Da (Southern *et al.*, 1986; 1987).

8 - LE DEXTRAN.

Le dextran est un polymère de haut poids moléculaire constitué de l'assemblage de D-glucopyranose. Les monomères de glucose sont liés en α -1,6 pour former de longues chaînes linéaires sur lesquelles sont branchées des chaînes latérales de plus d'un monomère de glucose. Au niveau des points de branchement, ce sont des liaisons α -1,3. Dans la plupart des cas, le rapport α -1,6/ α -1,3 est de 95 / 5 (Stringer et Tsuchiya, 1958; Sabatié *et al.*, 1988).

Ce polymère est synthétisé par un enzyme appelé dextransucrase (EC 2.4.1.5) qui catalyse la formation de dextran par transglycosylation à partir du saccharose comme suit:



La dextransucrase est un enzyme produit par des bactéries comme les *Leuconostoc* ou les *Streptocoques*. Ainsi, les *Streptocoques* oraux sécrètent plusieurs glycosyltransférases qui utilisent le saccharose comme substrat pour former des polymères de glucose (Walker, 1972). *Streptococcus sobrinus* synthétise 2 enzymes qui fabriquent du dextran avec des degrés de branchement

différents (Mooser et Iwaoka, 1989); ces polymères servant de support dans la plaque dentaire pour aider la colonisation bactérienne et étant largement responsables de l'exceptionnelle cariogénicité de la bactérie. *Leuconostoc mesenteroides* est la souche utilisée pour la production commerciale; elle produit une dextransucrase de 65000 Da qui synthétise un dextran de fort poids moléculaire (Lindberg et Svensson, 1968; Willemot *et al.*, 1988).

Pour la détermination d'une activité dextransique, le substrat utilisé est le bleu dextran 2000. Cette molécule est constituée d'un dextran de haut poids moléculaire (2 millions) sur lequel sont substituées des molécules de bleu cibacron F3G-A à raison de 1,1 résidu pour 100 résidus de glucose (Böhme *et al.*, 1972; Ashton et Polya, 1978). L'hydrolyse des liaisons α -1,6 dans ce dextran aboutit à la libération du chromophore (Ceska, 1971; Mäkinen et Paunio, 1971).

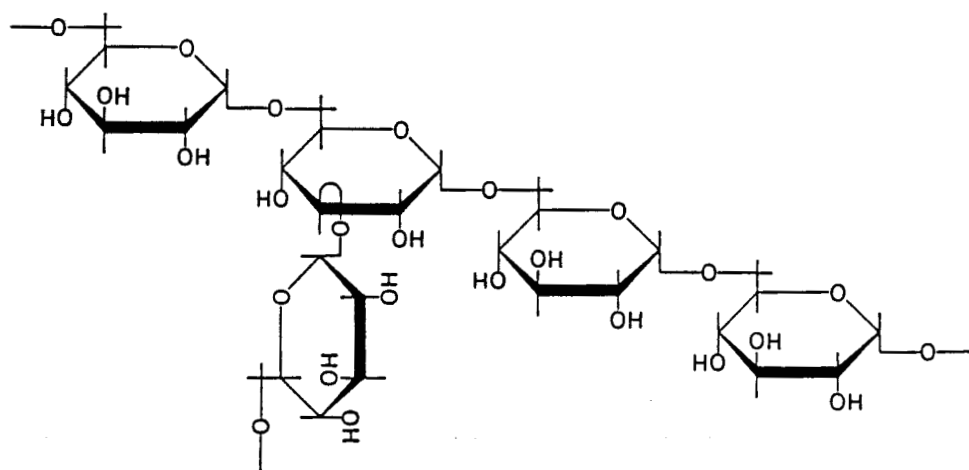


Figure 3: Structure du dextran.

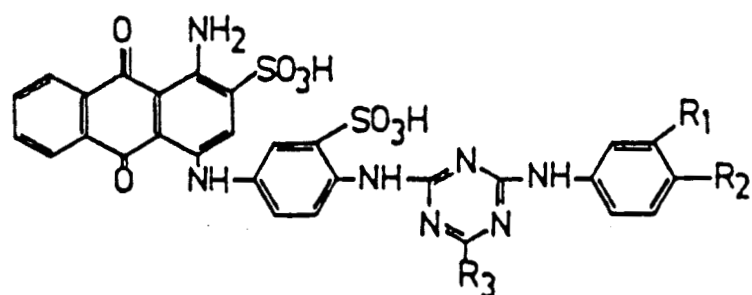


Figure 4: Structure du chromophore du bleu dextran.
($R_1 = R_2 = H$ ou SO_3H ; $R_3 = \text{Dextran T2000}$)

9 - LES DEXTRANASES.

Les dextranases sont des enzymes capables d'être produits par un grand nombre d'organismes tels les levures, les champignons et les bactéries. Ces enzymes sont des α -1,6 glucanohydrolases qui peuvent avoir plusieurs intérêts industriels. Par exemple, ils sont utilisés dans l'industrie de la canne à sucre afin de dégrader les dextrans formés par *Leuconostoc*, ce qui amène une meilleure précipitation du saccharose. D'autre part, ces enzymes sont étudiés par beaucoup de chercheurs japonais en vue de leur adjonction dans les pâtes dentifrices car les dextranases limitent ou empêchent la formation de la plaque dentaire par les *Streptocoques*.

9.1 - Chez les champignons et les levures.

Penicillium est le champignon qui produit les dextranases commerciales. Ainsi, les souches de *Penicillium lilacinum*, *verruculosum* et *funiculosum* synthétisent des dextranases extracellulaires dont les valeurs de pH optimum d'activité sont comprises entre 4,0 et 5,5 (Tsuchiya *et al.*, 1952). L'activité dextranasique de *Penicillium funiculosum* a été plus particulièrement caractérisée; ainsi, Chalet *et al.* (1970) ont isolé une dextranase de 41000 Da libérant de l'isomaltose mais ont montré l'existence de plusieurs isoenzymes dans le milieu extracellulaire. Cet enzyme est inductible par le dextran.

D'autres champignons produisent des dextranases. C'est le cas pour les souches d'*Aspergillus*. Hiraoka *et al.* (1972) ont étudié l'activité dextranasique d'*A. carneus*. 2 enzymes extracellulaires inductibles ont été isolés; ils ont des valeurs de pH optimum compris entre 5,0 et 5,5 et un des 2 enzymes a un poids moléculaire de 71000 Da. L'activité enzymatique de ce champignon est plus importante que celle des souches de *Penicillium*.

Chez *Chaetomium gracile*, 2 dextranases ont été caractérisées; elles ont un pH optimum de 5,5 et ont des poids moléculaires de 71 et 77000 Da. Ces enzymes sont inductibles par le dextran et sont des endodextranases extracellulaires (Hattori *et al.*, 1981b).

Une activité enzymatique a également été caractérisée chez *Paecilomyces lilacinus* (Lee et Fox, 1985). 2 isoenzymes extracellulaires ont été mis en évidence; ils ont des valeurs de pH optimum de 4,5 et des températures optimales d'activité de 55°C.

Beaucoup d'autres champignons ont une activité dextranasique; en effet, Hattori et Ishibashi (1981a) ont trouvé en testant 556 souches que 16 genres de champignons étaient capables de dégrader le dextran. Dans presque tous les cas, les activités sont inductibles par le substrat.

Parmi les levures, *Lipomyces starkeyi* a été la souche la plus étudiée. Webb et Spencer-Martins (1983) ont reporté les premiers la capacité de cette levure à hydrolyser le dextran. Cette souche produit l'enzyme entre pH 3,0 et 5,0 (Koenig et Day, 1988a) et présente l'avantage pour l'exploitation industrielle de ne produire ni antibiotiques ni métaboliques toxiques. L'augmentation de la production d'enzymes a été possible à l'aide d'un mutant dérégulé vis à vis de la synthèse de dextranases et induit par le dextran (Koenig et Day, 1988b; 1989b). La dextranase de *L. starkeyi* a été purifiée; le pH optimum est de 5,0 et la température optimale d'activité est de 55°C. 4 bandes ont été obtenues en électrophorèse et elles correspondent à des variants plus ou moins glycosylés du même enzyme qui est une endodextranase (Koenig et Day, 1989a).

9.2 - Chez les bactéries autres que *Bacteroides*.

Parmi les bactéries Gram-positives, certaines sont productrices de dextranases comme *Arthrobacter globiformis*,

Lactobacillus bifidus ou *Streptococcus mutans* et *S. sobrinus*.

Chez une souche humaine de *Lactobacillus bifidus*, une activité dextranase a été mise en évidence dans le milieu extracellulaire. L'enzyme a une activité optimale avec des valeurs de pH comprises entre 5,4 et 6,5 (Bailey et Clarke, 1959). Cet enzyme a été très peu étudié.

Arthrobacter globiformis est une bactérie du sol capable de dégrader le dextran. Plusieurs enzymes extracellulaires ont été isolés. Ainsi, une isomalto-dextranase (EC 3.2.1.94) a été mise en évidence chez la souche T6 et une glucodextranase (EC 3.2.1.70) chez la souche I42. L'isomalto-dextranase étant un enzyme ne libérant que de l'isomaltose à partir des extrémités non réductrices du dextran alors que la glucodextranase ne libère que du glucose à partir des extrémités réductrices (Takayanagi *et al.*, 1987). Chez la souche T6, l'isomalto-dextranase a été purifiée. Cet enzyme a un poids moléculaire de 69000 Da et une activité optimale à pH 5,3 et à 65°C; son mode de coupure est de type exo (Okada *et al.*, 1988a). En poussant plus loin leurs investigations, les mêmes auteurs ont remarqué que cette activité est accompagnée par une activité isopullulanase (EC 3.2.1.57) capable donc d'hydrolyser les liaisons α -1,4. Il semble que ce soit le même enzyme qui ait les 2 activités car les étapes de purification se superposent et les valeurs de pH et de température optimum sont semblables. Ainsi, un même enzyme serait capable d'hydrolyser les liaisons α -1,6 et α -1,4 (Okada *et al.*, 1988b).

La glucodextranase extracellulaire décrite en 1987 chez la souche I42 a été isolée; cet enzyme a un poids moléculaire de 120000 Da et une activité optimale à pH 6,0 et à 45°C. Son mécanisme d'action est de type exo (Okada *et al.*, 1988c). Avec cet enzyme, une activité glucoamylase (EC 3.2.1.3) a été isolée; son activité optimale est présente

dans les mêmes conditions que pour la glucodextranase. Les auteurs pensent, comme dans le cas des 2 activités de la souche T6, qu'il s'agit d'un même enzyme possédant les activités glucodextranase et glucoamylase (Okada et Unno, 1989).

Les *Streptocoques* représentent un autre genre bactérien pouvant dégrader le dextran. Ainsi, la production de dextranase a été mise en évidence chez *S. mutans* par apparition de zones claires de dégradation en milieu gélosé contenant du bleu dextran (Staat et Schachtele, 1974). Cette activité serait cytoplasmique ou périplasmique et aurait un mécanisme de coupure de type endo. On peut s'étonner du fait qu'une bactérie capable de synthétiser du dextran à l'aide d'une dextransucrase soit également capable de synthétiser des dextranases pour détruire ce dextran préalablement fabriqué. En fait, la dextranase permettrait de récupérer des sucres simples à partir du dextran de la plaque dentaire quand les *Streptocoques* ont des problèmes d'approvisionnement alimentaire.

D'autre part, Walker *et al.* (1981) ont reporté que *S. mutans* produit 2 types de dextranases: une est principalement intracellulaire et est de type exo alors que l'autre est de type endo et est libérée dans le milieu au début de la phase exponentielle de croissance.

Une activité dextranasique fut également trouvée chez *S. sobrinus* (Barrett et Curtiss, 1986). Ces auteurs ont mis en évidence sur gel de polyacrylamide 6 bandes possédant une activité dont 2 bandes majeures de 175000 et 160000 Da. En fait, les 5 bandes de poids moléculaire les plus faibles dériveraient toutes de la bande de 175000 Da par clivage protéolytique par des protéases endogènes de *S. sobrinus*. Cette dextranase est extracellulaire et l'activité est optimale à pH 5,4.

L'activité dextranasique de *S. sobrinus* a été clonée dans le vecteur cosmétique pH79 chez *E. coli* (Barrett *et al.*, 1987). Plusieurs clones positifs ont été obtenus; ils produisent des enzymes qui ont des poids moléculaires variés. On trouve quelques rares clones produisant de façon prédominante une protéine de 175000 Da sinon les protéines les plus courantes ont un poids moléculaire voisin de 150000 Da. Toutes les dextranases exprimées par les clones recombinants furent comparées avec la dextranase de 175000 Da de *S. sobrinus*. Ces dextranases montrent un profil d'homologie complet ou partiel par hybridation et confirment les résultats des masses différentes des protéines. En fait, la protéine clonée de 175000 Da correspond entièrement à la protéine de la souche d'origine, ce qui indique que la totalité du gène codant pour la dextranase a bien été clonée. Pour les autres protéines clonées, il pourrait s'agir soit de modifications post-traductionnelles dues à un clivage protéolytique soit à un clonage incomplet du gène structural de la dextranase.

Streptococcus mitis a également la capacité de synthétiser une activité dextranasique mais la seule caractéristique connue est la localisation cytoplasmique de l'enzyme (Linder *et al.*, 1983).

D'autres bactéries Gram-positives possèdent des activités dextranasiques sans que celles-ci soient plus particulièrement caractérisées. Il s'agit entre autres de *Oerskovia xanthineolytica* qui est une bactérie anaérobie facultative du sol (Hayward et Sly, 1976) ou de *Actinomyces israelii* de la cavité buccale humaine qui possède une dextranase extracellulaire (Schachtele *et al.*, 1975).

Chez les bactéries Gram-négatives autres que *Bacteroides*, 3 travaux sommaires ont montré l'existence de dextranases. Une activité enzymatique a été isolée d'une bactérie du genre *Cytophaga*; elle est liée aux cellules, a une activité optimale pour des valeurs de pH comprises

entre 5,0 et 6,5 à 50°C et son mécanisme de coupure est de type endo (Janson et Porath, 1966). Richards et Streamer (1972) ont isolé un microorganisme du sol d'un champ de canne à sucre qu'ils n'ont pas pu classer dans un genre bactérien précis. Néanmoins, cette bactérie synthétise des dextranases endocellulaires et extracellulaires toutes 2 inductibles par le dextran. Enfin, Bowman *et al.* (1988) ont mis en évidence une activité dextranasique chez *Pseudomonas mixta*.

9.3 - Chez *Capnocytophaga ochracea* (*B. ochraceus*).

Bacteroides ochraceus a été reclassé en *Capnocytophaga ochracea* (Leadbetter *et al.*, 1979). Cependant, des travaux antérieurs à 1979 ont étudié l'activité dextranasique de cette souche. Ainsi, Staat *et al.* (1973) ont isolé de la plaque dentaire plusieurs microorganismes dont un isolat a été apparenté au genre *Bacteroides*. En précisant ces premiers résultats, cet isolat a été classé dans les souches de *B. ochraceus*, et ont été mises en évidence des activités exo- et endo-dextranases (Schachtele *et al.*, 1975). L'exo-dextranase ne libérant que du glucose à partir du dextran alors que l'endodextranase libère des isomaltodextrines. Staat et Schachtele (1976) ont caractérisé ces activités et montrent que l'on est en présence de 2 enzymes intracellulaires, inductibles, avec des valeurs de pH optimum différentes (5,7 pour l'enzyme coupant suivant un mécanisme endo et 6,8 pour l'autre).

9.4 - Chez les espèces du genre *Bacteroides*.

En ce qui concerne le genre *Bacteroides*, Sery et Hehre (1956) ont été les premiers à mettre en évidence une dégradation du dextran par les bactéries intestinales. Ces auteurs suggèrent que la souche de *Bacteroides* étudiée (dont l'espèce n'est pas précisée) produit 2 dextranases

car ils ont remarqué une rapide réduction de la viscosité du dextran à pH 5,4 (action endohydrolytique) alors qu'à pH 7,3 on a une activité libérant du glucose (action exo). Ces résultats se rapprochent d'ailleurs très fortement de ceux obtenus avec *B. ochraceus* de la cavité buccale (Staat et Schachtele, 1976). Ces 2 enzymes seraient extracellulaires mais la localisation des enzymes n'a pas été étudiée.

Plusieurs autres espèces de *Bacteroides* intestinaux sont capables d'hydrolyser le dextran. En effet, Holbrook et McMillan (1977) ont trouvé parmi 334 souches de *Bacteroidaceae* que la plupart des souches intestinales de *B. thetaiotaomicon* et de *B. ovatus* ainsi que quelques souches de la cavité orale comme *B. oralis* et *B. melaninogenicus* pouvaient dégrader le dextran. Les enzymes n'ont pas été caractérisés mais les auteurs se sont basés sur des tests de dégradation en milieu solide et liquide.

Chez *B. oralis*, 3 enzymes de dégradation de glucanes ont été mis en évidence (Takahashi, 1982). Il s'agit de deux dextranases et d'une mutanase (EC 3.2.1.59); cette dernière étant localisée dans le cytoplasme et hydrolysant les liaisons α -1,3 et non les α -1,6. En ce qui concerne les dextranases, *B. oralis* produit 2 enzymes différents de part leur mode d'action et leur localisation. Le premier de ces 2 enzymes (EC 3.2.1.11) est un endoenzyme de l'espace périplasmique alors que le second est un exoenzyme (EC 3.2.1.70) du cytoplasme. L'endodextranase a un poids moléculaire de 52000 Da et l'exodextranase un poids de 44000 Da (Takahashi *et al.*, 1985).

Comme pour d'autres gros polymères incapables de passer la membrane interne, la dégradation du dextran semble nécessiter dans la plupart des cas 2 enzymes ayant des localisations et des mécanismes d'action différents. En effet par exemple, pour des bactéries de la cavité buccale comme *B. oralis*, la localisation cellulaire des enzymes suggère que l'endoenzyme périplasmique hydrolyse les

polysaccharides de la plaque dentaire en oligosaccharides qui peuvent passer dans le cytoplasme afin d'y être totalement dégradés par l'exodextranase et par la mutanase cytoplasmiques.

Le but de ce travail était d'isoler des gènes de *Bacteroides* dont les produits sont impliqués dans la dégradation de polysaccharides afin d'étudier leur expression chez *E. coli* après clonage. Le système enzymatique qui a été choisi permet à la bactérie d'hydrolyser le dextran et a été peu étudié jusqu'à présent. De plus, il ne semble pas faire intervenir une grande variété d'enzymes comme pour le cas de la dégradation de la chondroïtine-sulfate ou des galactomannanes.

MATERIELS ET METHODES

1 - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.

1.1 - *Escherichia coli*.

Les souches d'*E.coli* utilisées ont les caractères suivants:

- HB101: F⁻, *hsdS20* [*hsdM hsdR*], *ara-14*, *lacY1*,
galK12, *xyl-5*, *proA2*, *leuB6*, *thi-1*, *supE44*,
endoI, *recA13*, *rpsL20* (Sm^r), λ⁻.
- LE392: F⁻, *hsdR514*, [*r⁻k*, *m⁺k*], *lacY1* ou
Δ(*lacIZY*)6 *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*,
supE44, *supF58*, λ⁻.
- C600: F⁻, *galK*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*,
tonA21, *supE44*.
- GM272: F⁻, *dcm-6*, *dam-3*, *metB1*, *hsdS21* (*r⁻ m⁻*),
lacY1 ou *LacZ4*, *galK2*, *mtl-2*, *tonA2* ou
tonA31, *tsx-1* ou *tsx-78*, *supE44*, λ⁻.

En fait, nous avons utilisé un révertant prototrophe (tryptophane et méthionine) de la souche *E. coli* LE392 appelé LE392P.

1.2 - *Bacteroides*.

Les souches utilisées appartiennent aux espèces suivantes:

- <i>fragilis</i>	51	53	69	101
	130	178	181	191
	207	210	214	238
	256	274	290	293
	344	347	356	368
	373	385	440	448
	452	454	455	457
	463	464	470	484
	495	503	513	517
	527	560	561	563
	565	566	611	623
	648	649	653	

- <i>thetaiotaomicron</i>	107	146	217	489
	519			
- <i>distasonis</i>	419	462	524	

2 - PLASMIDES.

Les plasmides suivants ont été utilisés:

- pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977).
- pKC7 (Rao et Rogers, 1979).
- pDR720 (Russell et Bennett, 1982).
- pEAP37 (Kato *et al.*, 1986).

Le pBR322 est un plasmide de 4361 pb, Ap^r, Tc^r, amplifiable au chloramphénicol.

Le pKC7 est un plasmide de 5890 pb, Ap^r, Km^r, amplifiable au chloramphénicol. Il provient du pBR322 auquel a été retiré le fragment *HindIII-BamHI* de 346 pb qui a été remplacé par celui de 1800 pb du Tn5.

Le pDR720 est un plasmide d'environ 4100 pb. Il est Ap^r. Il porte le gène de la galactokinase et le clonage se fait en aval d'un promoteur tryptophane se situant dans un polylinker. Il est amplifiable au chloramphénicol.

Le pEAP37 est un plasmide de 5800 pb, Ap^r, Cm^r, amplifiable à la spectinomycine. Il contient un promoteur d'excrétion et un gène *kil* responsables de la libération de colicine E1. Il permet de faire excréter des protéines qui normalement se trouvent dans l'espace périplasmique.

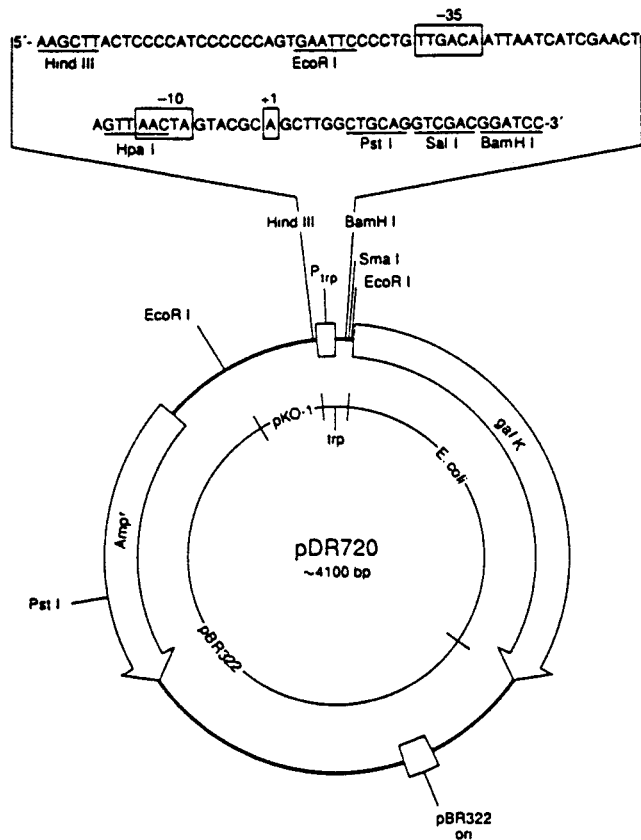


Figure 5: Plasmide pDR720 (Russell et Bennett, 1982).

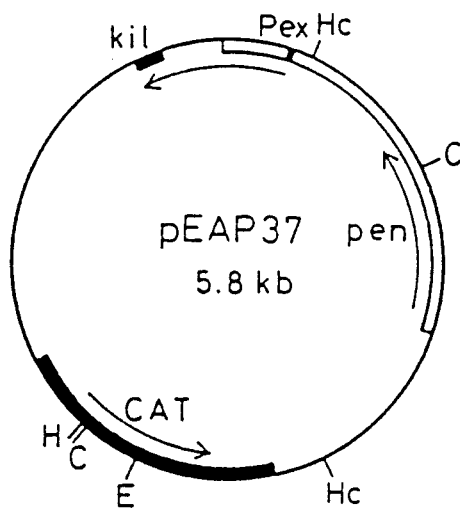


Figure 6: Plasmide pEAP37 (Kato et al., 1986).

3 - MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURES.

3.1 - Culture d'*E. coli*.

* Milieu LB (Luria et Burrous, 1957).

C'est un milieu riche dont la composition est la suivante:

- Extrait de levure 5 g
- Tryptone 10 g
- NaCl 10 g
- Eau distillée qsp 1 l.

Le pH de ce milieu est ajusté à 7,2 par NaOH ou HCl selon le pH initial. La stérilisation est effectuée par autoclavage 20 mn à 120°C. On peut utiliser ce milieu sous forme gélosée par adjonction de 15 g d'agar par litre.

* Milieu TSA (Tryptone-Soy-Agar).

On dissout 40 g de milieu TSA (DIFCO) prêt à l'emploi dans un volume final de 1 litre d'eau distillée. Ce milieu est prégélosé. Il est autoclavé 20 mn à 120°C.

* Milieu ML (Lennox, 1955).

C'est un milieu synthétique dont la composition est la suivante:

- NH_4Cl 5,0 g
- NH_4NO_3 1,0 g
- Na_2SO_4 2,0 g
- K_2HPO_4 9,0 g
- KH_2PO_4 3,0 g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Source de carbone 0,5 g/l
- Eau distillée qsp 1 l.

Le pH est ajusté à 7,2. Selon les exigences de la souche bactérienne à cultiver, on peut compléter ce milieu par des acides aminés à 20 µg/ml et par de la vitamine B1 à 2 µg/ml. Ce milieu peut être gélosé par adjonction de 15 g d'agar par litre. Il est stérilisé par autoclavage 30 mn à 105°C.

* Milieu M9.

C'est un milieu synthétique dont la composition est la suivante:

- Na_2HPO_4 7,0 g
- KH_2PO_4 3,0 g
- NaCl 5,0 g
- NH_4Cl 1,0 g
- CaCl_2 1,1 mg
- MgSO_4 12,0 mg
- Source de carbone 0,5 g
- Eau distillée qsp 1 l.

Le pH est ajusté à 7,2. Comme le milieu ML, ce milieu peut être complété par des acides aminés et de la vitamine B1; il peut également être gélosé. Il est autoclavé 30 mn à 105°C.

3.2 - Culture de *Bacteroides*.

Les souches de *Bacteroides* sont cultivées sous atmosphère anaérobie dans des flacons de type "pénicilline" de 30 ml contenant 10 ml de milieu.

* Bouillon cerveau-cœur (BHI).

Le milieu BHI est un milieu riche que l'on prépare de la façon suivante:

- 37 g de BHI prêt à l'emploi sont dissous dans 1 l d'eau distillée.
- Ajouter 0,5 ml d'une solution de résazurine à 1 mg/ml (utilisée comme indicateur de potentiel Red-Ox).
- Porter à ébullition 15 mn afin d'éliminer l'oxygène dissous.
- Refroidir jusqu'à 45°C sous azote.
- Ajouter 10 ml de solution d'hémine à 0,5 mg/ml et 0,1 ml de solution de vitamine B12 à 0,1 mg/ml.
- Refroidir ensuite sous atmosphère N_2/CO_2 (85/15,v/v) jusqu'à 35°C.

- Dissoudre 0,5 g de cystéine .
- Ajuster le pH à 7,2 avec KHCO_3 .

Le milieu est ensuite conditionné en flacons sous atmosphère N_2/CO_2 ; il peut également être préparé sous forme gélosée après adjonction de 15 g d'agar par litre. La stérilisation se fait à l'autoclave 20 mn à 120°C .

Pour la conservation des souches à -20°C , ce milieu est glycérolé à 20 %.

* Milieu de Caspari et Macy (1983).

Ce milieu est un milieu synthétique dont la composition est la suivante:

- KH_2PO_4 0,450 g
- K_2HPO_4 0,450 g
- NaCl 0,900 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,900 g
- $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g
- $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,020 g
- $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ 0,010 g
- $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,010 g
- Résazurine 0,001 g
- Eau distillée qsp 1 l.

Ensuite, le milieu est préparé de la façon suivante:

- Porter 15 mn à ébullition
- Refroidir sous azote jusqu'à 45°C .
- Ajouter 10 ml de solution d'hémine à 0,5 mg/ml et 0,1 ml de solution de vitamine B12 à 0,1 mg/ml.
- Refroidir sous atmosphère N_2/CO_2 (85/15,v/v) jusqu'à 35°C .
- Dissoudre 0,5 g de cystéine.
- Ajuster le pH à 7,2 avec KHCO_3 .

Le milieu est conditionné en flacon sous atmosphère de N_2/CO_2 . Tout comme le BHI, ce milieu peut être gélosé et il est autoclavé 20 mn à 120°C .

*** Conditions de culture de *Bacteroides*.**

Bacteroides est une bactérie anaérobie stricte. Les ensemencements et les incubations en boîte de Pétri sont effectuées en station anaérobie à 35°C sous atmosphère N₂/CO₂/H₂ (75/15/10, v/v/v). Un catalyseur au palladium permet une formation d'eau entre les traces d'oxygène éventuellement présentes et l'hydrogène du mélange gazeux. Le catalyseur est régénéré toutes les 3 semaines à 160°C pendant 2 heures.

3.3 - Antibiotiques utilisés pour les milieux sélectifs.

Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées par filtration sur des membranes de 0,22 µm de porosité. Elles sont utilisées aux concentrations finales suivantes:

Ampicilline, sel de Na	Ap; Sigma	100 µg/ml.
Chloramphénicol	Cm; Boehringer Mannheim	150 µg/ml.
Streptomycine, sulfate	Sm; Boehringer Mannheim	50 µg/ml.
Tétracycline, HCl	Tc; Sigma	25 µg/ml.

4 - EXTRACTION DE DNA TOTAL DE *BACTEROIDES* ET D'*E. COLI*.

Cette méthode dérive de celle décrite par Dhaese *et al* (1979):

10 ml de culture bactérienne en phase exponentielle tardive de croissance sont centrifugés 10 mn à 6000 g. Le culot est remis en suspension par 3 ml de T50 E20 pH 8,0 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM). On ajoute ensuite 1 ml de sarkosyl à 5 % (p/v) et 1 ml de pronase à 2,5 mg/ml préparés tous deux dans le tampon T50 E20 puis on incube au moins 1 heure à 37°C. Pour rendre homogène le mélange, il est ensuite passé plusieurs fois dans une seringue sans aiguille.

On effectue une déprotéinisation en traitant les 5 ml de lysat par 1 volume de phénol saturé en Tris-HCl 100 mM

pH 8,0. On centrifuge 10 mn à 5000 g et on récupère la phase aqueuse. Cette étape est faite deux fois.

La phase aqueuse est alors extraite deux fois par 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La solution chloroformique est centrifugée 5 mn à 5000 g, le surnageant est prélevé et le DNA est précipité en ajoutant 3/7^{èmes} de volume de NaCl puis 2 volumes d'éthanol à 95° à -20°C.

Après centrifugation 20 mn à 10000 g, le culot est séché sous vide et remis en suspension dans 1,5 ml de T5 EO,5 S5 pH 8,0 (Tris 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 5 mM).

L'échantillon est traité à la RNase à raison de 50 µg/ml pendant 2 heures à 37°C avant d'être ajusté à 0,3 M en NaCl. Puis, une incubation en présence de protéinase K à une concentration finale de 50 µg/ml est effectuée 5 heures à 37°C.

Une nouvelle déprotéinisation est faite par 1 volume de phénol/chloroforme. Après centrifugation 10 mn à 5000 g, le surnageant est prélevé et traité deux fois par 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique. La phase supérieure est prélevée et le DNA est précipité par 2 volumes d'éthanol à 95° à -20°C pendant quelques heures.

Le tube est centrifugé 20 mn à 10000 g, le culot est séché sous vide puis redissous dans 500 µl de T5 EO,5 S5 pH 8,0. Ce DNA purifié peut maintenant être utilisé par exemple pour des digestions par des endonucléases de restriction.

5 - EXTRACTION DE DNA PLASMIDIQUE SELON ISH-HOROWICZ ET BURKE (1981).

Cette méthode est utilisée pour les extractions de plasmides d'*Escherichia coli*. Elle est réalisée comme suit:

200 ml de milieu LB contenant les antibiotiques dont les résistances sont conférées par le plasmide à extraire sont

ensemencés par 2 ml de préculture et incubés à 30°C. Quand la densité optique à 570 nm est comprise entre 0,7 et 0,9, le plasmide est amplifié (s'il dérive du ColE1) par ajout d'une solution de chloramphénicol afin d'obtenir une concentration finale de 150 µg/ml. La culture est ensuite remise en agitation à 30°C pendant 16 à 21 heures avant d'être centrifugée 15 mn à 5000 g à température ambiante. On élimine le surnageant et le culot bactérien est remis en suspension par 9 ml de TE Glucose pH 8,0 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM). On ajoute ensuite 1 ml de lysozyme à 10 mg/ml dans le tampon TE Glucose et on incube 10 mn à température ambiante.

La lyse alcaline est effectuée en ajoutant 20 ml du mélange NaOH 0,2N , SDS 1 %. Après homogénéisation et incubation 5 mn dans la glace, on précipite le DNA chromosomique par addition de 10 ml d'acétate de potassium 3M pH 4,8. On incube 15 mn dans la glace puis on ajoute 2,5 ml d'eau avant de centrifuger 10 mn à 6000 g à 4°C. Afin d'éliminer les éventuels agrégats, le surnageant est passé à travers une seringue contenant de la fibre de verre.

Le DNA plasmidique est précipité par 0,6 volume d'isopropanol à -20°C pendant 1 heure avant d'être centrifugé 20 mn à 10000 g. Le culot est séché sous vide, puis est repris par 2,3 ml de T10 E10 pH 8,0 (Tris 10 mM, EDTA 10 mM). Le pH est ajusté à 7,0 - 8,0 par addition d'environ 100 µl de Tris base 2M. On ajoute 100 µl de RNase à 65 unités/ml, préalablement chauffée à 100°C pendant 10 mn. L'incubation se fait pendant 1 heure à 37°C.

La solution de DNA plasmidique obtenue va être purifiée en gradient de chlorure de césium. Ainsi, à cette solution de DNA, on ajoute 4,2 g de CsCl puis 0,4 ml d'une solution de bromure d'éthidium à 2 mg/ml dans le tampon T10 E10. Ce mélange est introduit dans un tube d'ultracentrifugation en polyallomère de 13 ml (Beckman), puis le tube est complété par une solution de CsCl d'indice de réfraction à 25°C de

1,378 (soit une masse volumique de 1,470 g/ml) déposée délicatement à la surface du mélange. On obtient alors un gradient préformé constitué de 2 couches de CsCl de densités différentes.

La centrifugation est réalisée en 18 heures à 170000 g à 20°C (50000 tr/mn dans un rotor type 70.1 Ti). Ensuite, on recueille sous éclairage UV à 302 nm la bande fluorescente inférieure correspondant au DNA plasmidique sous forme superhélicoïdale.

Le bromure d'éthidium est extrait plusieurs fois par un volume d'isopropanol saturé en CsCl et en T10 E10. Après mélange et centrifugation, on élimine la fraction d'isopropanol enrichie en bromure d'éthidium. On répète cette opération jusqu'à ce que la fluorescence ait disparu de la solution de DNA plasmidique. Ensuite, les traces d'isopropanol sont éliminées 2 fois par extraction par 1 volume d'éther éthylique.

Afin de diluer le CsCl, on ajoute à la solution 2 volumes d'eau distillée. Le DNA plasmidique est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol à -20°C pendant quelques heures. Après centrifugation 20 mn à 10000 g, le précipité est séché sous vide puis remis en suspension dans 200 µl du tampon approprié aux utilisations ultérieures du plasmide. La concentration est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose avec un témoin de DNA de phage lambda de concentration connue.

6 - ELECTROPHORESES.

Les électrophorèses en gel d'agarose peuvent être de différents types.

6.1 - Electrophorèse horizontale.

Par ce type d'électrophorèse, on estime les concentrations des échantillons, leur pureté ainsi que les tailles de leurs fragments de restriction. C'est également cette méthode qui est utilisée pour les électroélutions de fragments.

- Préparation du gel d'agarose.

Celui-ci est préparé à des concentrations variant entre 0,6 et 1,2 % p/v dans le tampon TBE pH 8,3 (Tris 89 mM, acide orthoborique 89 mM, EDTA 2,5 mM). L'agarose dans le TBE est porté à ébullition ; quand sa température est descendue à 55-60°C, le gel est coulé dans un support plastique muni d'un peigne à 8, 10 ou 15 dents. Quand le gel est solidifié, le peigne est retiré et le gel est immergé en présence de TBE dans la cuve d'électrophorèse.

- Dépôts des échantillons.

Dans chaque alvéole formée par les dents du peigne, on dépose 20 à 60 µl d'échantillon. Celui-ci étant constitué pour 2/3 de la solution de DNA et pour 1/3 de tampon d'arrêt pH 7,0 (Saccharose 50 % p/v, EDTA 50 mM, Urée 4M, Bleu de bromophénol 0,1 %).

- Conditions de migration.

La migration se fait avec des différences de potentiel comprises entre 80 et 140 volts à pH 8,3. Le DNA chargé négativement va migrer vers l'anode et le bleu de bromophénol va servir de témoin de migration.

- Révélation du gel.

Après la migration, le gel est placé dans un bac contenant 400 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml. Cette étape de coloration se déroule en 15 à 30 mn. Ensuite, le gel est décoloré dans un bain de 400 ml d'eau pendant 30 mn. Les bandes seront visualisées sous éclairage UV à 302 nm.

6.2 - Electrophorèse verticale: lyse directe sur gel

C'est une méthode utilisée pour analyser le contenu plasmidique des transformants d'*E. coli*. Elle est dérivée de la méthode d'Eckhardt (1978) modifiée par Pühler *et al.* (1982).

- Préparation du gel d'agarose.

Il est préparé à 0,8 % p/v dans le tampon TBE pH 8,3. Après ébullition et refroidissement jusqu'à 60°C, le gel est coulé entre 2 plaques en verre dépoli séparées par des espaceurs de 3,0 mm d'épaisseur. On place par dessus, quand le gel est encore en surfusion, un peigne en téflon à 15 dents.

- Préparation de l'échantillon.

La culture bactérienne est faite dans du LB à 35°C jusqu'à une densité optique de 0,3 à 570 nm. A 500 µl de cette culture, on ajoute 1 volume de tampon T50 E20 pH 8,0 (Tris 50 mM, EDTA 20mM). Après homogénéisation, les bactéries sont centrifugées 5 mn à 6000 g, le surnageant est éliminé et le tube contenant le culot est placé dans la glace. Ce culot est repris par 45 µl de tampon de lyse constitué par du TBE contenant 25 % de saccharose, 12 % de Ficoll 400, 5 U/ml de RNase A et 1 mg/ml de lysozyme (les deux enzymes sont ajoutés au tampon juste avant emploi).

Après une brève homogénéisation, les cellules sont rapidement transférées dans une alvéole du gel. Une fois toutes les alvéoles remplies, les échantillons sont recouverts par 60 µl de TBE contenant 1 % de SDS, 0,05 % de bleu de bromophénol et 0,4 % d'agarose. Après solidification, les alvéoles sont totalement recouvertes par de l'agarose à 0,8 % en surfusion.

- Conditions de migration.

On transfère les plaques contenant le gel dans une cuve d'électrophorèse Biorad. La migration se fait en deux étapes: - 1H 15 à 30 volts pour faire migrer le SDS et lyser les bactéries.

- 2H 30 à 130 volts pour faire migrer le DNA.

Quand l'électrophorèse est terminée, le gel est coloré et décoloré comme pour les électrophorèses horizontales.

6.3 - Electroélution.

Cette méthode est réalisée par électrophorèse horizontale. Elle permet d'isoler des fragments de DNA de taille déterminée.

Dans les puits d'un gel d'agarose, on dépose environ 40 µl de solution de DNA digéré contenant 1/3 de volume de tampon d'arrêt. Le dépôt du premier puits étant constitué d'un témoin de DNA de phage lambda digéré par *EcoRI* et *HindIII*. Après migration du bleu de bromophénol d'environ 8 à 9 cm, le gel est découpé au niveau des puits 1 et 2 sur une longueur de 9 cm. Cette bande est colorée de façon à visualiser les distances de migration des fragments à récupérer. On découpe alors sur le gel d'électrophorèse une gouttière de 3 à 4 mm de large au niveau des puits restants (cette gouttière étant située en aval des fragments à récupérer).

Après remplissage de la gouttière par du tampon TBE, on remet la tension à 100 volts afin de faire migrer le DNA vers la gouttière. Toutes les 5 mn, la migration est stoppée, le tampon est prélevé et la gouttière est à nouveau remplie par du TBE. Cette opération est répétée pendant 4 à 6 heures de façon à ce que tous les fragments intéressants soient récupérés.

Le DNA en solution dans le TBE est précipité par 3/7 de volume de NaCl 1 M puis par 2 volumes d'éthanol 95° à -20°C. Après centrifugation et remise en solution, le DNA peut être utilisé par exemple pour des ligatures sur un plasmide par la T4-DNA-ligase.

7 - ELUTION DE FRAGMENTS DE DNA PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE.

Cette technique permet de récupérer des fragments de restriction partielle de DNA en plus grande quantité que par électroélution. Ainsi, la digestion par les endonucléases de restriction se fait sur des quantités de DNA comprises entre 250 et 500 µg.

Après la digestion enzymatique, le DNA est extrait 2 fois par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Ensuite, il est précipité à l'éthanol et séché avant d'être remis en solution dans 500 µl de tampon T20 E5 pH 8,0 (Tris 20 mM, EDTA 5 mM).

Le gradient de saccharose est un gradient discontinu de 10 à 40 % en saccharose. Ainsi, des solutions de saccharose à 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 % sont préparées dans un tampon T20 E5 S1000 pH 8,0 (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 1000 mM). Pour préparer le gradient, on superpose dans un tube d'ultracentrifugation les différentes solutions précédentes en déposant la solution de saccharose la plus concentrée au fond du tube. Ce gradient discontinu à 7 couches est ensuite placé une nuit à 4°C afin de le rendre linéaire.

Pour l'ultracentrifugation, on dépose à la surface du tube les 500 µl d'échantillon dissous dans le T20 E5. Ce tube est ensuite ultracentrifugé 30 heures à 25000 rpm à 20°C en rotor Beckman SW 25.1 (63500 g). Ensuite, on récupère le contenu du tube par fractions de 500 µl; une partie aliquote de chaque fraction étant vérifiée du point de vue

taille et concentration par électrophorèse en gel d'agarose.

Les fractions intéressantes sont rassemblées avant d'être, soit dialysées 12 heures contre du tampon T20 E5 puis précipitées, soit directement précipitées à l'éthanol si la concentration en saccharose est inférieure à 10 %. Ce DNA est ensuite remis en suspension dans le tampon approprié à son utilisation ultérieure.

8 - TRANSFORMATION DE *E. COLI*.

100 ml d'une culture d'*E. coli* incubée en milieu LB à 30°C jusqu'à densité optique à 570 nm de 0,6 sont placés 15 mn dans la glace. La culture est ensuite centrifugée 10 mn à 7000 g à 0°C puis le culot est remis doucement en suspension dans 50 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé. Cette suspension est laissée 30 mn dans la glace avant d'être centrifugée 5 mn à 7000 g à 0°C. Le culot est alors remis en suspension délicatement dans 5 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé, puis les bactéries sont transférées dans un tube 16/160 pour une incubation de 3 heures à 0°C.

Ensuite, dans un tube 16/160 à 0°C, on introduit 50 µl de la solution de DNA à transférer et 100 µl de la suspension cellulaire. Ce tube est incubé 30 mn à 0°C, puis est passé 2 mn au bain-marie à 42°C avant d'être remis 10 mn dans la glace. Les bactéries sont ensuite diluées au 1/10 par du milieu LB préchauffé à 37°C et incubées 2 heures à 37°C sans agitation. Enfin, elles sont diluées puis étalées sur les milieux sélectifs.

9 - UTILISATION DES ENZYMES.

9.1 - Enzymes de restriction.

Toutes les endonucléases de restriction sont utilisées conformément aux recommandations des fournisseurs.

9.2 - Phosphatase alcaline.

1 µg de DNA plasmidique est dissous dans 100 µl de T50 E0,1 pH 8,0. On ajoute 1 unité de phosphatase alcaline et on incube de 4 à 8 heures à 37°C. On inactive l'enzyme en ajoutant 10 µl d'EGTA 50 mM pH 8,0 puis en chauffant 10 mn à 65°C. Le DNA plasmidique déphosphorylé est alors déprotéinisé par 2 fois 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v) puis par 2 fois 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v). Ensuite, il est précipité par 3/7 de volume de NaCl 1M et par 2 volumes d'éthanol 95° à -20°C.

9.3 - Ligase.

La DNA-ligase du phage T4 est utilisée à température ambiante à raison d'1 unité par µg de DNA selon les indications de King et Blakesley (1986).

10 - HYBRIDATION DE DNA SELON SOUTHERN (1975).

Deux techniques ont été utilisées:

- hybridation par sonde froide.
- hybridation par sonde radiomarquée.

Pour les sondes froides, le marqueur est de la biotine-11-dATP (BRL); pour les sondes radiomarquées, le marqueur est l' α -³²P dCTP (Amersham).

Les kits de marquage des sondes froides ou radiomarquées ainsi que le kit de révélation des sondes froides proviennent de chez BRL.

Pour ces techniques, toutes les solutions sont réalisées à partir d'eau déminéralisée de haute qualité (Résistivité = 18 MΩ/cm Millipore).

10.1 - Transfert du DNA sur la membrane d'hybridation.

De la préparation du gel jusqu'au transfert du DNA sur la membrane d'hybridation, la technique est identique et se déroule comme suit:

- Préparation d'un gel d'agarose à 0,8 % (p/v) dans le TBE.
- Electrophorèse à 120 volts.
- Coloration du gel au bromure d'éthidium puis décoloration. Ensuite photographie.
- Traitement du gel 2 fois 15 mn sous agitation par une solution d'HCl 0,25 N pour dépuriner les fragments de DNA, puis bref rinçage à l'eau déminéralisée.
- Dénaturation par 2 traitements de 15 mn par NaOH 0,4 N / NaCl 0,6 N puis bref rinçage à l'eau.
- Neutralisation par 2 traitements de 30 mn par une solution de Tris 0,5 M / NaCl 1,5 M pH 7,4.
Rinçage à l'eau.

Entretemps, une membrane Gene Screen Plus (NEN Research Products. Dupont de Nemours) est découpée aux dimensions du gel puis est immergée 30 mn dans l'eau déminéralisée. Un deuxième rinçage est effectué 30 mn dans le tampon 20 SSC pH 7,0 (NaCl 3M, Citrate trisodique 0,3 M).

Pour le transfert du DNA, le montage suivant est réalisé:

- 2 feuilles de papier Whatman 3 MM dont les extrémités plongent dans 2 bacs remplis de tampon 20 SSC sont installées sur une plaque de verre horizontale.
- Sur ce montage, le gel est déposé puis est recouvert par la membrane d'hybridation.
- On recouvre la membrane par 5 feuilles de papier Whatman 3 MM découpés aux dimensions du gel.

- Ces 5 feuilles sont recouvertes par un empilement de feuilles de papier absorbant (sur environ 10 à 15 cm de hauteur). Cet empilement est surmonté d'une plaque de verre, elle-même surmontée d'un poids d'environ 500 g.

Le transfert se fera du gel vers la membrane par entraînement du DNA par le tampon 20 SSC qui monte par capillarité. Cette opération se fait en 20 heures environ. Le transfert terminé, la membrane est rincée délicatement à l'eau distillée et les éventuels débris d'agarose sont éliminés. Ensuite, on laisse sécher la membrane à température ambiante.

Entretiens, le gel a été recoloré pour vérifier la totalité du transfert.

10.2 - Hybridation par sonde biotinylée.

La membrane séchée après le transfert est mise en préhybridation à 65°C pendant 6 à 24 heures. Pour ceci, on prépare (pour une membrane de 55 cm² de surface) le tampon de préhybridation comme suit:

- 1 mg de DNA non homologue (DNA de sperme de saumon) est mis en suspension dans une solution contenant 250 µl de SDS 10 % (p/v), 20 µl d'EDTA 250 mM.
 - Eau qsp 3750 µl.
 - Mettre ce mélange 5 mn à 100°C, puis ramener à 75°C.
 - Ajouter 250 µl de 20 Denhardt (SAB 0,4 % p/v, Ficoll 400 0,4 % p/v, Polyvinylpyrrolidone 0,4 % p/v) et 1500 µl de 20 SSC.
 - Mettre le tube 30 secondes dans la glace.
 - Placer la membrane dans un sac d'hybridation (BRL), puis verser les 5,5 ml de tampon dans le sac.
- Souder.

Incuber de 6 à 24 heures à 65°C.

La sonde est préparée en 2 étapes pendant la préhybridation: le marquage et la purification de la sonde.

Pour le marquage, on introduit dans un tube Eppendorf placé dans la glace:

- 2 µg de DNA à marquer (20 µl).
- 5 µl de biotine-11-dATP 0,4 M (BRL).
- 10 µl du mélange dCTP, dGTP, dTTP (0,02 M de chaque).
- Eau qsp 90 µl. Mélanger brièvement.
- Ajouter 10 µl de la solution de DNA-polymérase I (0,4 unités/µl) et de DNase I (40 pg/µl).
- Incuber 90 mn à 15°C, puis ajouter 10 µl de solution d'arrêt (Na₂EDTA 300 mM pH 8,0) et 2,5 µl de SDS 5 % (p/v).

Pour la purification, on rajoute à la sonde 1/10 de volume de bleu dextran à 5 % dans le tampon SSC 1 SDS 0,1. Le mélange est passé sur une colonne de Sephadex G-50 et les fractions colorées en bleu sont récupérées. Ces fractions contiennent le DNA marqué séparé des nucléotides non incorporés.

Après la préhybridation de la membrane, on prépare le tampon d'hybridation. Pour une membrane de 55 cm², mettre dans un tube:

- 1 mg de DNA non homologue.
- la sonde à raison de 400 ng/ml dans le volume final du tampon d'hybridation.
- 250 µl de SDS 10 %.
- 20 µl d'EDTA 250 mM.
- Eau qsp 3750 µl.

Mettre le tube 5 mn à 100°C puis ramener la température à 75°C avant d'ajouter 250 µl de 20 Denhardt et 1500 µl de 20 SSC. Passer le tube dans la glace 30 secondes.

Dans le sac contenant la membrane, on remplace le tampon de préhybridation par le tampon d'hybridation puis le sac est incubé 24 heures à 65°C.

L'hybridation terminée, le DNA biotinylé est détecté sur la membrane. La première étape va consister en un blocage du filtre. Ainsi on lave la membrane dans le tampon 1 pH 7,5 (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 2 mM, Triton X-100 0,05 % (p/v)) pendant 15 mn à température ambiante. Ensuite, la membrane est incubée de 30 à 60 mn à 65°C dans le tampon 2 (tampon 1 contenant 3 % (p/v) de sérum-albumine bovine) avant d'être séchée 15 mn dans une étuve à 80°C.

La deuxième étape fait intervenir les systèmes de détection et de visualisation du DNA biotinylé. Ainsi, la membrane est réhydratée 10 mn dans le tampon 2. On élimine cette solution et on la remplace par une solution de streptavidine à 2 µg/ml à raison de 3 ml pour une membrane de 100 cm² de surface. Après 10 mn d'incubation, la solution est retirée et la membrane est lavée par 3 fois avec le tampon 1. Ensuite, la membrane est mise en contact pendant 10 mn avec une solution de biotine (AP) à 1 µg/ml (à raison de 3 ml pour une membrane de 100 cm²) avant d'être de nouveau rincée 3 fois par le tampon 1. Enfin, la membrane est lavée 2 fois par le tampon 3 pH 9,5 (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M).

Pour la visualisation, on prépare extemporanément la solution de coloration à raison de 7,5 ml pour une membrane de 100 cm². Cette solution de coloration contient 7,5 ml de tampon 3, 33 µl de nitro-bleu tétrazolium (à 75 mg/ml dans le diméthyl formamide à 70 %) et 25 µl de BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate à 50 mg/ml dans le diméthyl formamide).

Cette solution de coloration est mise en présence de la membrane dans un sac plastique scellé pour un développement d'une nuit. Après la coloration, la membrane est lavée dans le tampon T20 E5 pH 7,5 puis séchée 5 mn à l'étuve à 80°C, ce qui assure sa conservation.

10.3 - Hybridation par sonde radiomarquée.

La membrane est mise en préhybridation dans les mêmes conditions de tampons et d'incubation que dans le cas des hybridations à sonde froide. Pendant la préhybridation, la sonde est préparée en mettant en contact dans un tube Eppendorf:

- 1 µg de DNA à marquer.
- 5 µl de tampon T10 E0,1 S120 pH 7,5 (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 120 mM)
- 5 µl du mélange dATP, dGTP, dTTP (0,02 M de chaque).
- Eau déminéralisée qsp 45 µl.
- 5 µl de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP ($3,3 \cdot 10^{-8}$ M, $3 \cdot 10^8$ Ci/mole, Amersham).
- 5 µl de la solution de DNA-polymérase I (0,4 u/µl) et de DNase I (40 pg/µl).

Incuber 3 heures à 15°C, puis ajouter 5 µl de solution d'arrêt (Na₂EDTA 300 mM pH 8,0).

Pour la purification de la sonde et l'élimination des nucléotides non incorporés, on utilise des colonnes d-Elutip (Schleicher et Schüll).

Avant utilisation, la colonne est activée par passage de 5 ml de tampon "high salt" T20 E1 S1000 pH 7,4 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1000 mM) puis par 5 ml de tampon "low salt" T20 E1 S200 pH 7,4 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM).

Puis aux 55 µl de la sonde, on ajoute 400 µl de tampon "low salt" et l'ensemble est passé sur la colonne. Celle-ci est rincée par 10 ml de tampon "low salt" afin d'éliminer les nucléotides non incorporés. Ensuite, l'échantillon est décroché par 400 µl de tampon "high salt" que l'on récupère dans un tube Eppendorf.

On détermine l'activité de la sonde sur 1 µl du mélange. Ainsi, à 1 ml de DNA non homologue à 100 µg/ml, on ajoute 1 µl de la sonde et 1,1 ml d'ATCA 20 % (p/v). Après 1 heure d'incubation dans la glace, on filtre sur disque Whatman

GF/C en fibre de verre. Le filtre est ensuite rincé à l'ATCA 5 % (p/v), puis à l'éthanol et enfin à l'éther éthylique avant d'être séché 5 mn sous infra-rouge. Le filtre sec est placé dans un pot à scintillation Beckman dans lequel on ajoute 400 µl de KOH 0,01 M pour détacher le DNA du filtre. On laisse en contact 30 mn puis on ajoute 20 ml de liquide scintillant Beckman "Ready gel" (pseudocumène/xylène) avant de placer le pot dans un compteur à scintillation.

Après la préhybridation de la membrane, on prépare le tampon d'hybridation (pour une membrane de 55 cm²) comme suit. Dans un tube, mettre:

- 1 mg de DNA non homologue.
- la sonde marquée (environ 2×10^8 cpm).
- Rq: Ces 2 constituants ayant été préalablement dénaturés par chauffage 10 mn à 100°C, puis par mise dans la glace 10 mn.
- Eau qsp 3480 µl.
- 250 µl de SDS 10 %.
- 20 µl d'EDTA 250 mM.
- 250 µl de 20 Denhardt.
- 1500 µl de 20 SSC.

Ensuite, on vide le sac de préhybridation et on remplace le tampon par le tampon d'hybridation. Après les 36 heures d'hybridation à 65°C, la membrane subit plusieurs lavages:

- 2 lavages de 5 mn à température ambiante par le tampon 2 SSC 0,1 SDS (NaCl 0,3 M, Citrate trisodique 0,03 M, SDS 0,1 % p/v).
- 4 lavages de 15 mn à 65°C par le même tampon.
- 2 lavages de 30 mn à 48°C par le tampon 0,2 SSC 0,1 SDS (NaCl 0,03 M, Citrate trisodique 0,003 M, SDS 0,1 % p/v).
- 1 bref rinçage à l'eau.

Enfin, la membrane est séchée.

Pour la révélation, les membranes sont placées dans des cassettes d'autoradiographie en présence d'un film photographique et l'ensemble est placé au congélateur à -80°C pour éviter l'étalement de la réponse. Le contact est de 10 mn à plusieurs heures selon l'intensité de la réponse.

11 - PRESSE DE FRENCH.

La "French press" est un appareil qui soumet les cellules bactériennes à une pression de 14000 bars; ceci permet de les éclater et de récupérer un broyat cellulaire. Après centrifugation à 10000 g, on recueille d'une part le surnageant qui correspond au cytosol et aux organites et protéines qui s'y trouvent; d'autre part le culot que l'on remet en suspension dans un tampon Tris 20 mM pH 7,3 et qui rassemble les fractions membranaires. Les fractions sont ensuite stockées à -20°C pour limiter les éventuelles dégradations protéasiques des enzymes présentes.

Les souches de *Bacteroides* ou d'*E. coli* sont cultivées avant passage à la presse de French sur milieu minimum avec glucose, maltose ou dextran.

12 - DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE DE NELSON-SOMOGYI (1944).

Cette méthode très sensible est basée sur les propriétés réductrices des oses en milieu alcalin à chaud. On utilise comme oxydant un réactif cupro-alcalin qui forme un précipité d'oxyde cuivreux Cu_2O qui réduit un réactif arsénio-molybdique en donnant un complexe bleu intense.

Cette méthode de dosage utilise les réactifs suivants:

- | | |
|---|-------|
| - Réactif A: - Na_2SO_4 anhydre | 200 g |
| - Tartrate double Na,K | 25 g |
| - Na_2CO_3 anhydre | 25 g |

- NaHCO_3 20 g
- Eau distillée qsp 1 l.

- Réactif B: - CuSO_4 150 g
- H_2SO_4 concentré 2 gouttes
- Eau distillée qsp 1 l.

- Réactif arsénio-molybdique:
 - Molybdate d'ammonium 50 g
 - Arséniate de sodium 6 g
 - H_2SO_4 concentré 21 ml

Pour pouvoir établir une correspondance densité optique/taux de sucres réducteurs, il est nécessaire d'effectuer une gamme étalon (de 0 à 40 μg de sucres réducteurs par tube). Le sucre réducteur étant le glucose.

Le dosage s'effectue comme suit:

- Placer 2 ml de l'échantillon à doser dans un tube.
- Ajouter à ce tube 2 ml de réactif A+B (25/1, v/v)
- Fermer le tube hermétiquement.
- Mettre 20 mn au bain-marie bouillant.
- Refroidir 5 mn sans agiter dans un bain d'eau froide.
- Ajouter 2 ml de réactif arsénio-molybdique.
- Mélanger la solution par retournement.
- Ajouter 4 ml d'eau distillée et homogénéiser.
- Lecture de la densité optique à 700 nm.

13 - DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY (1951).

Cette méthode utilise les réactifs suivants:

- Tampon 1: - NaOH 8 g.
- Na_2CO_3 21 g.
- Eau distillée qsp 1 l.

- Tampon 2: - CuSO_4 1 g.
- Tartrate double de Na et K 2 g.
- Eau distillée qsp 1 l.

- Réactif de Folin Prolabo Normapur.

Pour le dosage, on effectue une gamme étalon de sérum-albumine sérique d'origine bovine de 0 à 200 μg de protéines par tube dans un volume de 0,5 ml (ce volume est respecté lors du dosage des échantillons). Ensuite, on ajoute 1 ml de tampon 2, on agite avant d'ajouter 4 ml de tampon 1. Après homogénéisation, on introduit dans le tube 1 ml de réactif de Folin préalablement dilué au tiers. Les tubes sont incubés 10 mn à l'obscurité avant de faire les mesures de densité optique au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm.

14 - DOSAGE DU CHROMOPHORE DU BLEU DEXTRAN.

La méthode de dosage utilisée est la méthode de Koh et Khouw (1970). Elle permet de doser la libération du chromophore (bleu cibacron F3G-A) de la molécule de bleu dextran (Sigma) lorsque cette molécule est soumise à l'action de dextranases.

Pour le dosage, on prend une culture bactérienne sur milieu minimum supplémenté en bleu dextran à 0,25 ou 0,5 % (p/v). On centrifuge la culture bactérienne à 4000 rpm pendant 10 mn. On prélève 1 ml du surnageant auquel on ajoute 2 ml d'éthanol à 95° glacé. Le tube est placé 30 mn à -20°C afin de précipiter les molécules de bleu dextran non dégradées. Ensuite, on centrifuge 10 mn à 15000 rpm à 4°C afin de sédimenter les molécules précipitées. Dans le culot, on trouve ainsi les molécules de bleu dextran non dégradées et dans le surnageant le chromophore libre provenant des molécules ayant été dégradées. On effectue ensuite sur le surnageant un spectre de longueur d'onde entre 550 et 700 nm afin de voir l'intensité de la coloration bleue dans le surnageant; on visualise ainsi la plus ou moins forte libération du colorant, donc la plus ou moins forte hydrolyse du dextran.

Les mesures de densité optique sont effectuées contre un témoin non inoculé traité dans les mêmes conditions.

15 - UTILISATION DE LA CHAÎNE HPLC.

Les dosages sont réalisés sur une chaîne HPLC Beckman fonctionnant en mode isocratique; l'éluant étant le milieu minimum de culture utilisé pour l'ensemencement des souches. La séparation des différents constituants se fait par gel-filtration au travers d'une colonne de sphérogel TSK 2000 SW 0,75 * 7,5 cm et la détection des sucres se fait par réfractométrie.

Le volume d'injection d'un échantillon est de 20 µl et le débit de tampon dans la colonne est de 0,5 ml/mn. Le pic correspondant au bleu dextran apparaît après 2,7 mn.

Avant injection, les échantillons sont passés sur unités de filtration Millipore de porosité 0,45 µm puis centrifugés 10 mn à 10000 rpm afin d'éliminer d'éventuelles bulles que le dextran pourrait renfermer et qui donneraient des pics parasites. La filtration est effectuée pour éliminer les cellules bactériennes et ne pas les injecter dans la colonne.

**RESULTATS
ET
DISCUSSIONS**

Ce travail avait pour but d'isoler des gènes de bactéries du genre *Bacteroides* afin d'en étudier l'expression chez *E. coli*. Les gènes que nous avons choisi d'isoler codent pour une activité enzymatique de dégradation de polysaccharides. En fait, il s'agit de l'activité dextranase produite par une souche de *Bacteroides* du côlon humain.

1 - SELECTION DE SOUCHES DEXTRANASIQUES DE *BACTEROIDES* ET DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

1.1 - Sélection de la souche.

La première étape de ce travail a consisté en la sélection d'une souche de *Bacteroides* capable d'utiliser le dextran comme seule source de carbone et d'énergie. 55 souches de la collection du laboratoire ont été testées en anaérobiose sur un milieu minimum supplémenté en dextran. Parmi ces 55 souches, 47 appartiennent à l'espèce *fragilis*, 5 à l'espèce *thetaitaomicron* et 3 à l'espèce *distasonis*. Toutes les souches ont donc été ensemencées en milieu minimum liquide de Caspari et Macy (1983) additionné soit de dextran T10 (MM 10000) à 1 % (p/v), soit de dextran T500 (MM 500000) à 1 % (p/v), soit de bleu dextran T2000 à 0,5 % (p/v) comme seule source de carbone afin de se rendre compte qu'elle était la souche se développant le plus facilement sur des dextrans de poids moléculaires différents.

Sur ces différents milieux de culture, 10 souches se sont développées. Il s'agit de toutes les souches de l'espèce *thetaitaomicron* (c'est-à-dire les souches 107, 146, 217, 489 et 519), de 3 souches sur 47 de l'espèce *fragilis* (191, 373 et 464) et de 2 souches sur 3 de l'espèce *distasonis* (419 et 462).

Ces 10 souches ont été ensuite mises en culture en anaérobiose sur milieu minimum gélosé contenant du bleu dextran T2000 à 0,5 % final (p/v) comme seule source de carbone afin de visualiser la dégradation du substrat par apparition de halos clairs autour des colonies. En effet, le bleu dextran est une molécule de dextran de haut poids moléculaire sur laquelle sont greffés des chromophores (bleu cibacron). L'hydrolyse de cette molécule en milieu gélosé sous l'action d'une dextranase entraîne la libération du chromophore bleu; au contact de la colonie, le milieu s'éclaircit et cette zone claire est elle-même entourée d'une auréole bleu foncé due à l'accumulation du colorant libéré (cf figure 7). Cette méthode est maintenant universellement reconnue comme test d'isolement d'organismes producteurs de dextranases car il a été montré qu'il existe une corrélation entre la taille du halo de décoloration et la taille de la zone de dégradation après précipitation du dextran non dégradé à l'éthanol (Staat *et al.*, 1973).

Pour les 10 souches, les tailles des halos ont été relevées après 90, 190 et 310 heures pour des tailles standards de colonies respectivement de 2, 3 et 5 mm. Les résultats sont reportés dans la figure 8. On peut remarquer que ce sont les souches des espèces *fragilis* et *thetaitaomicron* qui donnent les meilleurs résultats et tout particulièrement la souche de *B. thetaitaomicron* 489 qui produit un halo de dégradation de 64 mm de diamètre après 310 heures de culture.

C'est donc la souche *Bacteroides thetaitaomicron* 489 qui a été choisie pour la suite des travaux.



Figure 7: Zone de dégradation du bleu dextran T2000 par la souche 489 sur milieu de Caspari et Macy.

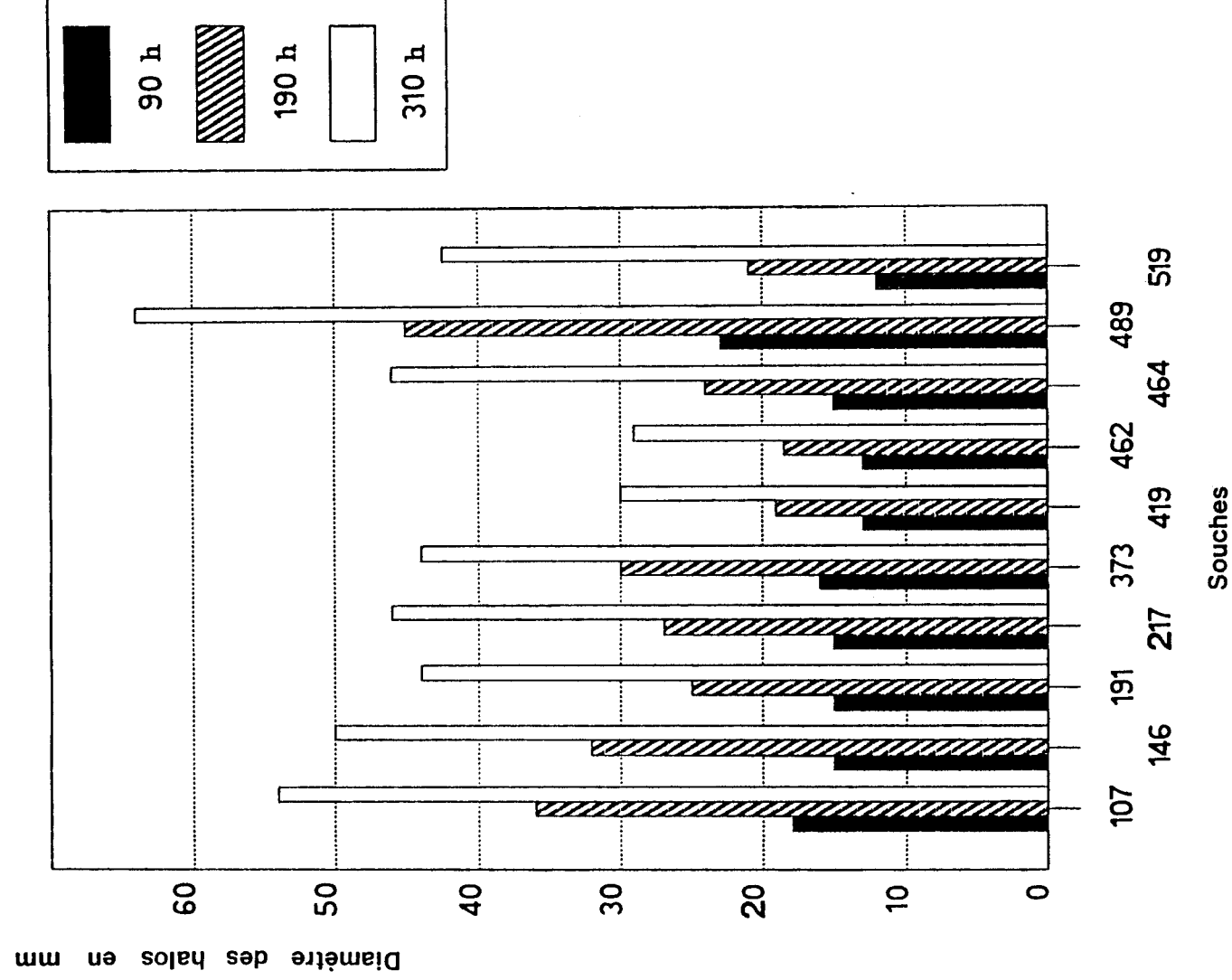


Figure 8: Tailles des halos de dégradation de différentes souches de *Bacteroides* à des temps de culture de 90, 190 et 310 heures.

1.2 - Dosage de l'activité dextranasique.

Cette souche a ensuite été testée du point de vue du relargage du chromophore en milieu liquide. En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'on peut évaluer spectrophotométriquement le relargage du chromophore en milieu liquide et que cette libération est en corrélation avec la diminution de viscosité du dextran intervenant sous l'action de dextranases (Koh et Khouw, 1970; Mäkinen et Paunio, 1971; Mencier, 1972; Holbrook et McMillan, 1977). Ce test est donc spécifique des dextranases.

Pour ce faire, la souche 489 a été cultivée sur milieu minimum de Caspari et Macy additionné de bleu dextran à 0,5 % final (p/v). A des temps de culture de 8, 16, 24, 32, 40 et 48 heures, 1 ml de culture a été prélevé, centrifugé puis filtré afin d'éliminer les cellules bactériennes avant d'être traité suivant la technique de Koh et Khouw (1970); 0,1 ml de ce surnageant de culture a été également déposé sur agar bleu dextran afin de visualiser si l'on peut détecter une activité dextranasique extracellulaire.

Les spectres de longueur d'onde entre 550 et 700 nm sont représentés en figure 9. Aucune augmentation de la densité optique n'est observée à un temps de culture de 8 heures; on peut donc penser que la dégradation du substrat n'est pas encore commencée ou n'atteint pas la limite de détection du dosage. Cependant, il est assez improbable que la dégradation ne soit pas encore commencée après 8 heures de culture car il a été montré dans de nombreux cas de dégradation de polysaccharides que les systèmes enzymatiques responsables étaient induits dans des temps de contact avec le substrat très courts (30 mn dans le cas de la dégradation de la chondroïtine sulfate) (Salyers et Kotarski, 1980b). Comme la densité optique de la culture était très faible et donc que la population bactérienne se

trouvait en nombre réduit, on peut affirmer que le taux de dégradation était trop faible et que l'éventuel relargage du chromophore n'a pas été repéré entre 550 et 700 nm.

Par contre, pour les autres prélèvements, on a une libération croissante du chromophore du bleu dextran. Un échantillon de milieu de culture de la souche 489 en phase stationnaire a été passé en HPLC et le pic correspondant au bleu dextran avait disparu donc la dégradation était totale.

Les 0,1 ml de surnageant de culture déposés sur agar bleu dextran et incubés à 37°C n'ont pas donné de halos de dégradation quel que soit le temps de culture; donc, la souche 489 ne semble pas produire d'activité dextranase extracellulaire.

Il était alors intéressant de savoir pour le clonage si la souche possède une ou plusieurs activités responsables de l'hydrolyse du dextran. Pour pouvoir quantifier l'activité enzymatique, des dosages de sucres réducteurs selon Nelson-Somogyi ont été effectués. Ces dosages ont tout d'abord été réalisés sur les surnageants de culture de la souche 489 cultivée sur milieu de Caspari et Macy contenant du dextran T10 et T500 à 1 % (p/v) final mais aucune activité extracellulaire n'a été mise en évidence; ce qui confirme les résultats précédents.

L'activité étant associée aux cellules, des cultures sur glucose (0,2 %), maltose (0,2 %) et dextran (1 %) ont été broyées à la presse de French. Les dosages de sucres réducteurs ont été effectués sur les 2 fractions: membranaire et cyto-périplasmique. Parallèlement à ces dosages ont été faits des dosages de protéines selon Folin. Ceci nous a permis de définir les activités spécifiques apparentes (en protéines totales) pour chaque fraction. Les résultats obtenus sont de 1,1 μ mole de sucres réducteurs libérés / mn / mg de protéines totales

pour la fraction cyto-périplasmique et de 0,15 pour la fraction membranaire des cellules cultivées sur dextran. Lorsqu'il s'agit des fractions provenant des autres cultures, aucune activité n'a été décelée dans les différentes fractions; donc, on peut penser que l'activité est inductible par le substrat comme c'est le cas pour beaucoup d'activités hydrolytiques chez *Bacteroides*.

On voit qu'environ 90 % de l'activité dextranasique provient du cytoplasme ou de l'espace périplasmique et 10 % des membranes cellulaires. On pourrait donc penser que les 10 % membranaires correspondraient à une contamination de cette fraction par la fraction cyto-périplasmique. Mais la détermination des valeurs de pH optimum d'activité montre le contraire. En effet, ces valeurs sont de 6,0 pour la fraction membranaire et de 7,2 pour l'autre fraction; ceci quel que soit le tampon d'incubation (Tris ou citrate) (cf figure 10). De plus, les quantités de protéines totales dans les 2 fractions sont différentes; on a environ 250 fois plus de protéines dans la fraction membranaire donc le rapport 90 / 10 est surement modifié dans le cas de protéines purifiées.

Donc, la souche 489 posséderait au moins 2 dextranases dont une membranaire, et une cytoplasmique ou périplasmique; cette localisation semble normale pour dégrader un polymère comme le dextran qui ne peut pénétrer tel quel dans la cellule. De plus, ce type de localisation a déjà été décrit pour les dextranases de *Bacteroides oralis* (Takahashi *et al.*, 1985) ou pour les enzymes de dégradation d'autres polysaccharides comme la chondroïtine sulfate ou les galactomannanes.

Une étude biochimique plus poussée des paramètres des enzymes ne concerne pas réellement ce travail. En effet, il s'agissait non pas de connaître parfaitement ceux-ci mais plutôt d'obtenir certaines connaissances permettant de mieux appréhender la suite.

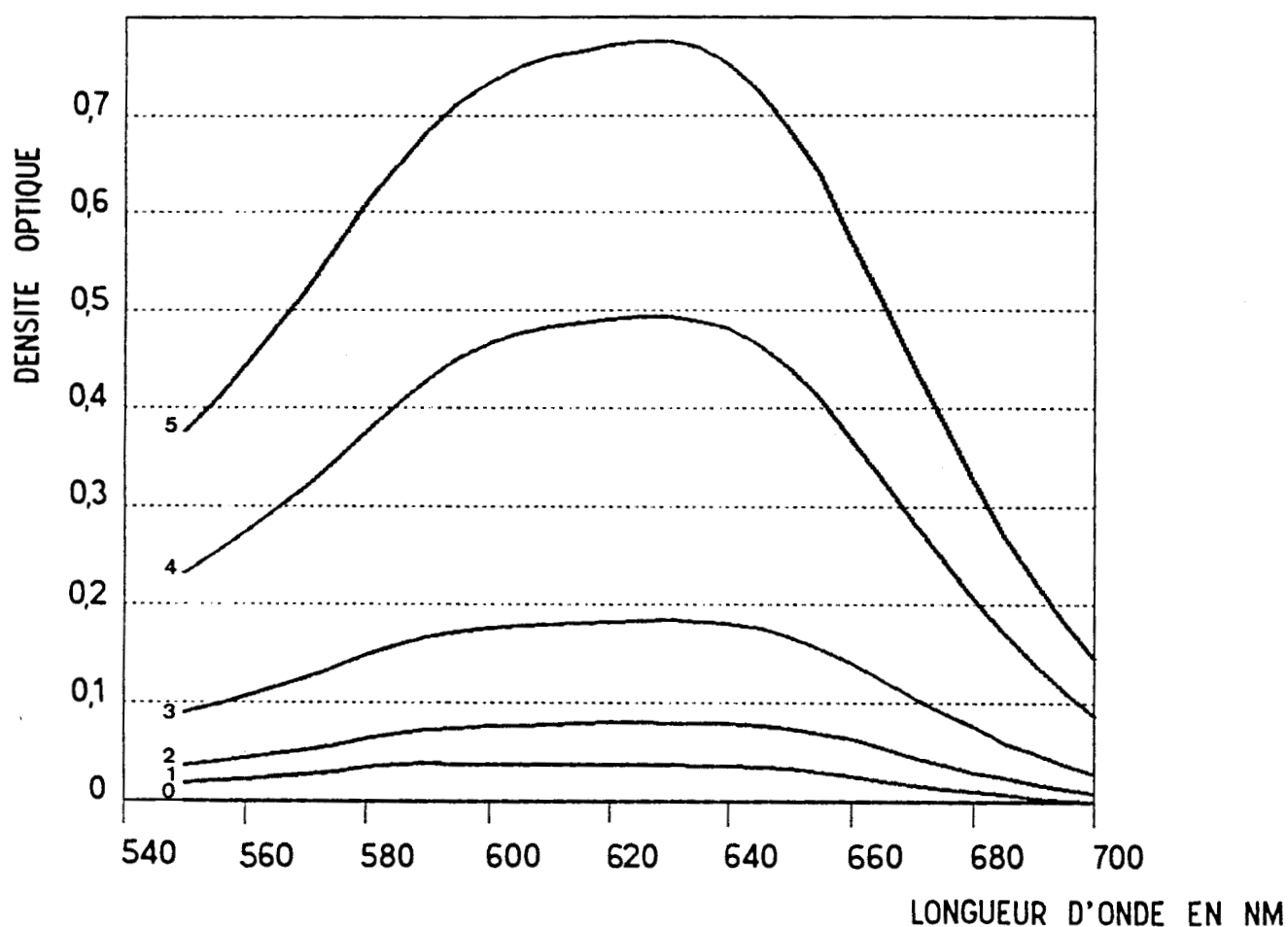


Figure 9: Spectre de libération du chromophore du bleu dextran T2000 dans le surnageant de culture de la souche 489 cultivée sur milieu de Caspari et Macy à des temps de culture de 8 heures (courbe 0), 16 h (1), 24 h (2), 32 h (3), 40 h (4) et 48 h (5). Le surnageant est traité selon la technique de Koh et Khouw (1970).

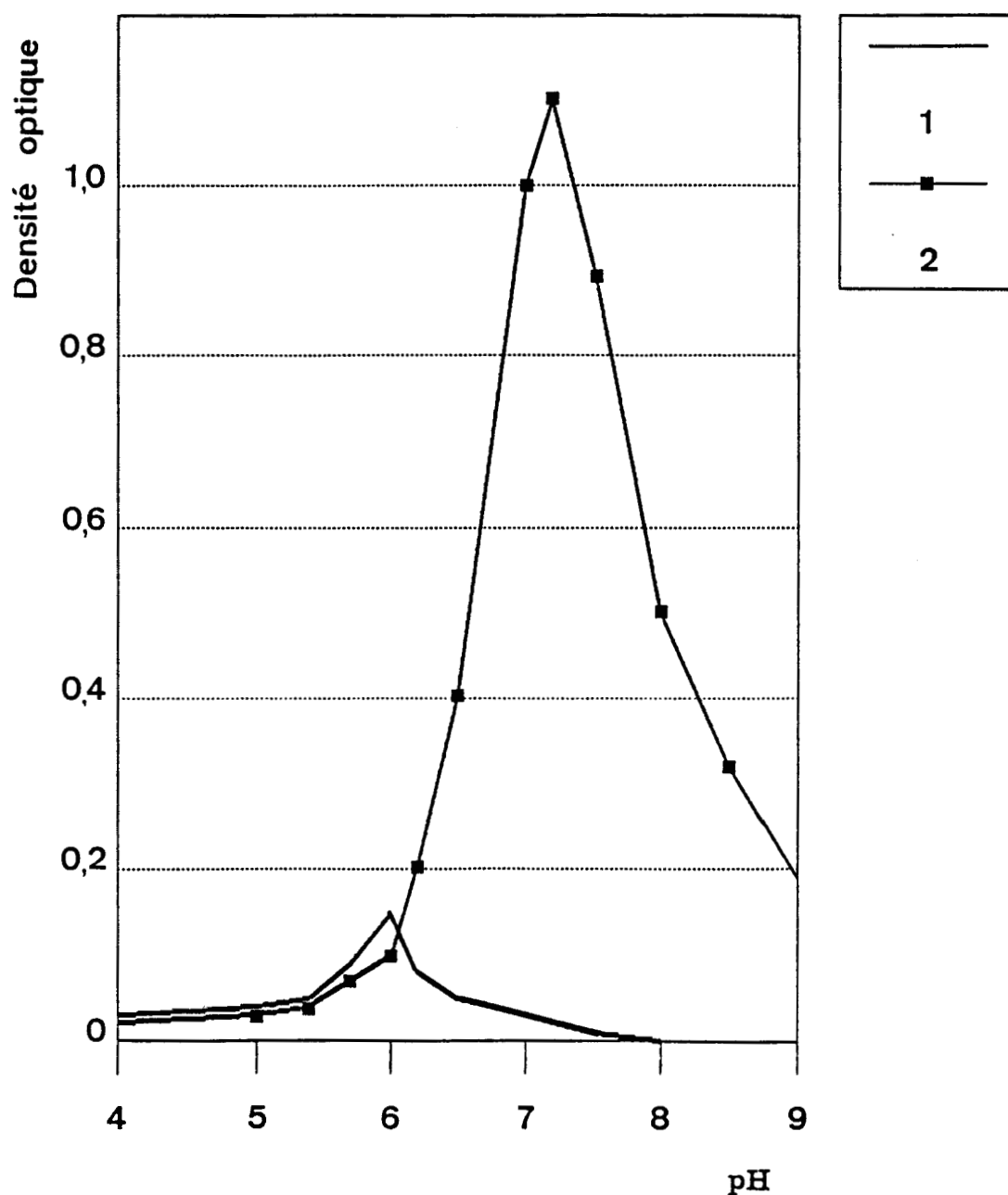


Figure 10: Courbes d'activité dextranasique en fonction du pH pour les fractions membranaires (courbe 1) et cyto-périplasmiques (courbe 2) de la souche 489.

2 - FABRICATION D'UNE BANQUE DE GENES DE BACTEROIDES ET TRANSFORMATION CHEZ E. COLI.

La souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* 489 étant choisie, il fallait maintenant fabriquer une banque génomique du DNA de cette souche chez *E. coli*. Plusieurs essais ont été entrepris à l'aide de plasmides et de souches réceptrices différents.

2.1 - Plasmide vecteur: le pEAP37.

Le premier plasmide utilisé est le pEAP37 qui porte des gènes de résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline. Ce plasmide est dit spécialisé car c'est un vecteur d'excrétion; donc, toute protéine qui serait normalement localisée dans l'espace périplasmique sera excrétée dans le milieu extracellulaire. Ce processus d'excrétion est possible car le plasmide est porteur du gène *kil* responsable de l'excrétion de la colicine E1 ainsi que de son promoteur *Pex*. Le pEAP37 possède pour sites de clonage des sites uniques *EcoRI* et *HindIII* situés dans le gène de résistance au chloramphénicol ainsi que 2 sites *HincII*.

Dans un premier temps, nous avons décidé d'utiliser un des sites *HincII*. Mais, comme le plasmide en comporte deux, il a été possible de réduire sa taille et de ne garder après digestion totale par l'endonucléase de restriction *HincII* puis électroélution que le plus grand fragment de 3700 paires de bases (pb). Ainsi, la taille a été réduite de 5800 à 3700 pb mais le plasmide porte encore le gène de résistance au chloramphénicol pour la sélection des recombinants ainsi que le gène *kil* et son promoteur nécessaires à l'excrétion. Ce plasmide de 3700 pb possède un site unique *HincII*.

Le DNA chromosomique de la souche 489 a été extrait par une méthode dérivant de celle décrite par Dhaese *et al* (1979) avant d'être digéré partiellement par l'enzyme *HincII* une heure à raison de 0,5 unités d'enzyme par µg de DNA. Ensuite, l'échantillon a été passé en électrophorèse en gel d'agarose et les fragments de DNA dont les tailles sont comprises entre 3500 et 9000 pb ont été électroélués. Ces tailles ont été choisies afin d'être sûr de sélectionner d'une part des fragments qui ne sont pas trop petits et qui sont donc susceptibles de contenir au moins un gène; d'autre part, afin d'éliminer les fragments de taille trop importantes et donc difficiles voire impossibles à faire entrer par transformation dans la bactérie réceptrice.

Nous avons ensuite effectué une ligature entre le plasmide de 3700 pb (provenant du pEAP37) linéarisé par *HincII* et les fragments de digestion partielle de DNA chromosomique suivant le rapport 1/3.

La souche bactérienne choisie pour recevoir les plasmides hybrides est un révertant prototrophe de la souche *E. coli* LE392 appelé LE392P.

Trois transformations de la souche d'*E. coli* LE392P par le mélange de ligature ont été réalisées. Nous avons obtenu successivement 50, 90 et 100 colonies sur milieu riche LB additionné de streptomycine (Sm) à 50 µg/ml final (nécessaire à la sélection de la souche bactérienne) et de chloramphénicol (Cm) à 25 µg/ml (nécessaire à la sélection des clones ayant reçu un plasmide hybride ou non).

Ces différents clones ont été repiqué sur milieu synthétique minimum gélosé ML additionné de 1 % (p/v) de dextran T10 (ou de bleu dextran T2000 à 0,5 %) et de 2 µg/ml de vitamine B1 sous atmosphères aérobie et anaérobie afin de sélectionner les clones capables de se développer avec le dextran pour seule source de carbone. Des 240

clones testés, aucun n' a été capable de se développer sur dextran.

Cependant, d'une part, le nombre de clones recombinants n'a pas été suffisant pour obtenir une représentation correcte du génome de la bactérie de départ; et d'autre part, l'analyse du contenu plasmidique des transformants par lyse directe en gel d'agarose a montré que peu de clones possédaient le plasmide portant un insert de DNA chromosomique. Ceci car il est relativement difficile de ligaturer les fragments de DNA à extrémités franches générés par *HincII*.

Aux vues des difficultés obtenues avec les ligatures de bouts francs, nous avons décidé de garder le même plasmide pEAP37 mais en changeant le site de clonage. Cette fois, c'est le site *EcoRI* situé dans la résistance au chloramphénicol qui est choisi. Evidemment, dans ce cas, c'est le plasmide pEAP37 entier qui est utilisé (et non son dérivé de 3700 pb) afin de pouvoir sélectionner les clones recombinants par la résistance à l'ampicilline dont le gène avait été éliminé précédemment.

Le DNA chromosomique de la souche 489 a donc été digéré partiellement par l'endonucléase de restriction *EcoRI* et les fragments de taille intéressante ont été récupérés par électroélution. Parallèlement, le pEAP37 a été linéarisé par le même enzyme puis déphosphorylé aux extrémités 5'.

La ligature entre ces 2 partenaires a été faite avec un rapport de 1 pour le plasmide et de 10 pour le DNA à cloner comme il est habituellement recommandé lors de ligatures avec bouts cohésifs. Deux transformations de la souche LE392P ont été effectuées. Après sélection sur milieu riche LB additionné de Sm et d'ampicilline (Ap) à une concentration finale de 50 µg/ml, nous avons obtenu 637 et 800 colonies. Ces colonies ont, comme les colonies

précédentes, été repiquées sur milieu minimum ML + dextran mais aucune colonie ayant une activité dextranase n'a plus été mise en évidence. Néanmoins, le nombre de clones obtenus n'est pas suffisant à une représentation totale du génome. Par contre, nous voyons que l'on obtient plus de clones lorsque les fragments de DNA à ligaturer ont des extrémités cohésives.

L'analyse du contenu plasmidique d'une partie des recombinants a montré que la majeure partie des clones possède des plasmides de tailles différentes; donc, la ligature n'est pas en cause. En fait, vu que le pEAP37 est un plasmide spécialisé, il est sûrement plus adapté à un sous-clonage qu'à un clonage direct. C'est pourquoi nous avons décidé de changer de vecteur et d'utiliser le pKC7.

2.2 Plasmide vecteur: le pKC7.

Le pKC7 est un plasmide de 5890 pb qui confère les résistances à l'ampicilline (Ap) et à la kanamycine (Km). Pour son utilisation dans le clonage, il est digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI puis déphosphorylé en 5'.

De son côté, le DNA chromosomique de la souche 489 est digéré de manière partielle par l'enzyme *Sau*3AI qui reconnaît et coupe une séquence de DNA de 4 bases compatible avec celle coupée par *Bam*HI. Après digestion enzymatique, les fragments de taille intéressante sont récupérés par électroélution.

La ligature se fait dans les mêmes conditions que précédemment; c'est-à-dire avec un rapport DNA plasmidique/ DNA chromosomique de 1/10. Trois transformations de la souche LE392P ont été effectuées. Elles ont permis d'obtenir respectivement 750, 600 et 800 colonies sur milieu riche LB additionné des antibiotiques suivants: Sm (50 µg/ml), Ap (50 µg/ml) et Km (75 µg/ml). Les repiquages sur milieu minimum ML + dextran n'ont pas

permis l'isolement d'un clone produisant l'enzyme recherché que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose.

Comme les résultats n'étaient guère concluants avec ces 2 plasmides, nous avons décidé de revenir à un vecteur couramment employé dans les publications concernant le clonage. Il s'agit du vecteur plasmidique pBR322.

2.3 Plasmide vecteur: le pBR322.

Le pBR322 est un plasmide universellement connu qui a une taille de 4361 pb et qui porte les gènes codant pour les résistances à l'ampicilline et à la tétracycline (Tc). Le site choisi pour le clonage est le site de coupure par l'enzyme de restriction *Bam*HI. Ce site se trouve dans le gène de résistance à la tétracycline et une insertion de fragments de DNA étranger provoque l'inactivation de ce gène; ce qui permet de faire une sélection négative et de voir quels sont les clones qui n'ont reçu que le plasmide. Ceci constitue un avantage par rapport au plasmide pKC7.

Cette fois, afin d'obtenir de grandes quantités de fragments de taille déterminée de digestion partielle de DNA chromosomique, nous avons effectué une technique d'ultracentrifugation en gradient de saccharose. En effet, dans le saccharose et sous l'action de la force centrifuge, les fragments de digestion partielle générés par l'enzyme *Sau*3AI vont se placer dans le gradient selon leur taille: les plus légers vers la surface du tube et les plus lourds vers le fond. Après l'ultracentrifugation, les fragments sont récupérés et sont tout de suite utilisables après dialyse.

Le plasmide vecteur pBR322 a été linéarisé par l'enzyme de restriction *Bam*HI puis déphosphorylé. Une première transformation de la souche d'*E. coli* LE392P a été effectuée en prenant un mélange de ligature ayant pour rapport plasmide / DNA chromosomique un rapport de 1/10.

Cette transformation a donné sur milieu riche LB additionné des antibiotiques Sm (50 µg/ml) et Ap (75 µg/ml), 360 colonies. Celles-ci ont été repiquées sur le même milieu contenant en supplément de la tétracycline (10 µg/ml) et 90 % des colonies étaient capables de s'y développer. Donc, seules 10 % des colonies ont été transformées par le pBR322 contenant un fragment de DNA étranger. Un problème a dû se poser au cours de la ligature. Malgré tout, les quelques colonies susceptibles d'être intéressantes ont été testées sur milieu minimum ML + dextran en aérobiose et en anaérobiose sans résultats.

Une deuxième transformation de la souche d'*E. coli* LE392P a été faite. La composition du mélange de ligature est modifiée et le rapport vecteur / DNA chromosomique est de 1/8. Le nombre de colonies obtenues est de 600 mais seulement 30 % d'entre elles sont résistantes à la tétracycline après repiquage sur les milieux riches LB décrits précédemment; donc, ces conditions de ligature conviennent mieux à nos manipulations.

Aucune colonie possédant une activité dextranasique n'a été mise en évidence sur milieu minimum + dextran.

En fait, quel que soit le plasmide utilisé jusqu'à présent, nous voyons que le nombre de transformants est faible. Donc, dans chaque cas, nous n'avons pu obtenir une représentation du génome de la souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* 489 car le clonage au moyen d'un plasmide nécessite pour avoir un recouvrement du chromosome par digestion partielle l'analyse d'environ 10000 clones transformants.

Les transformations successives avec différents plasmides donnent un nombre de transformants à peu près similaire. Donc, on peut penser que c'est la souche bactérienne réceptrice qui est responsable. Nous avons donc décidé de changer de souche afin de trouver une

meilleure réceptrice et c'est la souche d'*E. coli* HB101 qui a été choisie pour les transformations suivantes.

C'est le plasmide pBR322 qui a été conservé pour la transformation de la souche HB101. Comme précédemment, celui-ci a été linéarisé par coupure par l'enzyme *Bam*HI puis déphosphorylé. Pour la préparation des fragments de digestion partielle par *Sau*3AI, nous sommes revenus à une technique moins lourde que l'ultracentrifugation en gradient de saccharose, c'est-à-dire l'électroélution. Les fragments récupérés ont des tailles comprises entre 3500 et 9000 pb. Pour la ligature, nous avons conclu des résultats précédents que lorsque l'on met en présence des fragments de DNA à extrémités cohésives, il est plus intéressant d'abaisser le taux de DNA chromosomique par rapport au taux de plasmide.

Ainsi, le mélange de ligature utilisé pour la transformation de la souche HB101 fut effectué avec un rapport plasmide / DNA chromosomique de 1/5.

Les cellules bactériennes issues de cette transformation ont été étalées sur milieu riche LB additionné de Sm (50 µg/ml) et d'Ap (100 µg/ml). Après une journée d'incubation à 37°C, nous avons dénombré 16240 colonies recombinantes; donc, possédant le plasmide pBR322. La fréquence de transformation a été de 10^{-7} . Une contre-sélection des recombinants a été faite par double repiquage sur le même milieu et sur le milieu LB Sm (50 µg/ml) Ap (100 µg/ml) Tc (20 µg/ml). Ainsi ont été isolés 14930 clones résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline donc possédant le pBR322 avec un insert étranger inactivant le gène de résistance à la tétracycline. On voit que les nouvelles conditions de ligature sont bonnes car 92 % des plasmides introduits dans la souche HB101 portent un insert; de plus, vu le nombre de colonies, la souche HB101 semble être une meilleure souche réceptrice de la transformation que la

souche LE392P. Enfin, on pouvait espérer isoler au moins un clone ayant une activité dextranasique car les inserts présents dans les 14930 clones doivent représenter la totalité du génome de la souche de départ.

3 - CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS.

3.1 - Sélection des clones positifs.

Le milieu riche utilisé ici a été employé par Staat *et al.* (1973) pour isoler des populations de micro-organismes dextranasiques de la plaque dentaire. Tous les clones résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline ont donc été repiqués sur milieu riche TSA contenant du bleu dextran T2000 et du dextran T10 aux concentrations finales de 0,5 % (p/v) chacun. Ces repiquages ont été effectués colonie par colonie, à raison de 52 par boîte de Pétri, en double exemplaire pour incubation en aérobiose et en anaérobiose.

Les numéros qui ont été attribués aux différents clones dont nous parlons ensuite correspondent pour le premier nombre au numéro de la boîte de Pétri repiquée et pour le second nombre à la position du clone sur cette même boîte.

Après des incubations de 7 jours à 37°C, aucune des colonies repiquées n'a donné de zones de dégradation dans sa proximité. Par contre, après une durée de 15 à 20 jours, des halos faibles en intensité et en taille se sont développés autour de 43 colonies; ceci aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose (cf figure 11).

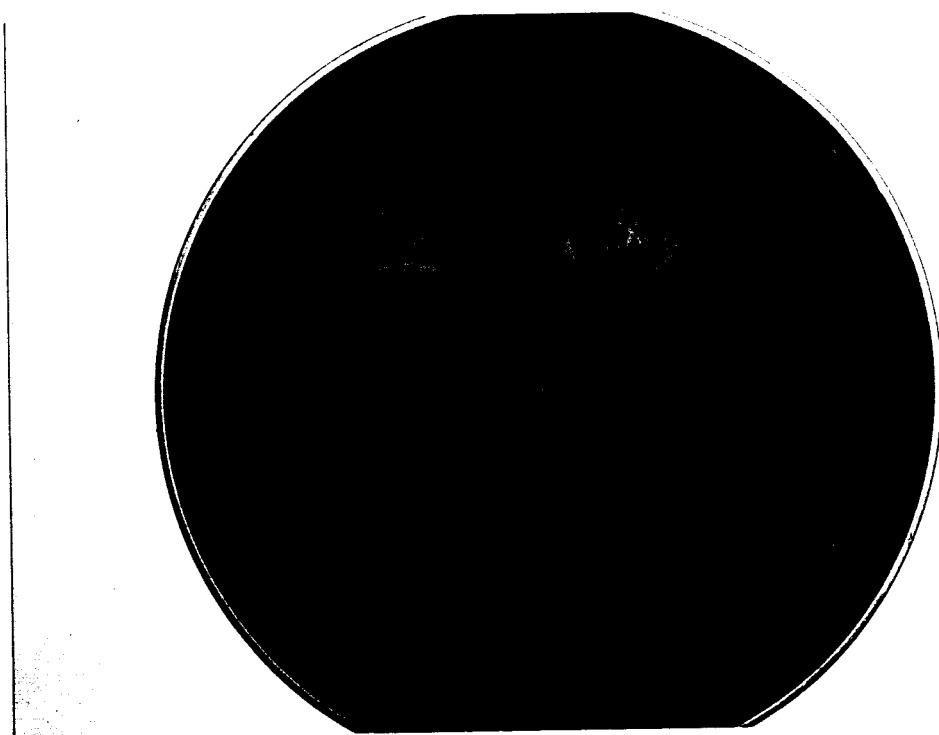


Figure 11: Zones de dégradation du bleu dextran pour le clone 291/7.

Par lyse directe en gel d'agarose, nous avons vérifié que ces 43 clones possédaient bien un plasmide. Pour chaque culture bactérienne, la présence d'un plasmide a été mise en évidence. Tous ces plasmides étaient différents en taille: celle-ci s'échelonnait entre 7000 et 16000 pb approximativement.

Après plusieurs repiquages sur le même milieu, 10 clones se sont révélés stables et capables de produire des halos de dégradation reproductibles. Ces 10 clones portent les numéros suivants: 40/16, 122/46, 146/22, 148/42, 175/23, 177/52, 184/44, 277/31, 291/7 et 300/25.

3.2 - Vérification des souches.

Pour ces 10 clones stables, nous avons voulu vérifier qu'il s'agissait bien de la souche d'*E. coli* HB101 que l'on avait transformée. Pour cela, des extractions de DNA total des clones et de la souche témoin HB101 transformée avec le plasmide pBR322 seul ont été effectuées. Ensuite, des digestions totales par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Pst*I ont permis de comparer par électrophorèse en gel d'agarose les profils de restriction des clones et de la souche témoin. Sur la figure 12, les profils de digestion de DNA total de 3 clones (40/16, 122/46 et 146/22) sont comparés à celui de la souche témoin HB101(pBR322) digéré par les mêmes enzymes. Nous pouvons constater que les différents profils sont identiques à 1 ou 2 bandes près; celles-ci correspondant aux plasmides recombinants des souches testées. Les différents clones produisant des halos sur bleu dextran sont donc bien des *E. coli* HB101.

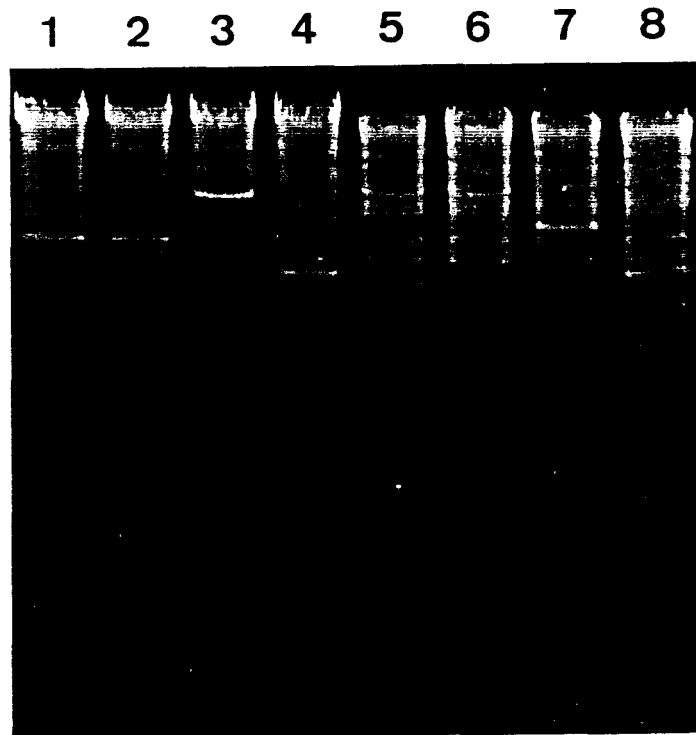


Figure 12: Profils de restriction par *Pst*I et *Hind*III de DNA total des clones *E. coli* 40/16, 122/46, 146/22 et de la souche témoin HB101(pBR322).

1: 40/16 *Hind*III; 2: 122/46 *Hind*III; 3: 146/22 *Hind*III;
 4: Témoin HB101(pBR322) *Hind*III; 5: 40/16 *Pst*I; 6: 122/46 *Pst*I;
 7: 146/22 *Pst*I; 8: Témoin HB101(pBR322) *Pst*I.

3.3 - Tests d'activité dextranasique.

Les clones ont été sélectionnés sur milieu riche TSA contenant du bleu dextran. Pour voir s'ils étaient capables de se développer avec le dextran comme seule source de carbone, ils ont été ensemencés sur milieu minimum liquide ML + dextran + les acides aminés dont la souche a besoin (leucine 20 µg/ml, proline 20 µg/ml) et repiqués sur le même milieu gélosé. Les 10 clones, tout comme le témoin HB101, ont été incapables de s'y développer; donc, ils sont capables de dégrader le dextran mais non de l'utiliser. Il faut remarquer que c'était la première fois que nous sélectionnions sur milieu riche et des clones ont été isolés. Donc, pour les transformations précédentes, il se peut que nous soyons passés à côté d'autres clones capables d'hydrolyser le dextran et non de l'utiliser quoique le nombre de recombinants était faible.

Par contre, si le milieu ML gélosé est complété par une très faible quantité de glycérol (0,05 %), nous avons croissance des souches et apparition de halos de dégradation comme dans le cas de culture sur milieu riche TSA. Le glycérol a été choisi, de préférence au glucose ou à un autre sucre, afin d'être sûr qu'il n'y ait pas d'interférences avec l'action de l'enzyme.

Des dosages de libération de sucres réducteurs selon Nelson-Somogyi ont été effectués sur les surnageants de culture de clones cultivés sur milieu ML + dextran T10 (0,5 %) + glycérol (0,05 %) ainsi que sur les fractions cellulaires après passage en presse de French. Aucune activité enzymatique n'a pu être détectée par cette méthode; ce qui n'est pas réellement étonnant car les halos se produisent tardivement sur les boîtes de Pétri et les quantités d'enzymes ne doivent pas être importantes.

Plutôt que de mettre en évidence l'apparition de sucres réducteurs susceptibles d'être métabolisés par la

souche, nous avons essayé de visualiser une dégradation du polymère de dextran. Ceci par 2 méthodes: la libération du chromophore du bleu dextran par la méthode de Koh et Khouw (1970) d'une part, et la diminution de taille du même polymère par HPLC d'autre part.

Nous avons donc utilisé des surnageants de cultures de 15-20 jours des clones sur milieu liquide ML + bleu dextran T2000 + glycérol pour ces tests afin de se placer dans les mêmes conditions qu'en milieu gélosé. Les résultats obtenus ont été dans tous les cas comparés à ceux du témoin HB101 traité dans les mêmes conditions. Pour le test de Kow et Khouw, les spectres de densité optique des surnageants de culture des clones ont montré une augmentation d'absorption d'environ 0,10 à 0,15 unités entre 550 et 630 nm (qui est le maximum d'absorption) avec un spectre 550-700 nm identique en forme à celui obtenu avec *Bacteroides* (pour lequel l'augmentation de densité optique entre 550 et 630 nm était d'environ 0,4 à 0,5 unités après 48 heures). Donc, par cette méthode, il est possible de visualiser une certaine dégradation du polymère car on a libération du chromophore.

Ces mêmes surnageants de culture ont été injectés en HPLC. Dans ce cas, nous voulions voir si le bleu dextran donnait naissance à des molécules plus petites du fait de sa dégradation. L'échantillon témoin HB101 donne un pic serré et symétrique qui sort en exclusion de la colonne 2,62 mn après l'injection et qui correspond à la molécule de bleu dextran T2000 non dégradée. Pour les clones, nous obtenons des pics moins hauts et surtout plus étalés (cf figure 13). Ainsi, le chromatogramme du clone 40/16 de la figure 13 montre un pic étalé sur 1,4 mn alors que le pic témoin l'est sur 1,1 mn (certains clones ont donné des pics étalés sur 1,6 mn). Vu que le pic témoin sort en exclusion, un étalement du pic représente des molécules de taille sensiblement plus faibles.

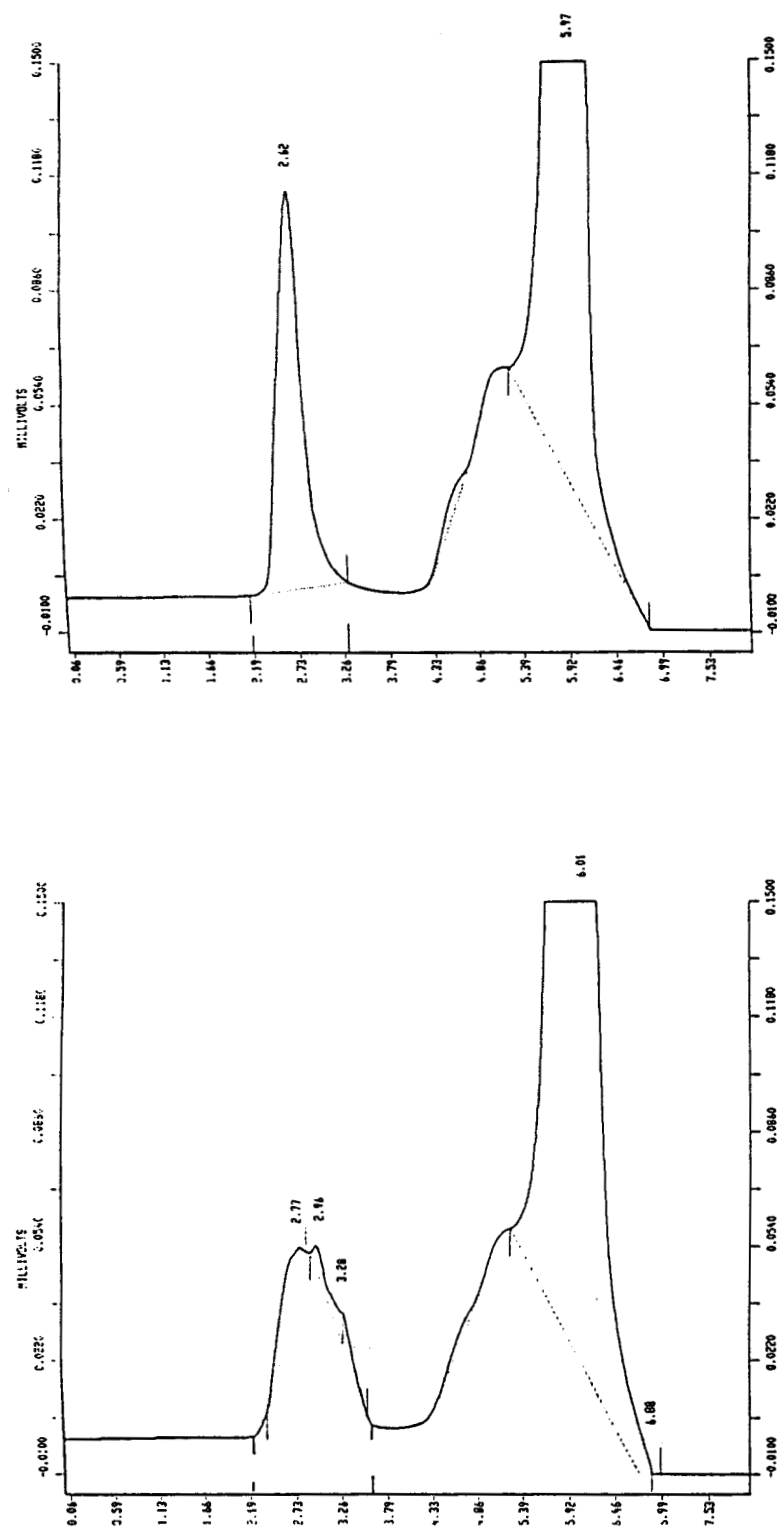


Figure 13: Chromatogrammes HPLC de surnageant de culture du clone 40/16 et du témoin HB101.

Ainsi, par HPLC, nous pouvons visualiser les dégradations de la molécule de dextran même si elles sont faibles (tout comme avec le test de Koh et Khouw (1970)). Ceci n'était pas possible par les dosages de sucres réducteurs car les bactéries peuvent métaboliser les sucres produits et, de plus, ces dosages nécessiteraient des temps d'incubation très longs.

4 - ANALYSE DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Les 10 plasmides provenant des clones stables et reproductibles vis-à-vis de la dégradation ont été plus particulièrement étudiés.

4.1 - Analyse par lyse directe.

Le contenu plasmidique des 10 clones a été analysé en gel d'agarose par la méthode d'Eckhardt (1978). Les résultats obtenus montrent des plasmides dont les tailles sont comprises entre 7500 et 12500 paires de bases (cf figure 14). Nous pouvons remarquer que, dans la majorité des cas, ce sont les plasmides dont les tailles étaient les plus importantes qui se sont révélés instables.

Cette méthode est rapide pour la mise en évidence des plasmides et pour les approximations de leurs tailles. Cependant, pour mieux connaître ces plasmides et voir s'il existe des fragments semblables chez chacun d'eux, il était nécessaire d'établir leurs cartes de restriction.

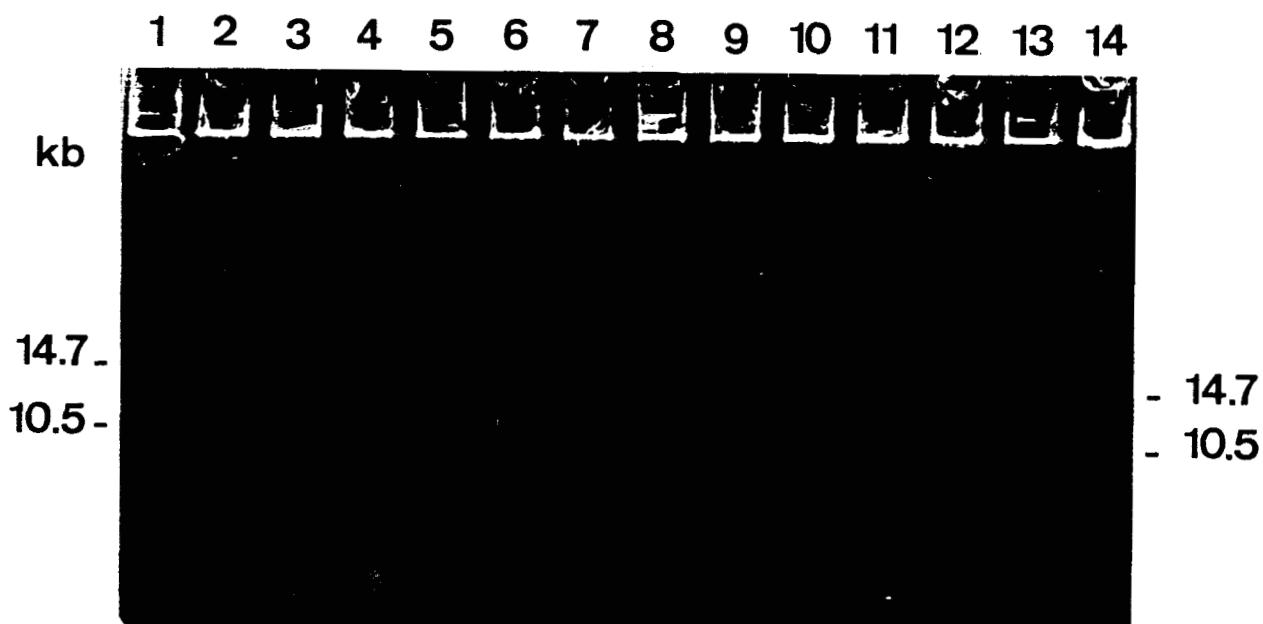


Figure 14: Contenu plasmidique des 10 clones par lyse directe en gel d'agarose.

1 et 13: Témoin pKBF367-1 (14,7 kb).

2 et 14: Témoin pKBF367-12 (10,5 kb).

3: 40/16; 4: 122/46; 5: 146/22; 6: 148/42; 7: 175/23;

8: 177/52; 9: 184/44; 10: 277/31; 11: 291/7; 12: 300/25.

4.2 - Etablissement des cartes de restriction.

Les cartes de restriction ont été effectuées afin de voir s'il existait des points communs entre les divers fragments clonés. De plus, cela nous permet de connaître précisément leurs tailles et les résultats seront utiles en cas de sous-clonage.

Les enzymes de restriction choisis pour les digestions de DNA plasmidique coupent le pBR322 en un seul point. Il s'agit de *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I et *Sca*I. Les 10 plasmides ont été extraits par la technique de Ish-Horowicz et Burke (1981) (cf figure 15) puis des digestions simples et doubles, partielles et totales ont été effectuées afin de connaître les tailles des différents fragments et leurs positions respectives. Les tailles sont déterminées par analyse de régression linéaire par rapport aux témoins de poids moléculaire que sont le DNA du phage lambda digéré par *Eco*RI, *Hind*III ou les deux simultanément.

Quand on introduit des fragments digérés par l'enzyme *Sau*3AI dans un site *Bam*HI, nous avons 1 chance sur 4 de retrouver ce site *Bam*HI. Les digestions par cet enzyme ont été effectuées en premier lieu afin de savoir si l'on pouvait ressortir en entier les fragments insérés (cf figure 16, 18 A2 et B2). Comme l'on peut le voir, peu de plasmides sont coupés par *Bam*HI. A l'aide de doubles digestions, les sites ont été placés sur les inserts et seuls les plasmides 146/22, 175/23, 177/52 et 277/31 ont gardé un site *Bam*HI à une de leurs extrémités. D'autres profils de digestion sont représentés dans les figures 17 à 21. Nous pouvons remarquer que, quelle que soit la digestion, les plasmides 40/16 et 122/46 sont identiques. Les profils de digestion ont permis d'établir les cartes de restriction présentées en figure 22.

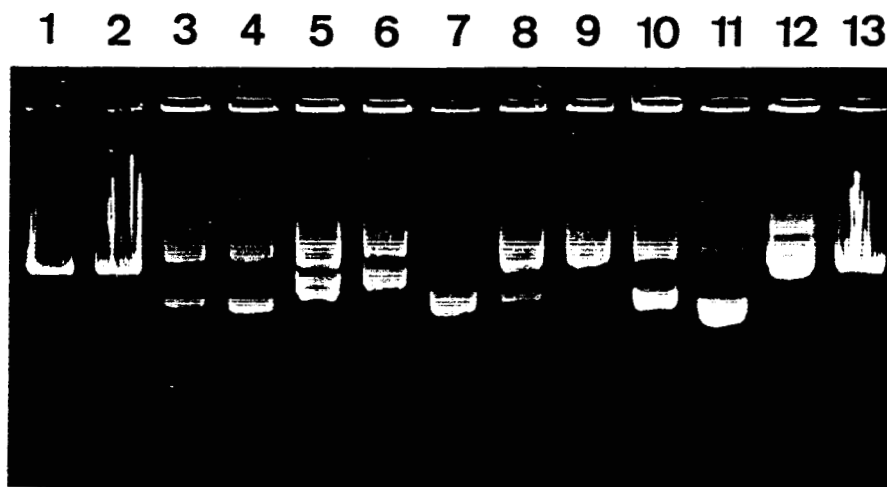


Figure 15: Contenu plasmidique des 10 clones HB101.
 3: 40/16; 4: 122/46; 5: 146/22; 6: 148/42; 7: 175/23;
 8: 177/52; 9: 184/44; 10: 277/31; 11: 291/7; 12: 300/25.
 Témoin DNA du phage λ : 1: 0,2 μ g; 2: 0,5 μ g; 13: 1 μ g.

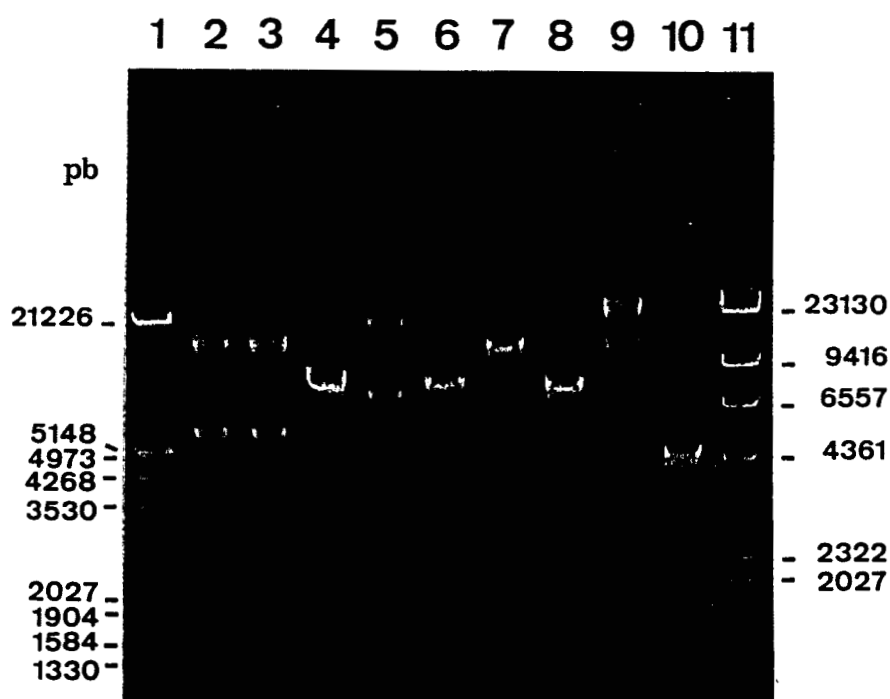


Figure 16: Profils de digestion des plasmides par *Bam*HI.
 2: 40/16; 3: 122/46; 4: 146/22; 5: 148/42; 6: 175/23;
 7: 184/44; 8: 291/7; 9: 300/25; 10: pBR322.
 1: DNA du phage λ digéré par *Eco*RI et *Hind*III.
 11: DNA du phage λ digéré par *Hind*III.

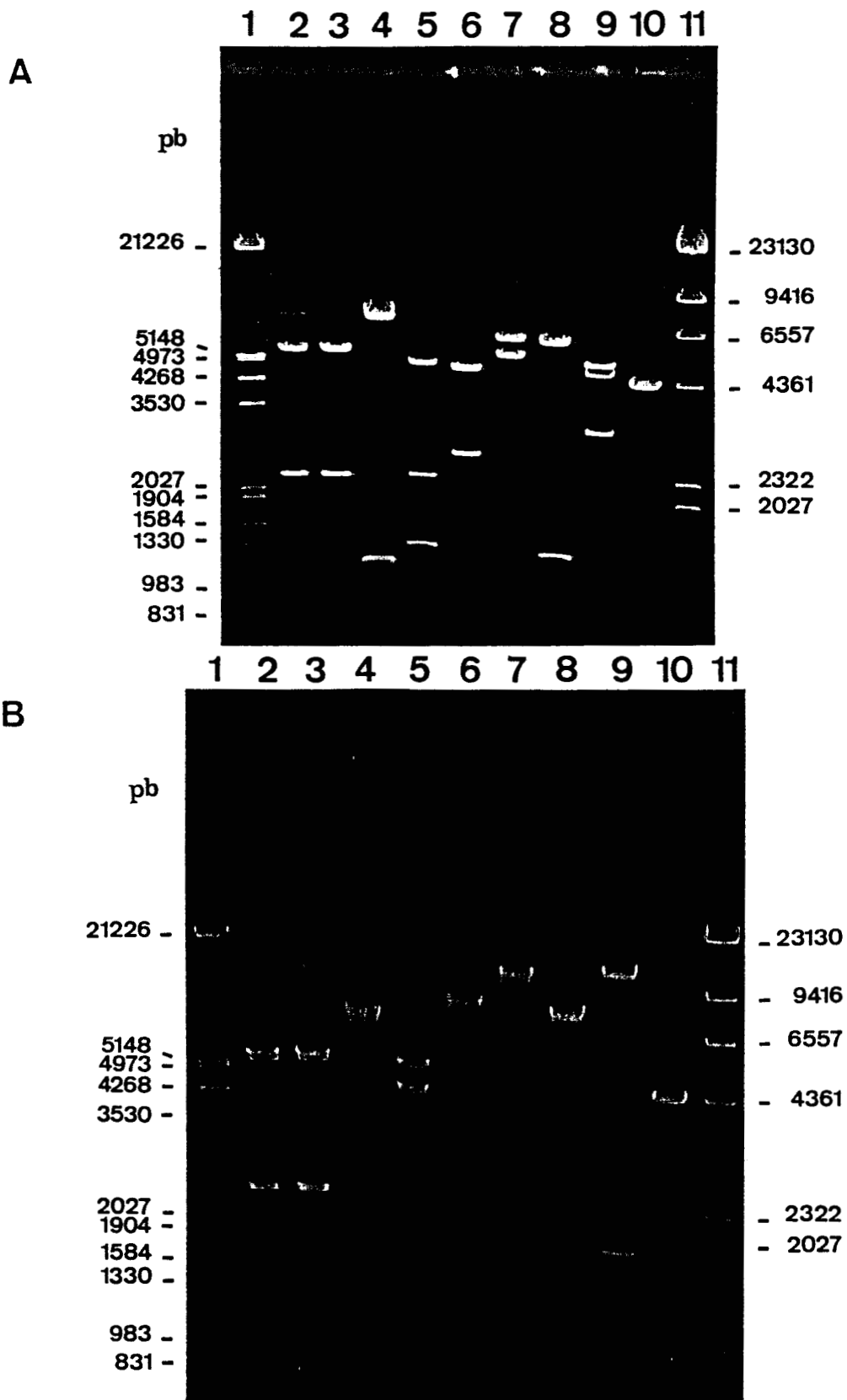


Figure 17: Profils de digestion des plasmides:
 A: par *EcoRI*; B: par *HindIII*. 2: 40/16; 3: 122/46;
 4: 146/22; 5: 148/42; 6: 175/23; 7: 184/44; 8: 291/7;
 9: 300/25; 10: pBR322. 1: DNA du phage λ digéré par *EcoRI*
 et *HindIII*. 11: DNA du phage λ digéré par *HindIII*.

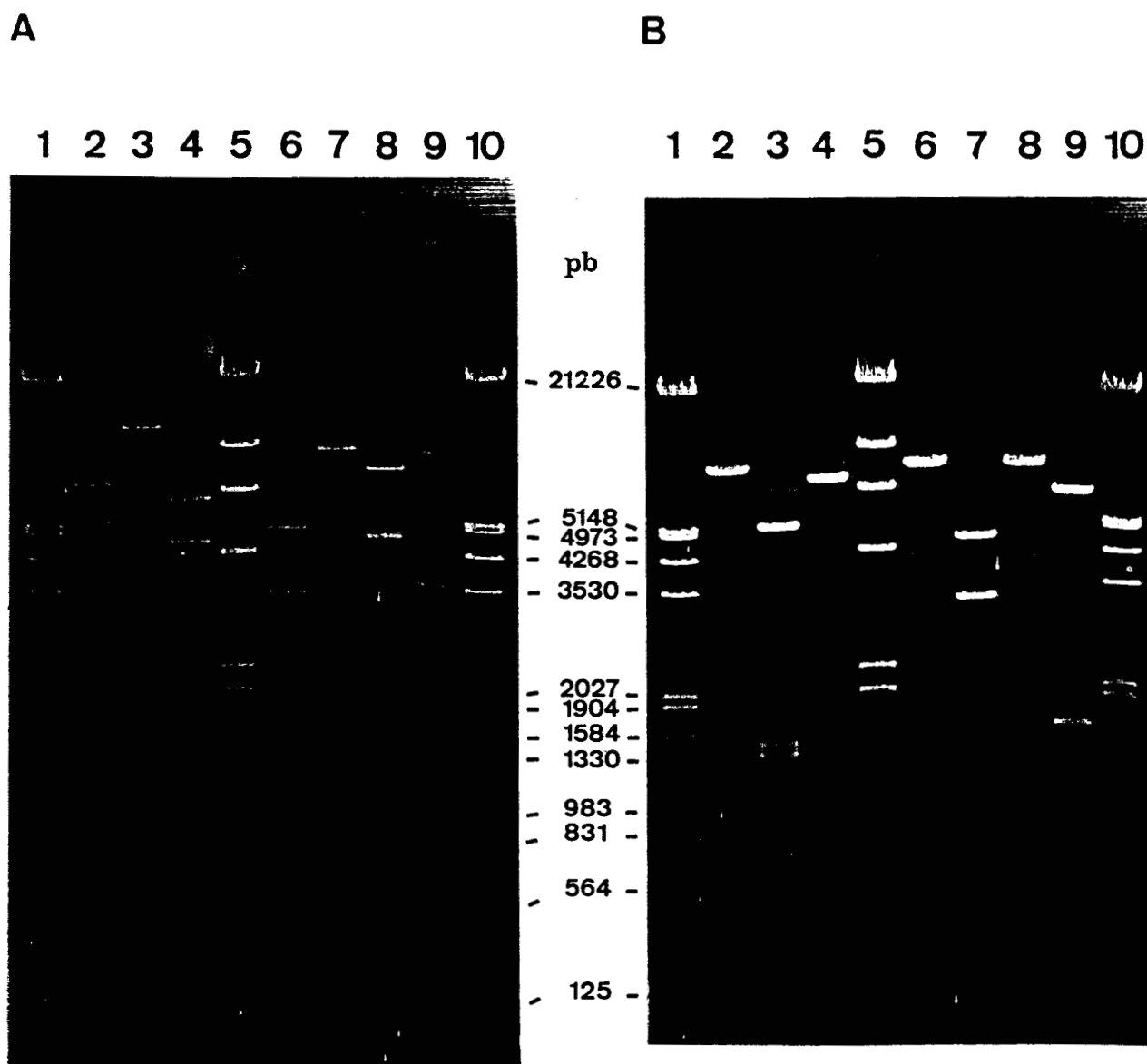


Figure 18: Profils de digestion des plasmides 177/52 et 277/31 par différents enzymes de restriction.

A: plasmide 177/52.

B: plasmide 277/31.

2: *Bam*HI; 3: *Eco*RI; 4: *Hind*III; 6: *Pst*I; 7: *Pvu*II;
8: *Sal*I; 9: *Sca*I.

1 et 10: DNA du phage λ digéré par *Eco*RI et *Hind*III.

5: DNA du phage λ digéré par *Hind*III.

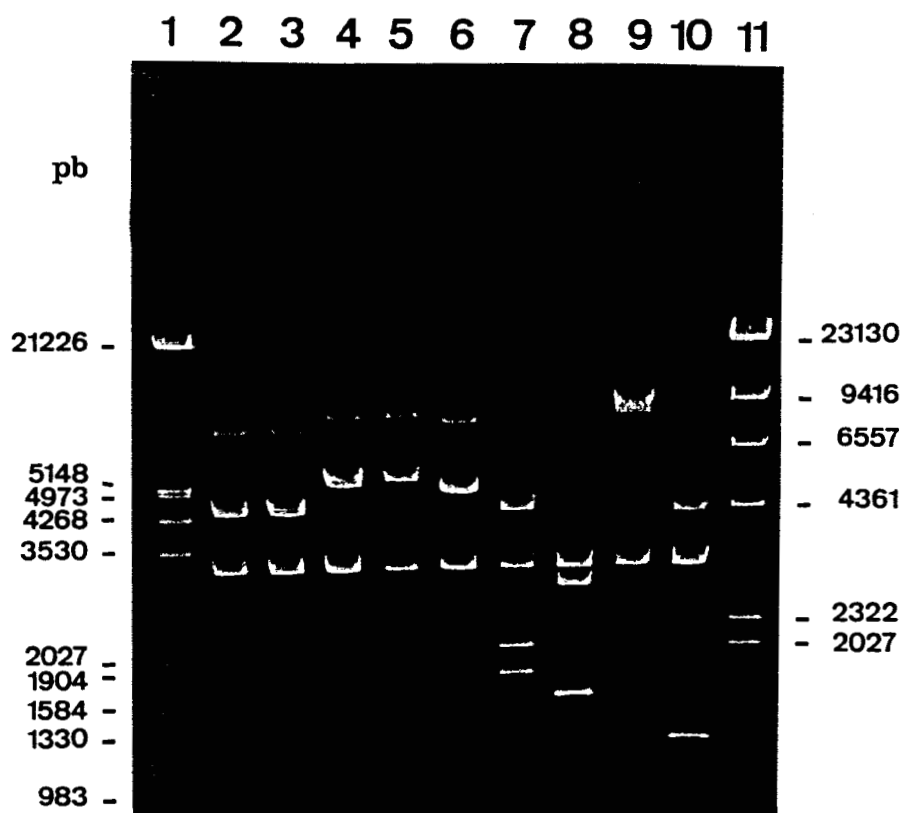


Figure 19 a: Profils de double digestion des plasmides par *SaII* et *ScaI*.

2: 40/16; 3: 122/46; 4: 146/22; 5: 148/42; 6: 175/23;

7: 184/44; 8: 291/7; 9: 300/25; 10: pBR322.

1: DNA du phage λ digéré par *EcoRI* et *HindIII*.

11: DNA du phage λ digéré par *HindIII*.

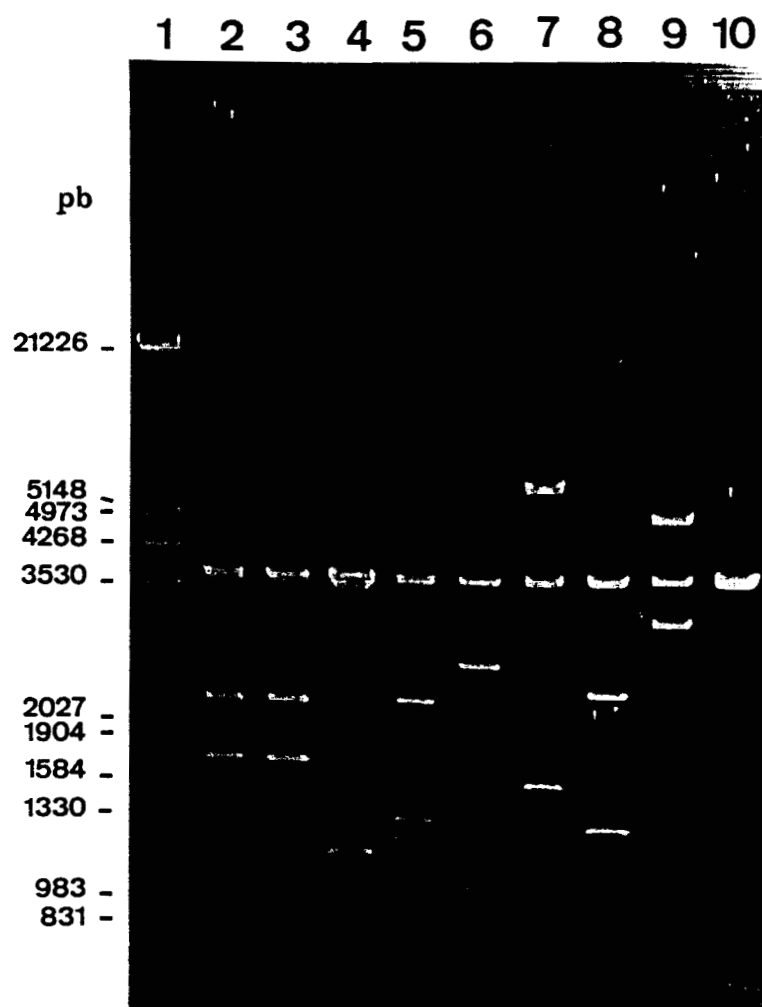


Figure 19 b: Profils de double digestion des plasmides par *EcoRI* et *SalI*.

2: 40/16; 3: 122/46; 4: 146/22; 5: 148/42; 6: 175/23;

7: 184/44; 8: 291/7; 9: 300/25; 10: pBR322.

1: DNA du phage λ digéré par *EcoRI* et *HindIII*.

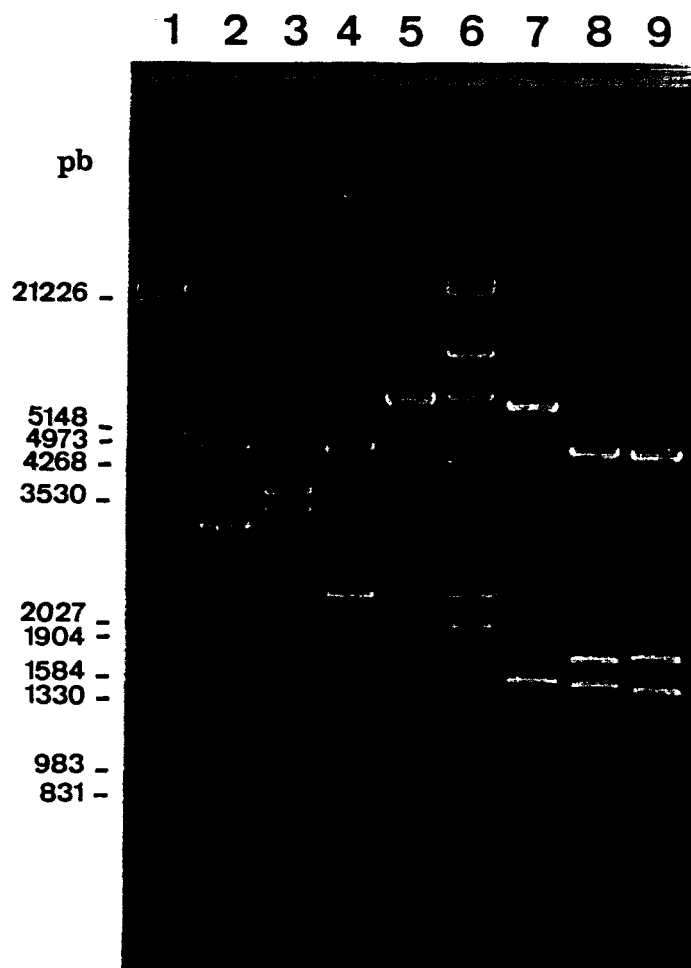


Figure 20

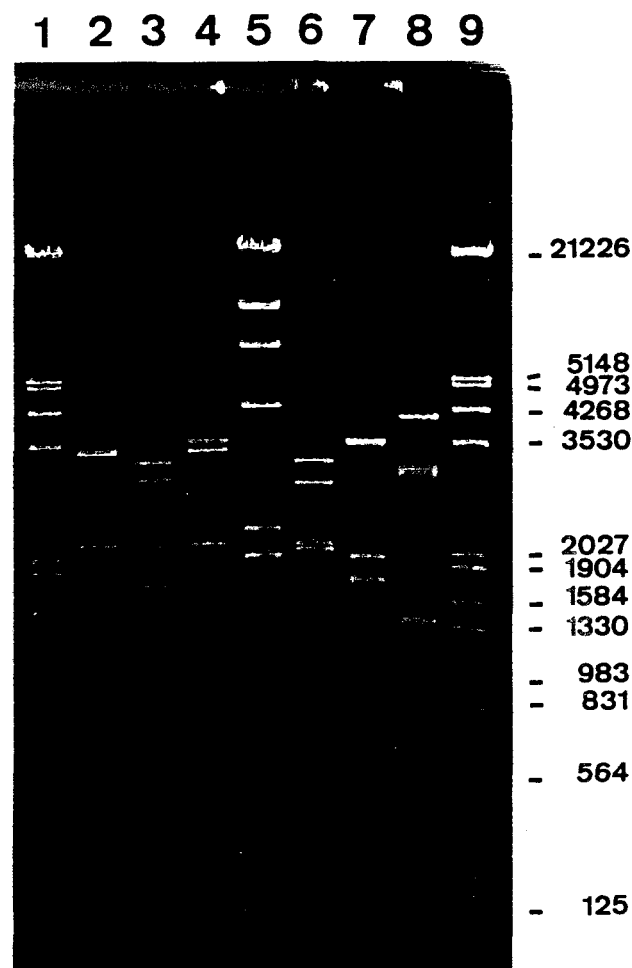


Figure 21

Figure 20: Profils de double digestion du plasmide 277/31 par différents enzymes de restriction.

2: *SalI/ScaI*; 3: *HindIII/SalI*; 4: *HindIII/PvuII*; 5: *HindIII/ScaI*; 7: *PstI/ScaI*; 8: *PstI/PvuII*; 9: *ScaI/PvuII*.
1: DNA du phage λ digéré par *EcoRI* et *HindIII*.
6: DNA du phage λ digéré par *HindIII*.

Figure 21: Profils de double digestion du plasmide 177/52 par différents enzymes de restriction.

2: *PstI/EcoRI*; 3: *PstI/SalI*; 4: *PstI/ScaI*; 6: *PstI/BamHI*; 7: *PvuII/ScaI*; 8: *HindIII/ScaI*.
1 et 9: DNA du phage λ digéré par *EcoRI* et *HindIII*.
5: DNA du phage λ digéré par *HindIII*.

Les cartes de restriction (présentées en figure 22) nous ont permis de connaître plus précisément les tailles des inserts. Celles-ci s'échelonnent entre 3,2 et 8,4 kb et sont d'environ:

- 3,2 kb pour le 40/16 et le 122/46.
- 4,1 kb pour le 146/22.
- 5,2 kb pour le 148/42.
- 3,8 kb pour le 175/23.
- 7,9 kb pour le 177/52.
- 7,0 kb pour le 184/44.
- 3,6 kb pour le 277/31.
- 3,3 kb pour le 291/7.
- 8,4 kb pour le 300/25.

Ces cartes de restriction ne montrent pas l'existence de beaucoup de points communs entre les inserts (si ce n'est que les inserts 40/16 et 122/46 sont identiques), ce qui laisse supposer un nombre assez important de protéines ayant une activité dextranasique chez *Bacteroides*. Nous avons d'ailleurs vu précédemment qu'au minimum 2 protéines sont impliquées. D'autre part, Forsberg *et al.* ont montré en 1986 l'existence de 19 protéines ayant une activité β -endoglucanasique chez *B. succinogenes*; dont 6 avaient déjà été clonées par Crosby *et al.* en 1984. Ces auteurs expliquent la présence de la multiplicité des endoglucanases par la multiplicité des gènes mais aussi par des modifications post-traductionnelles. Sans aller jusque ce nombre, nous pouvons penser que plusieurs protéines, ici aussi, interviennent dans la dégradation du polysaccharide.

Néanmoins, nous pouvons mettre en évidence quelques similitudes pour des portions d'inserts. Ainsi, les fragments 177/52 et 184/44 possèdent tous deux une séquence *EcoRI-SalI-BamHI-ScaI-PstI* qui est très ressemblante malgré quelques petites différences dans les distances entre sites de restriction. Nous trouvons le

même phénomène pour les inserts 148/42 et 277/31 au niveau d'une séquence *HindIII-PvuII-ScaI-EcoRI-EcoRI*. Sinon, nous pouvons également remarquer que les sites de ces différents enzymes ne sont pas également représentés dans les inserts; en effet, on trouve 14 sites de coupure *EcoRI* alors que l'on ne trouve que 2 sites *Sall*.

A la vue de ces résultats, nous avons voulu vérifier que tous les inserts proviennent bien de la souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* 489 de départ. C'est pourquoi nous avons effectué des expériences d'hybridation entre les plasmides des différents clones et le DNA chromosomique de la souche de *Bacteroides*.

5 - HYBRIDATIONS ENTRE DNA CHROMOSOMIQUE ET PLASMIDES RECOMBINANTS.

Les hybridations entre le DNA chromosomique et les plasmides présents dans les clones ont été effectuées tout d'abord par une technique utilisant des sondes biotinylées. Sur les gels d'électrophorèse en agarose qui ont servi aux transferts vers les membranes, nous avons déposé les échantillons suivants:

- le DNA chromosomique de la souche de *Bacteroides* 489 digéré par l'enzyme *HindIII* (3 µg).
- le DNA chromosomique de la souche *E. coli* HB101 digéré par l'enzyme *HindIII* (3 µg).
- le DNA total (chromosomique et plasmidique) d'un clone digéré par l'enzyme *HindIII* (1 µg).
- le DNA du phage lambda digéré par *HindIII* comme témoin de poids moléculaire (1 µg).

Le DNA chromosomique de la souche HB101 est utilisé comme témoin négatif; ceci pour vérifier que les inserts des clones ne proviennent pas de la souche qui a été transformée par le mélange de ligature (plasmide pBR322 et fragments de DNA chromosomique). Le DNA total d'un clone

sert de témoin positif car on est sûr d'avoir hybridation entre la sonde et le plasmide qui se trouve dans le profil de digestion car ce sont les mêmes plasmides. Donc, grâce à ce témoin, nous pouvons vérifier que la technique d'hybridation est au point.

En figure 23 est représentée la membrane dont le DNA total est celui du clone 40/16. La sonde utilisée pour l'hybridation est le plasmide entier (7,6 kb) contenu dans ce clone. Nous remarquons que nous avons bien hybridation entre la sonde et 2 bandes de DNA du témoin positif qui correspondent aux 2 fragments (5,3 et 2,3 kb) du plasmide digéré par *HindIII*. Nous avons également hybridation de la sonde avec le DNA chromosomique de *Bacteroides*; donc, il ne fait aucun doute que le fragment inséré sur le pBR322 provient bien de la souche de *B. thetaiotaomicron* 489. Par contre, nous pouvons également nous rendre compte que les réponses sont faibles. C'est pour cela que nous sommes passés aux techniques d'hybridation avec sondes radiomarquées.

La membrane d'hybridation de la figure 24 correspond au clone 184/44. La sonde utilisée est donc le plasmide de 11,3 kb provenant de ce clone que l'on a marqué par de l' α -³²P dCTP. Le plasmide 184/44 est coupé en 2 points par l'enzyme *HindIII* et nous obtenons 2 fragments de 10,5 et 0,76 kb. Au niveau du témoin positif (DNA total du clone 184/44), nous avons bien hybridation au niveau de ces 2 bandes avec une réponse assez faible pour celle de 0,76 kb. Ceci est normal car ce fragment ne correspond qu'à environ 7 % de la taille de la sonde et la quantité de DNA correspondant à cette bande est faible. Nous avons également hybridation à de multiples niveaux avec le DNA chromosomique de la souche 489, ce qui semble montrer que la digestion de ce profil n'est pas complète. Cependant, nous avons un spot d'hybridation assez important pour un fragment d'environ 0,7 kb. Celui-ci doit correspondre au

petit fragment de 0,76 kb du 184/44 qui est constitué d'environ 414 pb provenant de *Bacteroides* et de 346 pb du pBR322.

Nous avons effectué les hybridations pour les 10 clones. Dans chaque cas, nous avons obtenu une réponse avec le DNA chromosomique de la souche de *B. thetaiotaomicron* 489. Donc, nous sommes maintenant sûrs que le DNA cloné appartient bien dans tous les cas à la souche de *Bacteroides* de départ.

Nous avons donc vérifié que les clones correspondent bien à la souche transformée; que le DNA inséré sur les plasmides provient bien de la souche de départ et nous avons vu que les cartes de restriction ne montrent que peu de similitudes entre les différents fragments. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer des hybridations entre les différents fragments clonés; ceci devait nous permettre de savoir s'il existait des homologies entre ces fragments.

Nous pouvons remarquer la forte différence de sensibilité entre les 2 techniques d'hybridation utilisées. En effet, les quantités de DNA déposées sur les gels d'électrophorèse et donc transférées sur les membranes d'hybridation sont similaires. Donc, à sensibilité équivalente, nous devons avoir une réponse équivalente; ce qui n'est pas le cas. C'est pourquoi, pour les hybridations entre les plasmides, nous avons retenu la technique où le marquage de la sonde est radioactif.

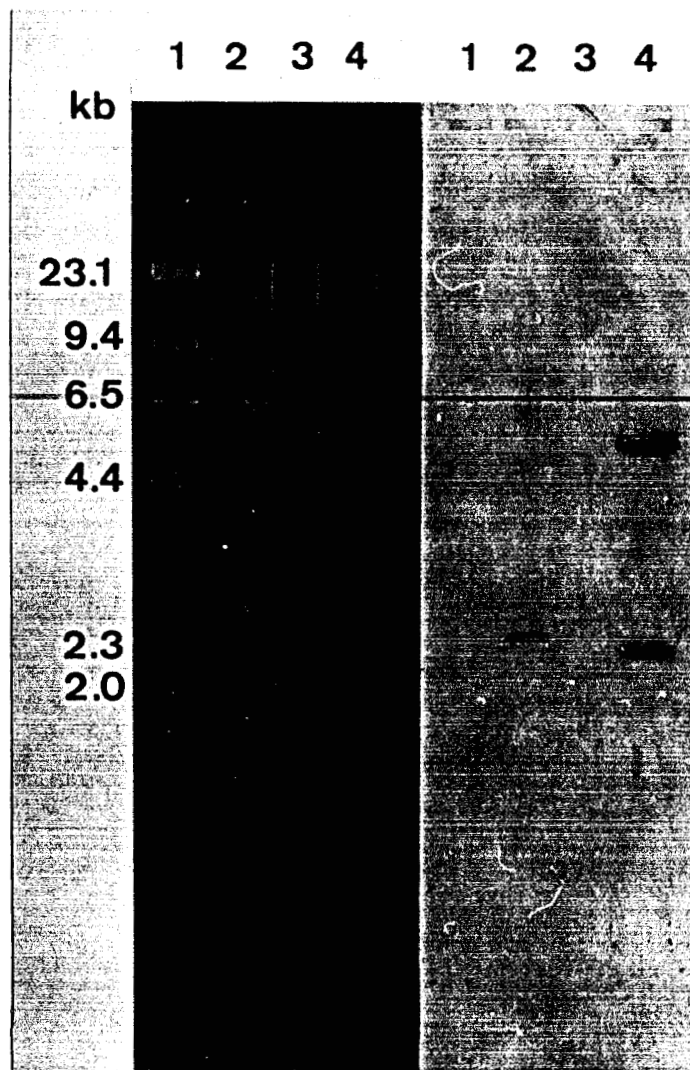


Figure 23: Membrane d'hybridation entre le plasmide recombinant du clone 40/16 et le DNA chromosomique de *B. thetaiotaomicron* 489.

1: DNA du phage lambda digéré par *Hind*III.

2: DNA chromosomique de la souche 489 digéré par *Hind*III.

3: DNA chromosomique de la souche HB101 digéré par *Hind*III

4: DNA total du clone 40/16 digéré par *Hind*III.

La sonde est le plasmide entier du clone 40/16 marqué par de la biotine-11-dATP.

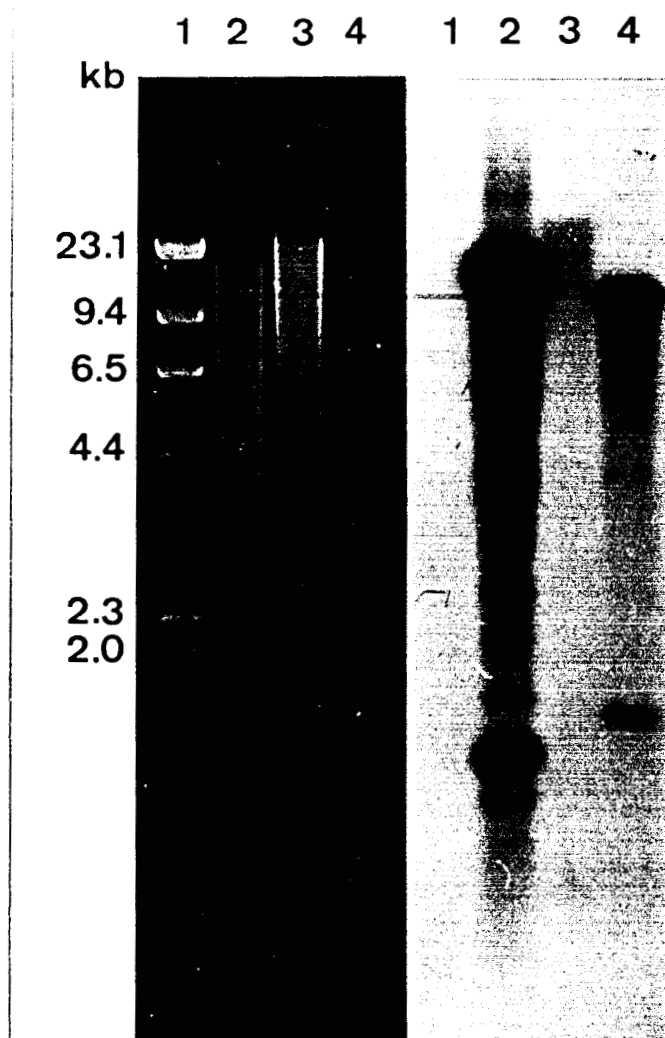


Figure 24: Membrane d'hybridation entre le plasmide recombinant du clone 184/44 et le DNA chromosomique de *B. thetaiotaomicron* 489.

1: DNA du phage lambda digéré par *Hind*III.

2: DNA chromosomique de la souche 489 digéré par *Hind*III.

3: DNA chromosomique de la souche HB101 digéré par *Hind*III

4: DNA total du clone 184/44 digéré par *Hind*III.

La sonde est le plasmide entier du clone 184/44 marqué par de l' α - ^{32}P dCTP.

6 - HYBRIDATIONS ENTRE PLASMIDES RECOMBINANTS.

Comme les résultats des cartes de restriction ne montrent que peu d'homologies entre les différents inserts portés par les plasmides, nous avons réalisé des hybridations entre ceux-ci.

Sur les gels d'électrophorèse destinés aux transferts sur les membranes d'hybridation, nous avons déposé dans chacun des 10 puits 2 µg de DNA plasmidique. Le DNA a été préalablement digéré par *HindIII* et *SalI* qui sont les 2 sites de restriction de la partie pBR322 des plasmides les plus proches des extrémités des inserts. De plus, l'enzyme de restriction *SalI* a été plus particulièrement choisi car il ne coupe que très peu les inserts. De ce fait, les fragments de restriction seront moins nombreux et leurs tailles plus élevées.

Les membranes d'hybridations étant prêtes, nous avons préparé les fragments de DNA qui seront utilisés comme sonde. Evidemment, nous ne pouvons pas utiliser pour sondes les plasmides entiers car nous aurions des réponses pour les parties communes que sont les parties du pBR322. De ce fait, chaque sonde a été préparée par électroélution après les digestions enzymatiques appropriées à chaque cas. Ainsi, nous avons préparé 6 sondes à partir de fragments des plasmides 146/22, 148/42, 177/52, 184/44, 277/31 et 300/25. Pour chaque sonde, nous avons choisi des digestions qui donnent la plus grande représentation de l'insert en question. Dans le cas du plasmide 146/22, la digestion retenue est la double digestion *EcoRI/PvuII* qui nous donne un fragment de 3,2 kb pour un insert dont la taille totale est de 4,1 kb. Donc, la sonde couvre 78 % de l'insert. (Remarque: les tailles des inserts *Bacteroides* sont exprimées en kb car il existe une incertitude alors que celles du pBR322 le sont en pb car sa séquence en nucléotides est connue).

En résumé:

sonde	digestion	taille	% de l'insert
146/22	EcoRI/PvuII	3,2 kb	78
148/42	HindIII/PvuII	3,5 kb	68
177/52	BamHI	7,1 kb	90
184/44	EcoRI/PvuII	5,6 kb	81
277/31	HindIII/BamHI	3,3 kb	90
300/25	HindIII/ScaI	6,4 kb	75

Certaines sondes n'ont pas été préparées car, soit l'on n'avait pas une représentation suffisante de l'insert, soit il n'était pas possible d'isoler un fragment exempt de parties pBR322. C'est le cas des plasmides 40/16 et 122/46 qui sont identiques et chez lesquels on ne trouve que 2 sites de restriction au milieu de l'insert. De ce fait, il n'était pas possible de faire une sonde ne comportant que du DNA provenant de *Bacteroides*. Dans le cas des plasmides 175/23 et 291/7, nous n'avons pas préparé de sondes car celles-ci n'auraient représenté respectivement que 48 et 40 % de l'insert.

6.1 - Hybridations avec la sonde 300/25.

En figure 25, nous voyons les résultats obtenus dans le cas de la sonde 300/25. Sur le gel d'électrophorèse, la double digestion du plasmide 300/25 par *HindIII/SalI* donne 3 fragments: 1 de 3741 pb qui ne contient que la séquence pBR322, 1 de 7,2 kb qui correspond pour 6,9 kb à l'insert et pour 276 pb au fragment *BamHI/SalI* du pBR322, 1 de 1,9 kb qui correspond pour 1,55 kb à l'insert et pour 346 pb au fragment *HindIII/BamHI* du pBR322.

La sonde de 6,4 kb a la séquence suivante: *HindIII-EcoRI-PvuII-PvuII-EcoRI-PstI-ScaI* et ne s'hybride qu'avec elle-même au niveau du fragment de restriction *HindIII/SalI* de 7,2 kb du plasmide 300/25 qui a la séquence: *HindIII-EcoRI-PvuII-PvuII-EcoRI-PstI-ScaI-SalI*

(le site *SaII* appartient au pBR322). Cette sonde ne peut s'hybrider avec le petit fragment de restriction de 1,9 kb puisque la partie de l'insert de 1,55 kb le constituant n'est pas recouverte par la sonde.

6.2 - Hybridations avec la sonde 148/42.

En figure 26, ce sont les résultats correspondant à la sonde 148/42. Sur le gel d'électrophorèse, la double digestion *HindIII/SaII* du plasmide 148/42 engendre la formation de 3 fragments: 1 de 3741 pb constitué de la séquence pBR322, 1 de 0,56 kb qui correspond pour 0,28 kb à l'insert et pour 276 pb à la partie *BamHI/SaII* du pBR322, 1 de 5,3 kb qui correspond pour 4,95 kb à l'insert et pour 346 pb au fragment *HindIII/BamHI* du pBR322.

La sonde de 3,55 kb a la séquence suivante: *PvuII-EcoRI-EcoRI-ScaI-PvuII*. Celle-ci s'hybride avec elle-même au niveau du fragment de restriction *HindIII/SaII* de 5,3 kb du plasmide 148/42 et non au niveau du fragment de 0,56 kb. Ceci est normal puisque la sonde ne recouvre pas ce dernier fragment.

De plus, la sonde 148/42 s'hybride avec un fragment du plasmide 277/31. Ce dernier donne 3 fragments par la double digestion *HindIII/SaII* dont un de 3,6 kb constitué pour 3,3 kb de l'insert et pour 276 pb du fragment *BamHI/SaII* du pBR322. C'est avec la partie de 3,3 kb qui a pour séquence *HindIII-PvuII-ScaI-EcoRI-EcoRI-BamHI* que la sonde 148/42 s'hybride. Entre la séquence de la sonde et celle de ce fragment, nous voyons qu'il existe des similitudes assez fortes mais que les inserts sont intégrés sur le plasmide pBR322 en sens inverse.

6.3 - Hybridations avec la sonde 277/31.

En figure 27 est présentée la membrane qui a été mise en contact avec la sonde 277/31. Sur le gel d'électrophorèse, la double digestion *HindIII/SaII*

engendre la formation de 3 fragments: 1 de 3741 pb correspondant au pBR322 presque complet, 1 de 0,7 kb constitué pour 0,35 kb de l'insert et pour 346 pb du fragment *HindIII/BamHI* du pBR322, 1 de 3,6 kb constitué pour 3,3 kb de l'insert et pour 276 pb du fragment *BamHI/SalI* du pBR322.

La sonde 277/31 de 3,3 kb a la séquence suivante: *HindIII-PvuII-ScaI-EcoRI-EcoRI-BamHI* et elle s'hybride avec elle-même au niveau du fragment *HindIII/SalI* de 3,6 kb du plasmide 277/31 et non au niveau du fragment de 0,7 kb car celui-ci n'est pas recouvert par la sonde.

De plus, la sonde 277/31 s'hybride avec le fragment *HindIII/SalI* de 5,3 kb du plasmide 148/42. Ce fragment a la séquence suivante: *EcoRI-PvuII-EcoRI-EcoRI-ScaI-PvuII-HindIII*. Nous observons donc pour les hybridations des plasmides 148/42 et 277/31 des hybridations croisées car le premier réagit avec le deuxième et inversement.

Nous voyons donc que les séquences de restriction similaires que nous avons repérées lors de l'établissement des cartes de restriction (à savoir la séquence *HindIII-PvuII-ScaI-EcoRI-EcoRI*) sont bien identiques à quelques détails près. En effet, les distances entre les différents sites de restriction ne sont pas toujours parfaitement semblables. Ceci peut s'expliquer par le fait que les mesures des fragments de restriction ne sont pas toujours très précises; en effet, il est beaucoup plus facile d'obtenir une bonne précision pour la détermination de la taille des petits fragments que dans le cas de grands fragments.

Néanmoins, les plasmides 148/42 et 277/31 portent bien en partie le même insert. Donc, ces gènes doivent coder pour les mêmes produits.

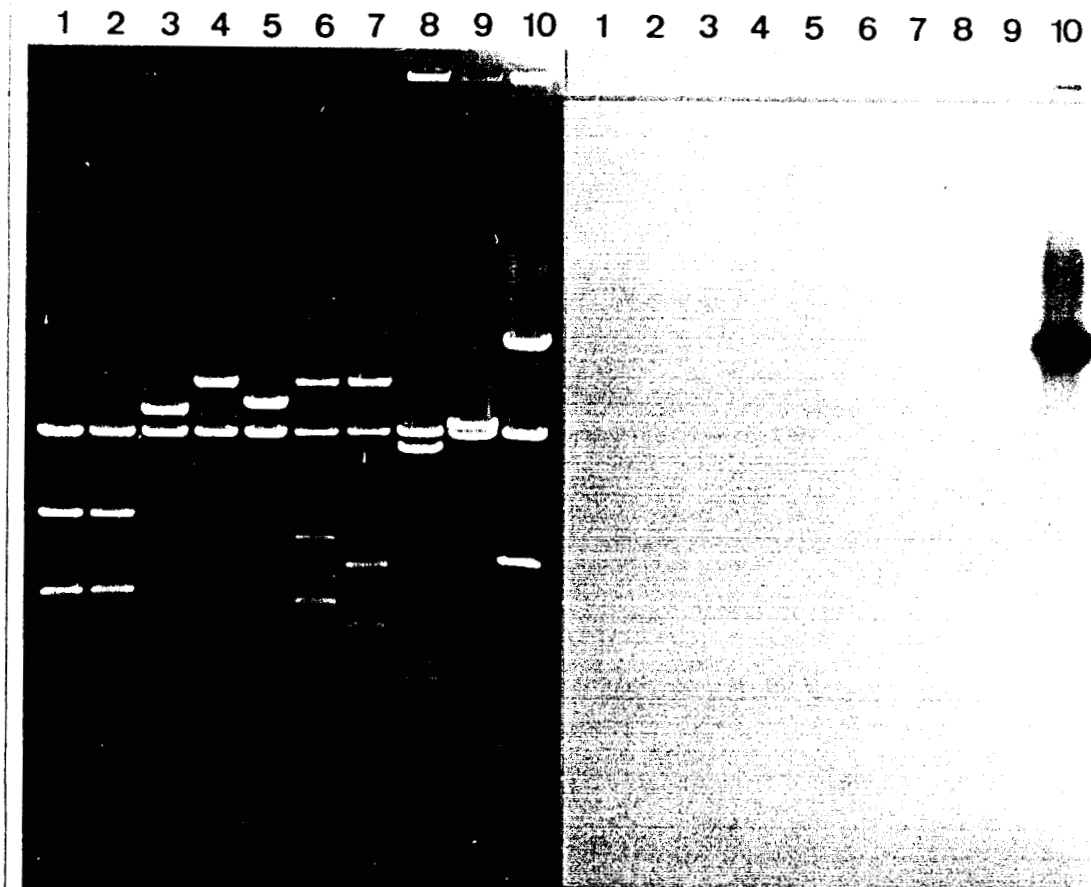


Figure 25: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 300/25 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *HindIII/SaII*. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :

1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.

La sonde d'hybridation est le fragment *HindIII/ScaI* de 6,4 kb provenant du plasmide 300/25.

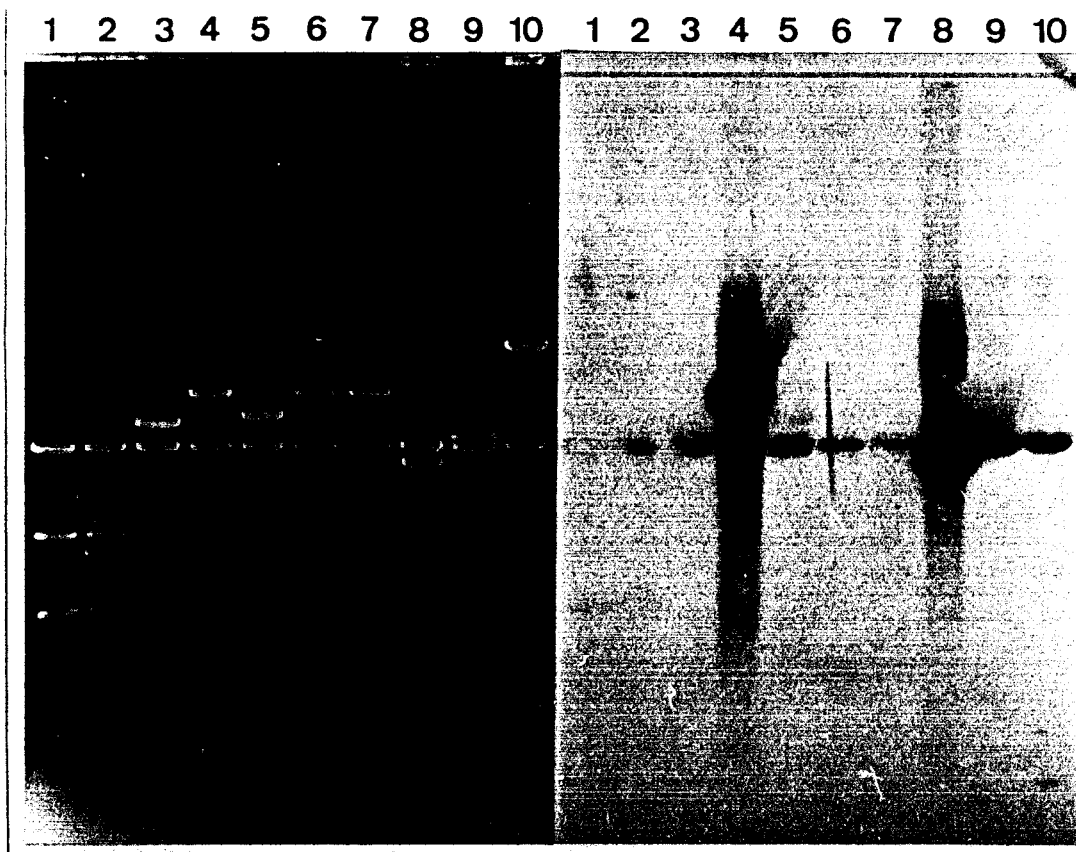


Figure 26: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 148/42 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *HindIII/SalI*. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :
 1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.
 La sonde d'hybridation est le fragment *PvuII/PvuII* de 3,5 kb provenant du plasmide 148/42.

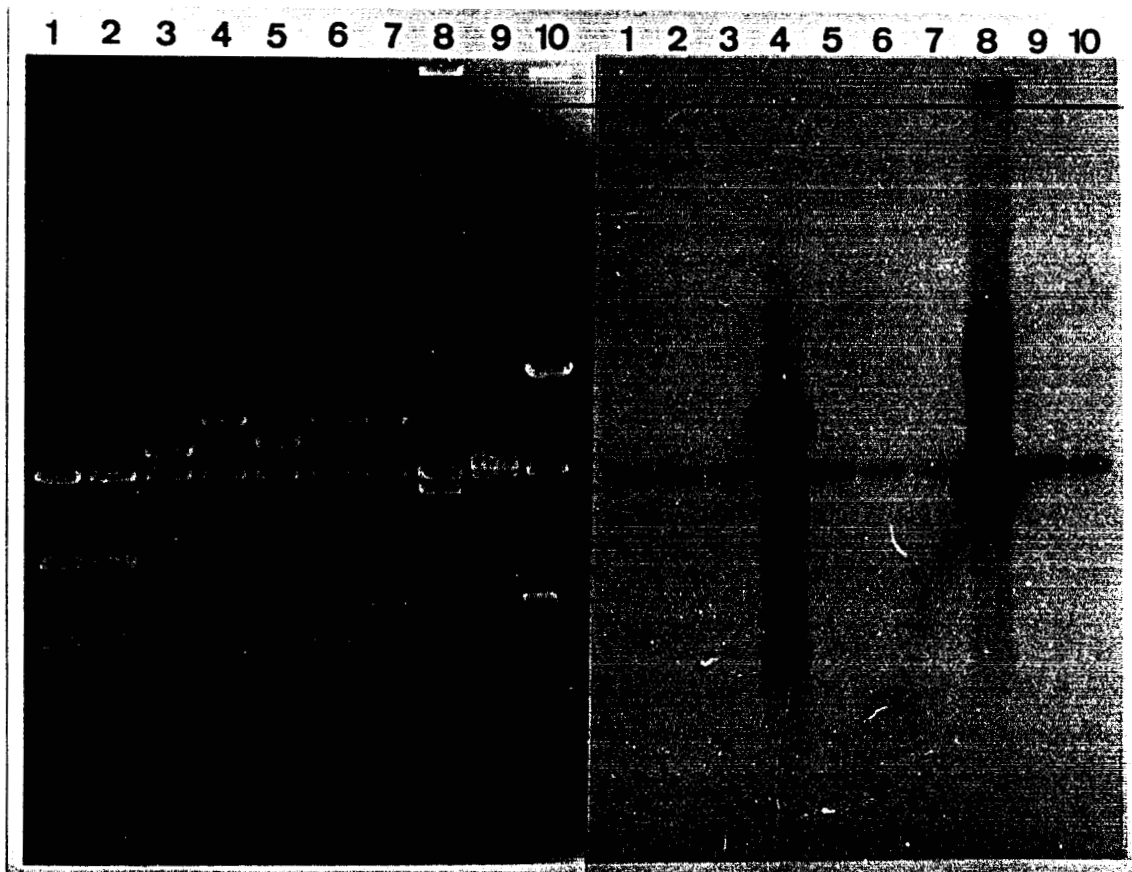


Figure 27: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 277/31 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *Hind*III/*Sal*I. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :

1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.

La sonde d'hybridation est le fragment *Hind*III/*Bam*HI de 3,3 kb provenant du plasmide 277/31.

6.4 - Hybridations avec la sonde 177/52.

En figure 28 se trouvent les résultats obtenus avec la membrane que l'on a hybridée avec la sonde 177/52. Sur le gel d'électrophorèse, la double digestion *HindIII/SalI* du plasmide 177/52 a engendré la formation de 5 fragments: 1 de 3741 pb qui correspond au pBR322, 1 de 5,2 kb et 1 de 1,4 kb qui ne correspondent qu'à l'insert, 1 de 0,93 kb constitué pour 0,65 kb de l'insert et pour 276 pb du fragment *BamHI/SalI* du pBR322, 1 de 0,95 kb constitué pour 0,61 kb de l'insert et pour 346 pb du fragment *HindIII/BamHI* du pBR322. On trouve également sur le gel un fragment de digestion partielle de 2,3 kb qui correspond à l'association des fragments de 1,4 et 0,93 kb.

La sonde 177/52 de 7,1 kb a la séquence suivante: *BamHI-ScaI-PstI-PstI-HindIII-PvuII-HindIII-PvuII-PvuII-PstI-BamHI*. Celle-ci s'hybride avec elle-même au niveau des fragments *HindIII/SalI* de 5,2, 1,4 et 0,93 kb ainsi qu'au niveau du fragment de restriction partielle de 2337 pb. Le fragment de 953 pb n'est pas hybridé car la sonde ne recouvre pas ce fragment de restriction.

Cette sonde réagit également avec 2 fragments de restriction *HindIII/SalI* du plasmide 184/44. Ces 2 fragments couvrent presque la totalité de la taille de l'insert 184/44 et ont la séquence totale suivante: *HindIII-PstI-PstI-ScaI-BamHI*. Nous voyons que cette séquence est identique à celle de la sonde 177/52 à l'exception d'un site *PstI* qui est absent. De plus, ces séquences sont intégrées dans le pBR322 en sens inverse. Si l'on observe les cartes de restriction des inserts 177/52 et 184/44, nous voyons que les similitudes sont encore plus fortes car l'on a dans les 2 cas un fragment *EcoRI-SalI-BamHI* commun mais qui n'est pas couvert par la sonde 177/52.

Sur cette même figure 29, nous pouvons également voir une réponse très faible avec un fragment de restriction du plasmide 146/22. Celui-ci a la séquence de restriction suivante: *HindIII-PstI-BamHI-PvuII-BamHI*. Nous avons hybridation faible mais les ressemblances de séquence ne sont pas frappantes.

6.5 - Hybridations avec la sonde 184/44.

Sur la figure 29 sont reportés les résultats obtenus avec la sonde 184/44 qui a la séquence suivante: *PvuII-HindIII-PstI-PstI-ScaI-BamHI-SalI-EcoRI* et une taille de 5,6 kb. Le plasmide 184/44 donne par double digestion *HindIII-SalI* plusieurs coupures et la sonde réagit avec 3 fragments: 1 de 5,1 kb qui a la séquence *HindIII-PstI-PstI-ScaI-BamHI-SalI* et contre lequel la réaction est forte car la sonde le recouvre totalement, 1 fragment *PvuII-HindIII* pour lequel la réaction est un peu moins forte car la sonde ne le recouvre que de 0,4 kb, et 1 fragment *SalI-EcoRI* de 1,7 kb qui réagit très faiblement car la sonde ne le recouvre que de 0,17 kb.

La sonde 184/44 s'hybride également avec des fragments de restriction du plasmide 177/52. Nous pouvions nous y attendre vu que l'inverse est vrai. La sonde réagit donc avec les fragments suivants: 1 fragment de 5,2 kb qui a la séquence *SalI-BamHI-ScaI-PstI-PstI-PstI-HindIII* (la séquence est identique à l'exception d'un site *PstI* supplémentaire et de l'orientation sur le pBR322), 1 fragment de 1,4 kb de séquence *HindIII-PvuII-HindIII* (avec la séquence *PvuII-HindIII* commune), 1 fragment *EcoRI-SalI* qui réagit faiblement mais cette séquence ne fait que 0,17 kb, et enfin 1 fragment de restriction partielle de 2,3 kb qui a la séquence *HindIII-PvuII-HindIII-PvuII-PvuII-PstI-BamHI* pour lequel la séquence commune est le fragment *PvuII-HindIII*.

Donc, nous avons bien hybridations croisées entre les plasmides 177/52 et 184/44 mais les inserts sont intégrés sur le pBR322 dans le sens inverse et un site *Pst*I n'est pas présent sur le plasmide 184/44.

De plus, comme pour la figure 29, nous avons une hybridation très faible entre un fragment du plasmide 146/22 et la sonde 184/44. C'est le même fragment que dans le cas précédent (de séquence *Hind*III-*Pst*I-*Bam*HI-*Pvu*II-*Bam*HI) qui réagit. Ici également, nous ne voyons pas très bien avec les cartes de restriction où se trouvent les séquences communes.

6.6 - Hybridations avec la sonde 146/22.

Avec les résultats de l'hybridation de la sonde 146/22, nous allons savoir si les hybridations faibles contre les sondes 177/52 et 184/44 sont des artéfacts de manipulation ou le fait de petites séquences communes. En figure 30 sont reportés les résultats obtenus avec la sonde 146/22. Celle-ci a la séquence *Eco*RI-*Hind*III-*Pst*I-*Bam*HI-*Pvu*II et a une taille de 3,2 kb. Cette sonde s'hybride avec elle-même au niveau du fragment *Hind*III-*Pst*I-*Bam*HI-*Pvu*II-*Bam*HI de 3,4 kb.

Cette sonde s'hybride également avec les fragments de digestion du plasmide 177/52. Elle réagit ainsi avec un fragment de 0,93 kb qui a la séquence *Hind*III-*Pvu*II-*Pvu*II-*Pst*I-*Bam*HI, avec un fragment *Hind*III-*Pvu*II-*Hind*III de 1,4 kb (réaction plus faible) et avec le fragment de digestion partielle de 2,3 kb (correspondant à l'association des 2 fragments précédents) qui a la séquence *Hind*III-*Pvu*II-*Hind*III-*Pvu*II-*Pvu*II-*Pst*I-*Bam*HI. Par contre, cette sonde ne semble pas s'hybrider avec le plasmide 184/44.

Donc, nous avons hybridations croisées entre les plasmides 146/22 et 177/52 et non entre le 146/22 et le 184/44. En fait, les réponses observées vis-à-vis des

fragments 146/22 sont toujours très faibles; donc, ceci explique que nous ne voyons pas de séquences communes sur les cartes de restriction. Nous devons plutôt avoir des séquences nucléotidiques communes qui ne se trouvent pas dans les sites de restriction des enzymes testés. De plus, dans certains cas comme ceux des inserts 177/52 et 184/44, nous voyons que les fragments sont identiques à des insertions ou des délétions près (site *Pst*I).

En conclusion, les hybridations nous donnent confirmation des similitudes repérées à la suite de l'établissement des cartes de restriction; à savoir que d'une part, les plasmides 148/42 et 277/31 et d'autre part les 177/52 et 184/44 portent des inserts semblables. Dans ces 2 cas, les inserts se trouvent en sens inverse. De plus, nous avons vu que les 2 inserts 177/52 et 184/44 s'hybrident faiblement avec le plasmide 146/22 et que ce dernier réagit avec le plasmide 177/52. Donc, le plasmide 146/22 ne doit présenter que quelques similitudes de séquence avec le groupe formé par les plasmides 177/52 et 184/44. Sinon, l'insert 300/25 ne réagit avec aucun autre insert; de ce fait, il doit porter des gènes différents. Les inserts à partir desquels nous n'avons pas préparé de sondes ne se sont pas hybridés avec les 6 sondes utilisées. Néanmoins, nous savons que les inserts 40/16 et 122/46 sont identiques. En ce qui concerne les inserts 175/23 et 291/7, nous savons qu'ils ne s'hybrident avec aucune des 6 sondes et, vu leurs profils de restriction, nous pouvons penser qu'il n'existe aucune similitude entre eux.

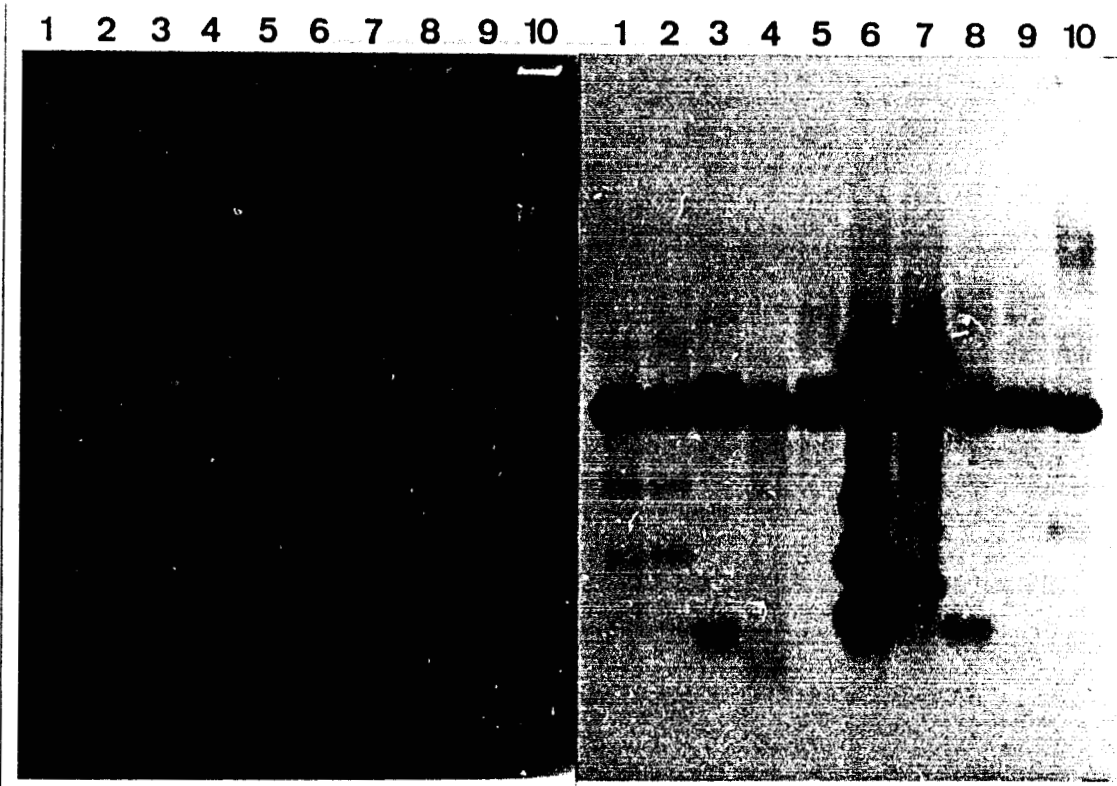


Figure 28: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 177/52 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *HindIII/SaII*. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :

1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.

La sonde d'hybridation est le fragment *BamHI* de 7,1 kb provenant du plasmide 177/52.

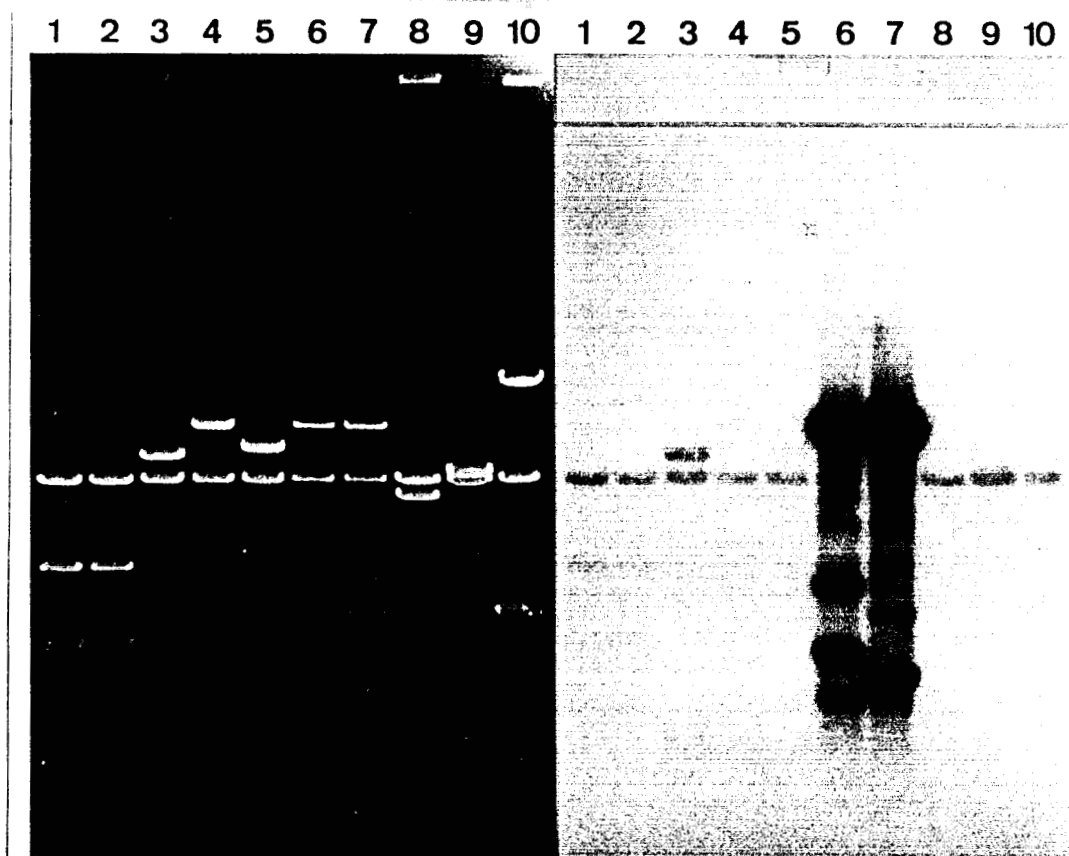


Figure 29: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 184/44 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *HindIII/SaII*. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :

1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.

La sonde d'hybridation est le fragment *PvuII/EcoRI* de 5,6 kb provenant du plasmide 184/44.

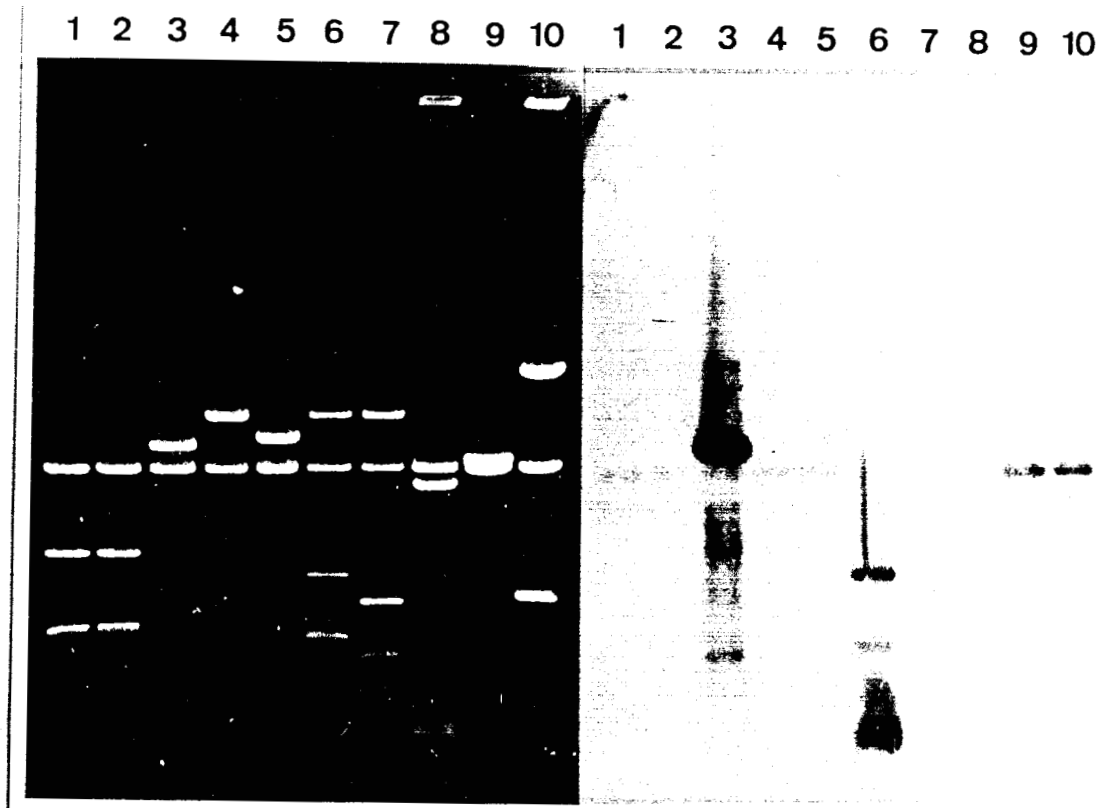


Figure 30: Membrane d'hybridation entre l'insert porté par le plasmide 146/22 et les 10 plasmides isolés. Ces 10 plasmides ont subi une double digestion *HindIII/SalI*. Sur la membrane, ils se trouvent aux positions suivantes :

1: 40/16; 2: 122/46; 3: 146/22; 4: 148/42; 5: 175/23;
 6: 177/52; 7: 184/44; 8: 277/31; 9: 291/7; 10: 300/25.

La sonde d'hybridation est le fragment *EcoRI/PvuII* de 3,2 kb provenant du plasmide 146/22.

7 - SOUS-CLONAGE DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION.

Pour voir si la faible dégradation du dextran n'était pas due à un problème de souche, nous avons introduit par transformation le plasmide 40/16 dans la souche d'*E. coli* GM272. Les clones obtenus ont produit des halos de dégradation sur milieu gélosé avec bleu dextran mais l'intensité de ces halos n'était pas plus forte que dans le cas de la souche HB101. C'est pourquoi nous avons décidé d'entreprendre un sous-clonage.

7.1 Le vecteur d'expression.

Nous avons vu que nous sommes en présence d'un nombre assez important d'inserts différents. Jusqu'à maintenant, l'expression des gènes clonés n'est pas très forte. Le vecteur d'expression choisi est le plasmide pDR720 (figure 5, matériels et méthodes) qui porte, dans un polylinker, la région promoteur / opérateur de l'opéron tryptophane (Russell et Bennett, 1982). Pour la sélection des clones, ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et un gène *galK*. Ce plasmide porte donc un promoteur très puissant afin d'augmenter le niveau d'expression de gènes insérés en aval.

La souche transformée est la souche d'*E. coli* C600 qui possède le gène *trpR*; elle est donc capable de synthétiser un répresseur inactif appelé apo-répresseur. En absence de tryptophane, l'apo-répresseur a peu d'affinité pour la région promoteur/opérateur, qui est active, et les gènes situés en aval sont transcrits. Par contre, en présence de tryptophane, celui-ci se fixe sur l'apo-répresseur inactif pour donner un co-répresseur actif qui va se fixer sur l'opérateur du promoteur de l'opéron tryptophane et donc bloquer la transcription. Le tryptophane augmente donc l'affinité du répresseur pour l'opérateur. En fait, il est normal que le tryptophane

bloque la transcription car, dans le cas de l'opéron tryptophane complet, il serait superflu de synthétiser du tryptophane s'il est déjà présent dans le milieu.

Donc, tant que le tryptophane est absent du milieu, la RNA-polymérase peut se fixer sur l'opérateur et démarrer la transcription; ainsi, les gènes situés en aval vont être transcrits. C'est cette propriété que nous utilisons avec le plasmide pDR720. Pour que l'on ait un haut niveau d'expression, il faut que nous soyons en absence de tryptophane. Nous pouvons induire ces conditions en utilisant un analogue du tryptophane: l'acide 3 β -indole-acrylique qui va se fixer sur l'apo-répresseur à la place du tryptophane mais sans augmenter l'affinité de ce répresseur pour l'opérateur du promoteur. Ainsi, nous nous mettons dans des conditions d'absence de tryptophane puisque l'apo-répresseur ne pourra pas se fixer à l'opérateur.

En fait, nous pourrions, pour être dans des conditions où la présence de tryptophane n'a pas d'importance, utiliser une souche ne synthétisant pas le répresseur. Mais nous aurions des problèmes de stabilité. En effet, il est très difficile de sélectionner et de maintenir des plasmides portant la région promoteur/opérateur de l'opéron tryptophane dans des mutants déficients *trpR*⁻ (Nichols et Yanofsky, 1983).

7.2 Préparation des inserts et transformation.

L'insert que nous avons choisi de sous-cloner est celui porté par le plasmide 40/16. Ceci pour plusieurs raisons. Il est le plus petit des inserts isolés, sa carte de restriction est très simple, il est présent sur 2 des 10 plasmides et s'est exprimé chez une autre souche d'*E. coli* qu'est la souche GM272.

La première étape a consisté à le ressortir du plasmide 40/16. Pour cela, nous avons effectué une double digestion du plasmide par les endonucléases de restriction *Pst*I et *Sal*II. Le fragment de 4,6 kb correspondant a été récupéré par électroélution.

Le plasmide pDR720 a été linéarisé par l'enzyme *Bam*HI et a été déphosphorylé en 5' par la phosphatase alcaline.

Nous avons ensuite effectué une digestion partielle par l'enzyme *Sau*3AI du fragment de 4,6 kb (cf figure 32) et ce DNA a été ligaturé sur le plasmide pDR720 suivant un rapport de concentration de 1/1. Ensuite, la souche d'*E. coli* C600 a été transformée par le mélange de ligature. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu riche LB + ampicilline (100 µg/ml) + dextran T10 à 0,5 %. Après incubation de 48 heures à 37°C, nous avons obtenu environ 15000 colonies.

Le contenu plasmidique d'une cinquantaine de transformants montre que l'on a environ 75 % de plasmides hybrides.

7.3 Criblage des transformants.

Les colonies issues de la transformation ont été repiquées sur milieu minimum gélosé M9 additionné de bleu dextran T2000 (0,5 %), de vitamine B1 (2 µg/ml), d'ampicilline (100 µg/ml), de leucine et de thréonine (20 µg/ml) car la souche est exigeante en ces 2 acides aminés. On a également ajouté une quantité très faible de glycérol (0,05 %) car la souche ne peut sûrement pas utiliser le dextran comme seule source de carbone.

Après repiquage de 600 colonies, nous avons isolé un clone capable de produire une zone de dégradation sur milieu gélosé + bleu dextran. Celui-ci a été repiqué plusieurs fois sur milieu gélosé minimum et riche

contenant du bleu dextran et à chaque fois nous avons obtenu un halo de dégradation. Ce halo n'apparaît pas tout de suite; il faut environ 15 jours pour qu'il commence à se développer. Par contre, quand le halo devient visible, le phénomène ne se passe pas que dans la proximité de la colonie comme c'était le cas pour les clones HB101 précédents. Ainsi, un halo apparu 15 jours après l'ensemencement a atteint le diamètre de 27 mm à 20 jours, de 43 mm à 30 jours pour finir par atteindre la taille de la boîte de Pétri à environ 45 jours. L'apparition retardée du halo ne permet pas de dosage d'activité par la méthode des sucres réducteurs; en effet, nous ne pouvons pas faire d'incubations aussi longues. Par contre, nous avons réussi à observer un relargage du chromophore du bleu dextran en spectrophotométrie pour des cellules cultivées en milieu liquide M9.

Le contenu plasmidique de ce clone positif a été examiné par lyse directe en gel d'agarose. Le plasmide est très petit puisque l'on obtient une taille d'environ 4,9 kb (le pDR720 ayant une taille d'environ 4,1 kb). Donc, le fragment cloné dérivant du plasmide 40/16 aurait été réduit à une taille d'environ 0,8 kb.

7.4 Etude du plasmide.

Le plasmide hybride a été extrait et purifié par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Ensuite, nous avons effectué des digestions enzymatiques afin de connaître la taille du fragment et ses éventuels sites de restriction.

L'insert a en fait une taille de 0,7 kb. Le témoin de masse moléculaire utilisé dans cette zone est le DNA du phage Φ X174 digéré par *Hae*III. L'insert n'est pas coupé par les enzymes des sites de restriction se trouvant sur l'insert 40/16; c'est-à-dire *Eco*RI et *Hind*III. Par contre, à une extrémité de l'insert nous avons retrouvé un site

*Bam*HI. Pour essayer de situer de quelle partie de l'insert 40/16 notre insert provenait, nous avons refait une carte de restriction du plasmide 40/16 en essayant une grande quantité d'enzymes de restriction. Nous avons essayé les digestions du plasmide 40/16 par les enzymes suivants: *Ava*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Cla*I, *Eco*RV, *Nde*I, *Pvu*I, *Sac*I, *Sac*II, *Sma*I, *Xho*I. Seuls les enzymes *Ava*I, *Nde*I et *Xho*I coupent l'insert du plasmide 40/16. A l'aide de doubles digestions, nous avons pu placer les différents sites de coupure sur l'insert (cf figure 33).

Malheureusement, ces nouveaux sites de restriction du plasmide 40/16 ne coupent pas l'insert intégré sur le plasmide pDR720. Donc, notre insert de 0,7 kb provient soit du fragment *Nde*I-*Nde*I de 1,23 kb, soit du fragment de 1,25 kb à droite du site *Hind*III.

Actuellement, nous ne pouvons savoir si le fragment est sous le contrôle du promoteur tryptophane ou non car la bactérie n'est pas capable d'utiliser le dextran comme seule source de carbone. En effet, nous sommes obligés de compléter le milieu minimum de culture par 0,05 % de glycérol pour permettre la croissance. Evidemment, nous voyons que l'expression est toujours tardive mais qu'elle se fait à des niveaux beaucoup plus élevés; seulement ceci n'implique pas que nous soyons sous le contrôle du promoteur tryptophane car cette expression plus élevée est peut être due à un grand nombre de copies du plasmide pDR720 dans la souche.

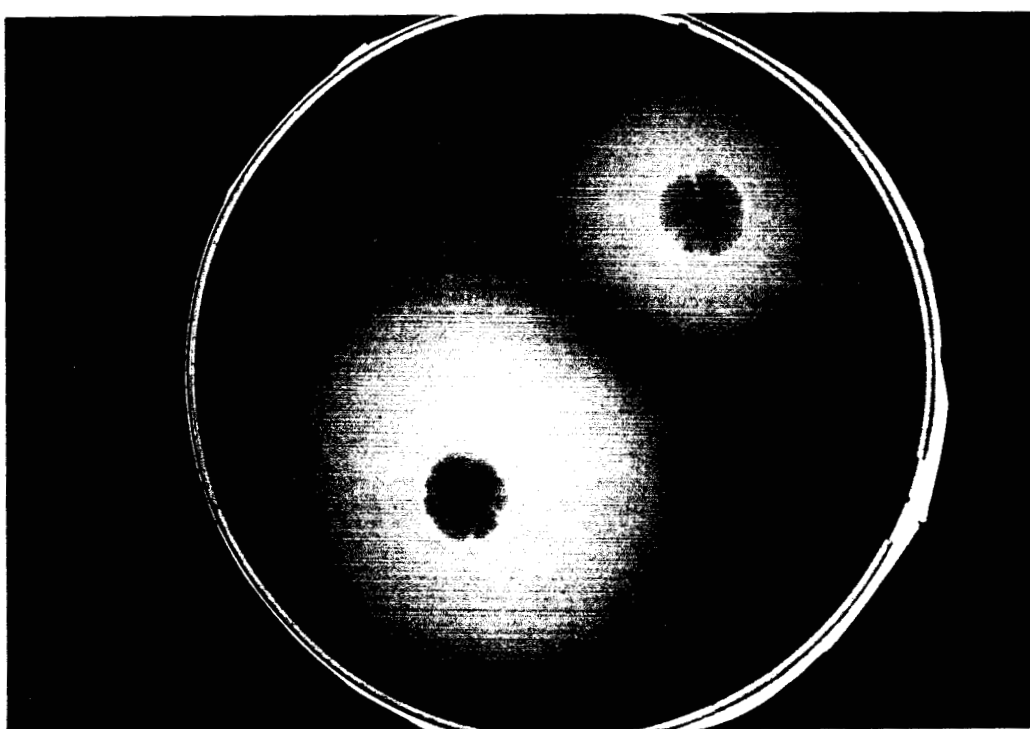
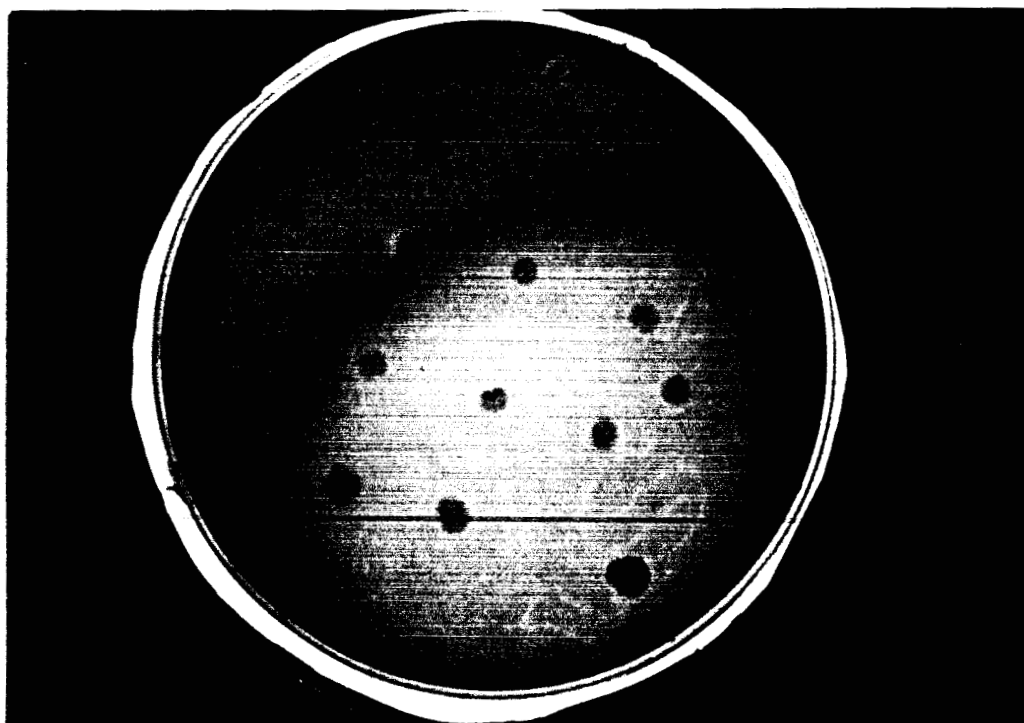


Figure 31: Zone de dégradation du clone *E. coli* C600 contenant le plasmide pDR720 portant l'insert de 0,7 kb.

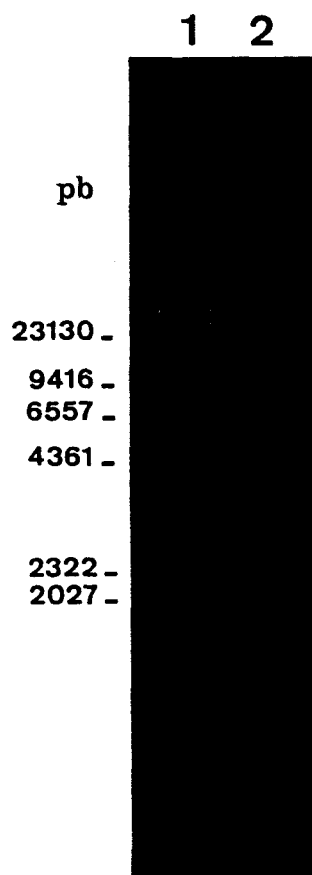


Figure 32: Profil de digestion partielle du fragment *Pst*I-*Sa*II de 4,6 kb du plasmide 40/16 digéré par *Sau*3AI.

1: DNA du phage λ digéré par *Hind*III.

2: Digestion partielle par *Sau*3AI.

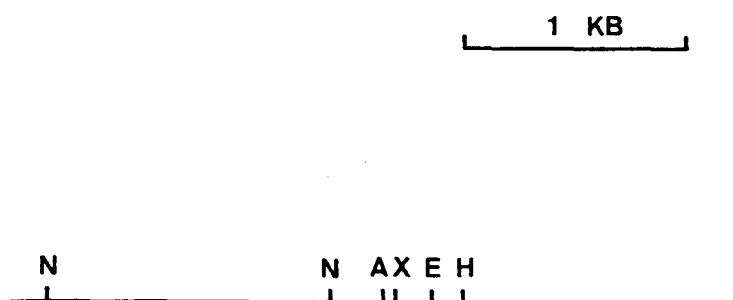


Figure 33: Carte de restriction détaillée de l'insert porté par le plasmide 40/16.

A: *Ava*I; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; N: *Nde*I; X: *Xho*I.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Jusqu'à présent, peu de gènes de *Bacteroides* impliqués dans les dégradations de polysaccharides ont été clonés. Il était donc intéressant d'étudier l'expression de certains de ces gènes chez *E. coli*. Les gènes choisis pour cette étude étaient ceux dont les produits interviennent dans la dégradation des dextrans. En ce qui concerne le genre *Bacteroides*, seules les dextranases de *B. oralis* ont été bien caractérisées et lorsque l'on s'adresse à tous les genres bactériens, on s'aperçoit que seule une activité dextranasique de *Streptococcus sobrinus* a été clonée (Barrett *et al.*, 1987).

Après analyse de notre collection de souches de *Bacteroides*, la souche intestinale de *B. thetaiotaomicron* 489 a été retenue. L'étude rapide de la localisation de l'activité dextranasique et des valeurs de pH optimum d'activité a montré la présence de 2 enzymes au minimum avec des localisations différentes. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus par Takahashi (1982) pour les dextranases de *B. oralis* ou par Staat et Schachtele (1976) pour *Capnocytophaga ochracea* (*B. ochraceus*). D'autre part, il a été montré par de nombreux auteurs que dans la plupart des dégradations de polysaccharides complexes, les souches de *Bacteroides* possèdent plusieurs enzymes permettant une hydrolyse plus rapide et plus aisée (ex: chondroïtine sulfate ou galactomannanes). D'ailleurs, pour une molécule de taille aussi importante que le dextran et qui ne peut donc pénétrer telle quelle dans la bactérie, on peut penser qu'un premier enzyme périplasmique hydrolyse le polymère en oligosaccharides; ceux-ci étant ensuite dégradés dans le cytoplasme par un second enzyme. Ce type de mécanisme a été proposé pour l'activité dextranasique de *B. oralis*.

Pour le clonage, il s'est avéré après de nombreux essais de plasmides vecteurs et de souches réceptrices que le couple bactérie *E. coli* HB101 / plasmide pBR322 était

le plus approprié car il fut le seul à nous donner des clones produisant des halos de dégradation sur bleu dextran. D'autre part, le rapport de ligature plasmide / DNA chromosomique est très important si l'on veut obtenir un nombre de clones suffisants pour avoir une représentation correcte du génome de la bactérie de départ. Dans ce cas, le rapport idéal a été de 1/5.

Après criblage et repiquages successifs, nous avons obtenu 10 clones produisant des zones de dégradation reproductibles. Chez ceux-ci, les taux d'expression sont très faibles et des dosages d'activités par libération de sucres réducteurs ont été impossibles. Par contre, de faibles dégradations ont été mises en évidence par HPLC et par dosage de la libération du chromophore de la molécule de bleu dextran. De plus, les clones obtenus sont capables de dégrader le substrat mais non d'utiliser les produits d'hydrolyse. D'autre part, les halos de dégradation apparaissent de manière retardée, ce qui laisse supposer que leur présence n'est possible qu'après lyse des cellules et relargage des composés intracellulaires. Il faut également remarquer que les halos de dégradation se sont aussi bien produits en aérobiose qu'en anaérobiose, ce qui montre que les parties catalytiques de l'enzyme ne semblent pas contenir de séquences d'acides aminés sensibles à l'oxygène.

Les plasmides portés par les 10 clones ont été extraits et leurs cartes de restriction effectuées. Les résultats montrent la présence d'un grand nombre d'inserts de DNA différents. Néanmoins, 2 plasmides sont identiques (le 40/16 et le 122/46) et nous avons pu détecter des homologies entre les plasmides 177/52 et 184/44 ainsi qu'entre les plasmides 148/42 et 277/31. Ces résultats semblent indiquer que la bactérie de départ possède plus de 2 enzymes intervenant dans la dégradation du dextran. Afin de savoir s'il n'existait pas d'autres fragments

semblables entre les inserts, des hybridations ont été effectuées avec des sondes radiomarquées car nous avons vu que la sensibilité de cette méthode est de beaucoup supérieure à celle utilisant les sondes biotinylées.

Ces hybridations nous ont amenés aux mêmes conclusions que les cartes de restriction sauf qu'il semble exister une homologie faible entre les plasmides 146/22 et 177/52; celle-ci devant être due à des séquences nucléotidiques communes se trouvant en dehors des sites de restriction.

Pour les plasmides 177/52 et 184/44 ainsi que 148/42 et 277/31, les inserts se trouvent situés sur le plasmide pBR322 dans les orientations inverses. Comme nous avons expression dans tous les cas, les inserts doivent porter leurs promoteurs propres de *Bacteroides*.

Pour chacun des 10 clones, l'expression de l'activité est très faible. C'est pourquoi nous avons sous-cloné un des inserts dans le plasmide d'expression pDR720. L'insert choisi est celui présent dans le clone 40/16 car il est le plus petit, il possède une carte de restriction simple et il est également présent dans le clone 122/46.

De ce sous-clonage, nous avons isolé un clone capable de produire un halo de dégradation sur bleu dextran. Comme dans le cas des 10 clones précédents, l'apparition de halo de dégradation sur bleu dextran autour des colonies n'apparaît qu'après un temps assez long. Par contre, cette fois-ci, la zone de dégradation ne se trouve plus seulement limitée aux alentours de la colonie puisqu'elle peut atteindre les dimensions de la boîte de Pétri. Cependant, l'apparition retardée du halo nous a empêché, ici aussi, d'effectuer des dosages de libération de sucres réducteurs. Par contre, une dégradation de la molécule de bleu dextran a été visualisée par la libération du chromophore.

Le plasmide contenu dans ce clone a été extrait et la taille de l'insert avoisine maintenant 0,7 kb. Cette petite taille laisse penser que, soit l'enzyme a une masse moléculaire faible et les 0,7 kb suffisent à coder pour la synthèse de la protéine, soit nous ne sommes en présence que d'une partie de la protéine nécessaire et suffisante à une activité dextranasique.

Malgré tout, l'expression des gènes n'est pas très forte. Dans un avenir proche, il serait intéressant de développer certaines voies de recherches.

Ainsi, comme les bactéries possédant le plasmide pDR720 ne peuvent utiliser le dextran comme seule source de carbone, il n'est pas possible de savoir pour le moment si l'insert de 0,7 kb est sous le contrôle ou non du promoteur tryptophane porté par ce plasmide en ajoutant du tryptophane dans le milieu minimum. Pour le savoir, le plasmide devra être coupé en double digestion par les enzymes de restriction *HindIII* et *Sall*, puis traité par la DNA-polymérase de Klenow et recircularisé par la T4 DNA-ligase avant d'être réintroduit par transformation dans la souche d'*E. coli* C600 *galK*⁻. Ainsi, ce plasmide portera toujours l'insert mais le promoteur tryptophane sera enlevé. Nous verrons donc si la présence de ce promoteur est indispensable ou non.

D'autre part, pour les 2 plasmides employés, nous obtenons des expressions faibles et l'activité ne semble être libérée qu'après lyse des cellules. De ce fait, il serait intéressant d'utiliser un vecteur de sécrétion comme le pEAP37. Ainsi, le plasmide pDR720 portant l'insert serait coupé par l'enzyme de restriction *EcoRI*, ce qui nous permettrait de récupérer un fragment contenant l'insert plus le promoteur tryptophane et de l'intégrer dans le site *EcoRI* du pEAP37. Ce système conduirait peut-être à la sécrétion des produits des gènes à l'extérieur des cellules.

Le fragment se trouvant actuellement sur le plasmide pDR720 étant de petite taille (0,7 kb), il serait intéressant de le séquencer afin de savoir s'il porte par exemple ses propres séquences promoteur. Celles-ci connues, il serait alors sûrement plus aisé d'essayer d'optimiser la production chez *E. coli* ou chez *Bacillus* sur lequel plusieurs études sont actuellement en cours. Utiliser une souche comme *Bacillus* nous permettrait peut-être d'envisager un jour une production industrielle de l'enzyme bien que le gène provienne d'une souche pathogène opportuniste.

Enfin, depuis que Whitehead et Hespell en 1990 ont réussi à faire exprimer des gènes de xylanase d'une bactérie du rumen comme *B. ruminicola* dans des bactéries du côlon comme *B. fragilis* et *B. uniformis*, il n'est pas insensé de penser que des gènes de *Bacteroides* intestinaux puissent s'exprimer chez d'autres espèces intestinales ou provenant du rumen. Au laboratoire, nous avons plusieurs vecteurs navettes capables de s'exprimer chez *E. coli* et *Bacteroides* (Pheulpin *et al.*, 1988). Ceci nous permettrait d'étudier l'expression des gènes codant pour l'activité dextranase dans des conditions où elle serait sensée s'exprimer mieux que chez *E. coli*. Malheureusement, la série de vecteurs navettes *E. coli/Bacteroides* du côlon ne peut être transférée que vers une seule souche: *B. distasonis* 419 qui fait partie des 10 souches capables de dégrader le dextran. Il sera donc nécessaire, avant tout transfert, de fabriquer un mutant dextranase- de cette souche.

BIBLIOGRAPHIE

Aldridge, K.E., and C.V. Sanders. 1987. Antibiotic- and method-dependent variation in susceptibility testing results of *Bacteroides fragilis* group isolates. J. Clin. Microbiol. 25:2317-2321.

Anderson, B.J., M.M. Bills, J.R. Egerton, and J.S. Mattick. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the structural subunit of *Bacteroides nodosus* fimbriae. J. Bacteriol. 160:748-754.

Anderson, K.L., and A.A. Salyers. 1989a. Biochemical evidence that starch breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* involves outer membrane starch-binding sites and periplasmic starch-degrading enzymes. J. Bacteriol. 171:3192-3198.

Anderson, K.L., and A.A. Salyers. 1989b. Genetic evidence that outer membrane binding of starch is required for starch utilisation by *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 171:3199-3204.

Antenucci, R.N., and J.K. Palmer. 1984. Enzymatic degradation of α - and β -cyclodextrins by *Bacteroides* of the human colon. J. Agric. Food Chem. 32:1316-1321.

Ashton, A.R., and G.M. Polya. 1978. The specific interaction of Cibacron and related dyes with cyclic nucleotide phosphodiesterase and lactate dehydrogenase. J. Biochem. 175:501-506.

Bailey, R.W., and R.T.J. Clarke. 1959. A bacterial dextranase. J. Biochem. 72:49-54.

Barrett, J.F., and R. Curtiss III. 1986. Renaturation of dextranase activity from culture supernatant fluids of *Streptococcus sobrinus* after sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 158:365-370.

Barrett, J.F., T.A. Barrett, and R. Curtiss III. 1987. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sobrinus* and cloning of the dextranase gene. Infect. Immun. 55:792-802.

Berg, J.O., L. Lindquist, and C.E. Nord. 1980. Purification of glycosides hydrolases from *Bacteroides fragilis*. Appl. Environ. Microbiol. 40:40-47.

Birkedal-Hansen, H., R.E. Taylor, J.J. Zambon, P.K. Barwa, and M.E. Neiders. 1988. Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res. 23:258-264.

Böhme, H.J., G. Kopperschläger, J. Schulz, and E. Hofmann. 1972. Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron Blue F3G-A. J. Chromat. 69:209-214.

Bokkenheuser, V.D., C.H.L. Shackleton, and J. Winter. 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. J. Biochem. 248:953-956.

Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Croso, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2:95-113.

Boulanger, M. 1923. Les fermentations, l'oeuvre industrielle de Pasteur. Conférence du 27 janvier 1923 à l'Université de Lille.

Boulos, S., and J.I. Rood. 1986. Molecular cloning of the fimbrial subunit gene from a benign type B isolate of *Bacteroides nodosus*. FEMS Microbiol. Lett. 33:73-78.

Bowman, J.P., L.I. Sly, and A.C. Hayward. 1988. *Pseudomonas mixta* sp. nov., a bacterium from soil with degradative activity on a variety of complex polysaccharides. System. Appl. Microbiol. 11:53-59.

Caspari, O., and J.M. Macy. 1983. The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. Arch. Microbiol. 135:16-24.

Ceska, M. 1971. The synthesis of cross-linked dextran and its enzymatic hydrolysis. Experientia 27:1263.

Chaiet, L., J. Kempf, R. Harman, E. Kaczka, R. Weston, K. Nollstadt, and F.J. Wolf. 1970. Isolation of a pure dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Microbiol. 20:421-426.

Collins, M.D., H.N. Shah, and T. Mitsuoka. 1985. Reclassification of *Bacteroides microfusus* (Kaneuchi and Mitsuoka) in a new genus *Rikenella*, as *Rikenella microfusus* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6:79-81.

Collins, M.D., and H.N. Shah. 1986a. Reclassification of *Bacteroides termitidis* Sebald (Holdeman and Moore) in a new genus *Sebaldella*, as *Sebaldella termitidis* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:349-350.

Collins, M.D., and H.N. Shah. 1986b. Reclassification of *Bacteroides praeacutus* Tissier (Holdeman and Moore) in a new genus *Tissierella*, as *Tissierella praeacuta* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:461-463.

Cotta, M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54:772-776.

Crosby, B., B. Collier, D.Y. Thomas, R.M. Teather, and J.D. Erfle. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of cellulase genes from *Bacteroides succinogenes*, p. 573-576. In S. Hasnain (ed.), Proc. 5th Can. Bioenergy R. and D. Semin. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., Barking, England.

Dhaese, P., H. De Greve, H. Decraemer, J. Schell, and M. Van Montagu. 1979. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Nucl. Acids Res. 7:1837-1849.

Dickinson, D.P., M.A. Kubiniec, F. Yoshimura, and R.J. Genco. 1988. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 170:1658-1665.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584-588.

Elleman, T.C., P.A. Hoyne, D.L. Emery, D.J. Stewart, and B.L. Clark. 1984. Isolation of the gene encoding pilin of *Bacteroides nodosus* (strain 198), the causal organism of ovine footrot. FEBS Lett. 173:103-107.

Elleman, T.C., P.A. Hoyne, D.L. Emery, D.J. Stewart, and B.L. Clark. 1986a. Expression of the pilin gene from *Bacteroides nodosus* in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 51:187-192.

Elleman, T.C., P.A. Hoyne, N.M. McKern, and D.J. Stewart. 1986b. Nucleotide sequence of the gene encoding the two-subunit pilin of *Bacteroides nodosus* 265. J. Bacteriol. 167:243-250.

Elleman, T.C., P.A. Hoyne, D.J. Stewart, N. McKern, and J.E. Peterson. 1986c. Expression of pili from *Bacteroides nodosus* in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 168:574-580.

Elleman, T.C., and D.A. Von Ahlefeldt. 1987. Nucleotide sequence of the pilin gene from *Bacteroides nodosus* strain 238 (serogroup G). Nucl. Acids Res. 15:7189.

Elleman, T.C., and D.J. Stewart. 1988. Efficacy against footrot of a *Bacteroides nodosus* 265 (serogroup H) pilus vaccine expressed in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 56:595-600.

- Erflle, J.D., R.M. Teather, P.J. Wood, and J.E. Irvin. 1988. Purification and properties of a 1,3-1,4- β -D-glucanase (lichenase, 1,3-1,4- β -D glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. J. Biochem. 255:833-841.
- Finney, K.G., T.C. Elleman, and D.J. Stewart. 1988. Nucleotide sequence of the pilin gene from *Bacteroides nodosus* 340 (serogroup D) and implications for the relatedness of serogroups. J. Gen. Microbiol. 134:575-584.
- Flint, H.J., and C.S. Stewart. 1987. Antibiotic resistance patterns and plasmids of ruminal strains of *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides multiacidus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:450-455.
- Forsberg, C.W., T.J. Beveridge, and A. Hellstrom. 1981. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. Appl. Environ. Microbiol. 42:886-896.
- Forsberg, C.W., and D. Groleau. 1982. Stability of the endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Bacteroides succinogenes*. Can. J. Microbiol. 28:144-148.
- Forsberg, C.W., B. Crosby, and D.Y. Thomas. 1986. Potential for manipulation of the rumen fermentation through the use of recombinant DNA techniques. J. Anim. Sci. 63:310-325.
- Fujimura, S., and T. Nakamura. 1989. Multiple forms of proteases of *Bacteroides gingivalis* and their cellular location. Oral Microbiol. Immunol. 4:227-229.
- Gherardini, F.C., M. Babcock, and A.A. Salyers. 1985. Purification and characterization of two α -galactosidases associated with catabolism of guar gum and other α -galactosides by *Bacteroides ovatus*. J. Bacteriol. 161:500-506.
- Gherardini, F.C., and A.A. Salyers. 1987a. Characterization of an outer membrane mannanase from *Bacteroides ovatus*. J. Bacteriol. 169:2031-2037.
- Gherardini, F.C., and A.A. Salyers. 1987b. Purification and characterization of a cell-associated, soluble mannanase from *Bacteroides ovatus*. J. Bacteriol. 169:2038-2043.
- Giulano, C., and A.W. Khan. 1985. Conversion of cellulose to sugars by resting cells of a mesophilic anaerobe, *Bacteroides cellulosolvens*. Biotechnol. Bioeng. 27:980-983.
- Gong, J., R.Y.C. Lo, and C.W. Forsberg. 1989. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cellodextrinase gene from *Bacteroides succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 55:132-136.

Goodman, H.J.K., J.R. Parker, J.A. Southern, and D.R. Woods. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from *Bacteroides fragilis*. Gene 58:265-271.

Gradel, C.M., and B.A. Dehority. 1972. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 23:332-340.

Groleau, D., and C.W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. Can. J. Microbiol. 27:517-530.

Groleau, D., and C.W. Forsberg. 1983. Partial characterization of the extracellular carboxymethyl cellulase activity produced by the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. Can. J. Microbiol. 29:504-517.

Guthrie, E.P., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a chondroitin lyase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 164:510-515.

Guthrie, E.P., and A.A. Salyers. 1986. Use of targeted insertional mutagenesis to determine whether chondroitin lyase II is essential for chondroitin sulfate utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 166:966-971.

Guthrie, E.P., and A.A. Salyers. 1987. Evidence that *Bacteroides thetaiotaomicron* chondroitin lyase II gene is adjacent to the chondro-4-sulfatase gene and may be part of the same operon. J. Bacteriol. 169:1192-1199.

Hattori, A., and K. Ishibashi. 1981a. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45:2347-2349.

Hattori, A., K. Ishibashi, and S. Minato. 1981b. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. Agric. Biol. Chem. 45:2409-2416.

Hayward, A.C., and L.I. Sly. 1976. Dextranase activity in *Oerskovia xanthineolytica*. J. Appl. Microbiol. 40:355-364.

Hiraoka, N., J. Fukumoto, and D. Tsuru. 1972. Studies of mold dextranases: III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. J. Biochem. 71:57-64.

Holbrook, W.P., and C. McMillan. 1977. The hydrolysis of dextran by Gram-negative non-sporing anaerobic bacilli. J. Appl. Bacteriol. 43:369-374.

- Holdeman, L.V., R.W. Kelley, and W.E.C. Moore. 1984. Family I. *Bacteroidaceae*. In: Bergey's Manual. Edited by N.R. Krieg, J.G. Holt, R.G.E. Murray, D.J. Brenner, M.P. Bryant, J.W. Moulder, N. Pfennig, P.H.A. Sneath, J.T. Staley. Williams and Wilkins. Baltimore/London pp. 602-662.
- Hoynes, P.A., T.C. Elleman, N.M. McKern, and D.J. Stewart. 1989. Sequence of pilin from *Bacteroides nodosus* 351 (serogroup H) and implications for serogroup classification. J. Gen. Microbiol. 135:1113-1122.
- Huang, L., and C.W. Forsberg. 1987. Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 53:1034-1041.
- Huang, L., and C.W. Forsberg. 1988a. Purification and comparison of the periplasmic and extracellular forms of the cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 54:1488-1493.
- Huang, L., C.W. Forsberg, and D.Y. Thomas. 1988b. Purification and characterization of a chloride-stimulated cellobiosidase from *Bacteroides succinogenes* S85. J. Bacteriol. 170:2923-2932.
- Hungate, R.E. 1985. Anaerobic transformations of organic matter. In: Bacteria in nature. Edited by E.R. Leadbetter and J.S. Poindexter. Plenum Publishing Corporation. Vol 1 pp.39-95.
- Irvin, J.E., and R.M. Teather. 1988. Cloning and expression of a *Bacteroides succinogenes* mixed-linkage β -glucanase (1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase) gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2672-2676.
- Ish-Horowicz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. Nucl. Acids Res. 9:2989-2998.
- Janson J.C., and J. Porath. 1966. A bacterial dextranase. Meth. Enzymol. 8:615-621.
- Jensen, N.S., and E. Canale-Parola. 1986. *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 52:880-887.
- Kato, C., T. Kobayashi, T. Kudo, and K. Horikoshi. 1986. Construction of an expression vector: extracellular production of *Aeromonas* xylanase and *Bacillus* cellulases by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 36:31-34.
- King, P.V., and R.W. Blakesley. 1986. Optimizing DNA ligations for transformation. Focus 8:1-3.

- Koenig, D.W., and D.F.Day. 1988a. Production of dextranase by *Lipomyces starkeyi*. Biotechnol. Lett. 10:117-122.
- Koenig, D.W., and D.F.Day. 1988b. Dextranase production by a derepressed mutant. Ann. N. Y. Acad. Sci. 542:111-114.
- Koenig, D.W., and D.F.Day. 1989a. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur. J. Biochem. 183:161-167.
- Koenig, D.W., and D.F.Day. 1989b. Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase. Appl. Environ. Microbiol. 55:2079-2081.
- Koh, T.Y., and B.T. Khouw. 1970. A rapid method for the assay of dextranase. Can. J. Biochem. 48:225-227.
- Kolenbrander, P.E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. Annu. Rev. Microbiol. 42:627-656.
- Kotarski, S.F., and A.A. Salyers. 1981. Effect of long generation times on growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* in carbohydrate-limited continuous culture. J. Bacteriol. 146:853-860.
- Kotarski, S.F., and A.A. Salyers. 1984. Isolation and characterization of outer membranes of *Bacteroides thetaiotaomicron* grown on different carbohydrates. J. Bacteriol. 158:102-109.
- Kotarski, S.F., J. Linz, D.M. Braun, and A.A. Salyers. 1985. Analysis of outer membrane proteins which are associated with growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* on chondroitin sulfate. J. Bacteriol. 163:1080-1086.
- La Fontaine, S., and J.I. Rood. 1990. Evidence that *Bacteroides nodosus* belongs in subgroup gamma of the class Proteobacteria, not in the genus *Bacteroides*: partial sequence analysis of a *B. nodosus* 16S rRNA gene. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:154-159.
- Lamed, R., J. Naimark, E. Morgenstern, and E.A. Bayer. 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. J. Bacteriol. 169:3792-3800.
- Leadbetter, E.R., S.C. Holt, and S.S. Socransky. 1979. *Capnocytophaga*: new genus of Gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. Arch. Microbiol. 122:9-16.
- Lee, J.M., and P.F. Fox. 1985. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. Enzyme Microb. Technol. 7:573-577.

- Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage Φ 1. *Virology* 1:190-206.
- Lin, K.W., J.A. Patterson, and M.R. Ladisch. 1985. Anaerobic fermentation: microbes from ruminants. *Enzyme Microb. Technol.* 7:98-107.
- Lindberg, B., and S. Svensson. 1968. Structural studies on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. *Acta Chem. Scand.* 22:1907-1912.
- Linder, L., C. Andersson, M.L. Sund, and G.D. Shockman. 1983. Protoplast formation and localization of enzymes in *Streptococcus mitis*. *Infect. Immun.* 40:1146-1154.
- Linn, S., T. Chan, L. Lipeski, and A.A. Salyers. 1983. Isolation and characterization of two chondroitin lyases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* 156:859-866.
- Lipeski, L., E.P. Guthrie, M. O'Brien, S.F. Kotarski, and A.A. Salyers. 1986. Comparison of proteins involved in chondroitin sulfate utilisation by three colonic *Bacteroides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:978-984.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Luria, S.E., and J.W. Burrous. 1957. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74:461-476.
- Macy, J.M., and I. Probst. 1979. The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. *Annu. Rev. Microbiol.* 33:561-594.
- Mäkinen, K.K., and I.K. Paunio. 1971. Exploitation of Blue Dextran as a dextranase substrate. *Anal. Biochem.* 39:202-207.
- Mayrand, D., G. Bourgeau, D. Grenier, and J.M. Lacroix. 1984. Properties of oral asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides*. *Can. J. Microbiol.* 30:1133-1136.
- Mayrand, D., and S.C. Holt. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52:134-152.
- McCarthy, R.E., S.F. Kotarski, and A.A. Salyers. 1985. Location and characteristics of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* 161:493-499.

McCarthy, R.E., and A.A. Salyers. 1986. Evidence that polygalacturonic acid may not be a major source of carbon and energy for some colonic *Bacteroides* species. Appl. Environ. Microbiol. 52:9-16.

McCarthy, R.E., M. Pajean, and A.A. Salyers. 1988. Role of starch as a substrate for *Bacteroides vulgatus* growing in the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 54:1911-1916.

McGavin, M., and C.W. Forsberg. 1988. Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* S85. J. Bacteriol. 170:2914-2922.

McKenzie, C.R., and G.B. Patel. 1986. Cellodextrin utilisation and β -glucosidase production by *Bacteroides polypragmatus*. Arch. Microbiol. 145:91-96.

Mencier, F. 1972. Méthode simple et rapide de mise en évidence des microorganismes producteurs de dextranase. Ann. Inst. Pasteur. 122:153-157.

Montgomery, L., B. Flesher, and D. Stahl. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:430-435.

Mooser, G., and K.R. Iwaoka. 1989. Sucrose 6- α -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: characterization of a glucosyl-enzyme complex. Biochemistry 28:443-449.

Moses, E.K., J.I. Rood, W.K. Yong, and G.G. Riffkin. 1989. Molecular analysis of one of multiple protease-encoding genes from the prototype virulent strain of *Bacteroides nodosus*. Gene 77:219-228.

Murray, W.D., L.C. Sowden, and J.R. Colvin. 1984. *Bacteroides cellulosolvens* sp. nov., a cellulolytic species from sewage sludge. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:185-187.

Murray, W.D. 1986a. Symbiotic relationship of *Bacteroides cellulosolvens* and *Clostridium saccharolyticum* in cellulose fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 51:710-714.

Murray, W.D., L.C. Sowden, and J.R. Colvin. 1986b. Localization of the cellulase activity of *Bacteroides cellulosolvens*. Lett. Appl. Microbiol. 3:69-72.

Murray, W.D. 1987. Effects of cellobiose and glucose on cellulose hydrolysis by both growing and resting cells of *Bacteroides cellulosolvens*. Biotechnol. Bioeng. 29:1151-1154.

Naito, Y., and R.J. Gibbons. 1988. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. J. Dent. Res. 67:1075-1080.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380.

Nichols, B.P., and C. Yanofsky. 1983. Plasmids containing the *trp* promoters of *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* and their use in expressing cloned genes. Meth. Enzymol. 101:155-164.

Okada, G., T. Takayanagi, and T. Sawai. 1988a. Improved purification and further characterization of an isomalto-dextranase from *Arthrobacter globiformis* T6. Agric. Biol. Chem. 52:495-501.

Okada, G., T. Takayanagi, S. Miyahara, and T. Sawai. 1988b. An isomalto-dextranase accompanied by isopullulanase activity from *Arthrobacter globiformis* T6. Agric. Biol. Chem. 52:829-836.

Okada, G., T. Unno, and T. Sawai. 1988c. A simple purification procedure for and further characterization of a glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* I42. Agric. Biol. Chem. 52:2169-2176.

Okada, G., and T. Unno. 1989. A glucodextranase accompanied by glucoamylase activity from *Arthrobacter globiformis* I42. Agric. Biol. Chem. 53:223-228.

Okuda, K., T. Kato, J. Shiozu, I. Takazoe, and T. Nakamura. 1985. *Bacteroides heparinolyticus* sp. nov. isolated from humans with periodontitis. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:438-442.

Osborne, J.M., and B.A. Dehority. 1989. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55:2247-2250.

Otsuka, M., J. Endo, D. Hinode, A. Nagata, R. Maehara, M. Sato, and R. Nakamura. 1987. Isolation and characterization of protease from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res. 22:491-498.

Paster, B.J., W. Ludwig, W.G. Weisburg, E. Stackebrandt, R.B. Hespell, C.M. Hahn, H. Reichenbach, K.O. Stetter, and C.R. Woese. 1985. A phylogenetic grouping of the *Bacteroides*, *Cytophagas*, and certain *Flavobacteria*. System. Appl. Microbiol. 6:34-42.

Patel, G.B. 1983. Fermentation of lactose by *Bacteroides polypragmatus*. Can. J. Microbiol. 29:120-128.

Patel, G.B., C.R. McKenzie, and B.J. Agnew. 1985. Properties and potential advantages of β -galactosidase from *Bacteroides polypragmatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:114-120.

Patterson, J.A. 1989. Prospects for establishment of genetically engineered microorganisms in the rumen. Enzyme Microb. Technol. 11:187-1189.

Pheulpin, P., Y. Tierny, M. Béchet, and J.B. Guillaume. 1988. Construction of new shuttle plasmid vectors for *Escherichia coli* - *Bacteroides* transgeneric cloning. FEMS Microbiol. Lett. 55:15-22.

Pühler, A., W. Arnold, D. Horn, B. Jäckel, U. Priefer, R. Simon, and G. Weber. 1982. Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *Rhizobium meliloti* nif genes. In Proceedings of the 8th North America Rhizobium Conference. pp 90-114. University of Manitoba Press, Winnipeg.

Rao, R.N., and S.G. Rogers. 1979. Plasmid pKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments. Gene 7:79-82.

Richards, G.N., and M. Streamer. 1972. Studies of dextranases: I. Isolation of extracellular bacterial dextranases. Carbohydr. Res. 25:323-332.

Russell, D.R., and G.N. Bennett. 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *Escherichia coli* promoters hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene 20:231-243.

Russell, J.B., and D.B. Wilson. 1988. Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. J. Nutr. 118:271-279.

Russo, T.A., J.S Thompson, V.G. Godoy, and M.H. Malamy. 1990. Cloning and expression of the *Bacteroides fragilis* TAL2480 neuraminidase gene, *nanH*, in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:2594-2600.

Sabatie, J., L. Choplin, J.L. Doublier, J. Arul, F. Paul, and P. Monsan. 1988. Rheology of native dextrans in relation to their primary structure. Carb. Polym. 9:287-299.

Salyers, A.A., J.K. Palmer, and T.D. Wilkins. 1977. Laminarase (β -glucanase) activity in *Bacteroides* from the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 33:1118-1124.

Salyers, A.A., and M. O'Brien. 1980a. Cellular location of enzymes involved in chondroitin sulfate breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 143:772-780.

Salyers, A.A., and S.F. Kotarski. 1980b. Induction of chondroitin sulfate lyase activity in *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 143:781-788.

Salyers, A.A., R. Arthur, and A. Kuritza. 1981. Digestion of larch arabinogalactan by a strain of human colonic *Bacteroides* growing in continuous culture. J. Agric. Food Chem. 29:475-480.

Salyers, A.A., M. O'Brien, and S.F. Kotarski. 1982. Utilization of chondroitin sulfate by *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in carbohydrate-limited continuous culture. J. Bacteriol. 150:1008-1015.

Salyers, A.A., M. O'Brien, and S.F. Kotarski. 1983. Galactosamine inhibition of protein synthesis in *Bacteroides thetaiotaomicron*. Can. J. Microbiol. 29:1532-1538.

Salyers, A.A. 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. Annu. Rev. Microbiol. 38:293-313.

Salyers, A.A., N.B. Shoemaker, and E.P. Guthrie. 1987. Recent advances in *Bacteroides* genetics. CRC Crit. Rev. Microbiol. 14:49-70.

Salyers, A.A., and E.P. Guthrie. 1988a. A deletion in the chromosome of *Bacteroides thetaiotaomicron* that abolishes production of chondroitinase II does not affect survival of the organism in gastrointestinal tracts of exgermfree mice. Appl. Environ. Microbiol. 54:1964-1969.

Salyers, A.A., M. Pajean, and R.E. McCarthy. 1988b. Importance of mucopolysaccharides as substrates for *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in intestinal tracts of exgermfree mice. Appl. Environ. Microbiol. 54:1970-1976.

Salyers, A.A., and M. Pajean. 1989. Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. Appl. Environ. Microbiol. 55:2572-2578.

Schachtele, C.F., R.H. Staat, and S.K. Harlander. 1975. Dextranases from oral bacteria: inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surfaces by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12:309-317.

Schellhorn, H.E., and C.W. Forsberg. 1984. Multiplicity of extracellular β -(1,4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. Can. J. Microbiol. 30:930-937.

Scholten-Koerselman, I., F. Houwaard, P. Janssen, and A.J.B. Zehnder. 1986. *Bacteroides xylanolyticus* sp. nov., a xylanolytic bacterium from methane producing cattle manure. *Antonie van Leeuwenhoek*. 52:543-554.

Sery, T.W., and E.J. Hehre. 1956. Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria. *J. Bacteriol.* 71:373-380.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1981. *Bacteroides buccalis*, sp. nov., *Bacteroides denticola*, sp. nov., *Bacteroides pentosaceus*, sp. nov., new species of the genus *Bacteroides* from the oral cavity. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung. Originalarbeiten*. C2: 235-241.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1982a. Reclassification of *Bacteroides hypermegas* (Harrisson and Hansen) in a new genus *Megamonas*, as *Megamonas hypermegas* comb. nov. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung. Originalarbeiten*. C3:394-399.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1982b. Reclassification of *Bacteroides multiacidus* (Mitsuoka, Terada, Watanabe and Uchida) in a new genus *Mitsuokella*, as *Mitsuokella multiacidus* comb. nov. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung. Originalarbeiten*. C3:491-494.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1986. Reclassification of *Bacteroides furcosus* Veillon and Zuber (Hauduroy, Ehringer, Urbain, Guillot and Magron) in a new genus *Anaerorhabdus*, as *Anaerorhabdus furcosus* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 8:86-88.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1988. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:128-131.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1989. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:85-87.

Shah, H.N., and M.D. Collins. 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:205-208.

Sipat, A., K.A. Taylor, R.Y.C. Lo, C.W. Forsberg, and P.J. Krell. 1987. Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:477-481.

Smith, K.A., and A.A. Salyers. 1989. Cell-associated pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: cloning, characterization, and insertional mutagenesis to determine role in pullulan utilisation. J. Bacteriol. 171:2116-2123.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

Southern, J.A., J.R. Parker, and D.R. Woods. 1986. Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. J. Gen. Microbiol. 132:2827-2835.

Southern, J.A., J.R. Parker, and D.R. Woods. 1987. Novel structure, properties and inactivation of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. J. Gen. Microbiol. 133:2437-3446.

Staat, R.H., T.H. Gawronski, and C.F. Schachtele. 1973. Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. Infect. Immun. 8:1009-1016.

Staat, R.H., and C.F. Schachtele. 1974. Evaluation of dextranase production by the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 9:467-469.

Staat, R.H., and C.F. Schachtele. 1976. Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of *Bacteroides ochraceus*. J. Dent. Res. 55:1103-1110.

Stackebrandt, E., and H. Hippe. 1986. Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov., nom. rev. as *Ruminobacter amylophilus* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 8:204-207.

Stewart, C.S., and H.J. Flint. 1989. *Bacteroides* (*Fibrobacter*) *succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:433-439.

Stringer, C.S., and H.M. Tsuchiya. 1958. A kinetic study of dextranase. J. Amer. Chem. Soc. 80:6620-6625.

Strobel, H.J., and J.B. Russell. 1987. Regulation of β -glucosidase in *Bacteroides ruminicola* by a different mechanism: growth rate-dependent derepression. Appl. Environ. Microbiol. 53:2505-2510.

Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranases from *Bacteroides oralis* Ig4a. Microbiol. Immunol. 26:375-386.

Takahashi, N., Y. Satoh, and K. Takamori. 1985. Subcellular localization of D-glucanases in *Bacteroides oralis* Ig4a. J. Gen. Microbiol. 131:1077-1082.

Takayanagi, T., G. Okada, and S. Chiba. 1987. Quantitative study of the anomeric forms of isomaltose and glucose produced by isomalto-dextranase and glucodextranase. Agric. Biol. Chem. 51:2337-2341.

Taylor, K.A., B. Crosby, M. McGavin, C.W. Forsberg, and D.Y. Thomas. 1987. Characteristics of the endoglucanase encoded by a *cel* gene from *Bacteroides succinogenes* expressed in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 53:41-46.

Tsuchiya, H.M., A. Jeanes, H.M. Bricker, and C.A. Wilham. 1952. Dextran-degrading enzymes from molds. J. Bacteriol. 64:513-519.

Van Steenberg, T.J.M. and J. de Graaff. 1986. Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. FEMS Microbiol. Lett. 33:219-222.

Van Winkelhoff, A.J., T.J.M. Van Steenberg, N. Kippuw, and J. De Graaff. 1985. Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. J. Clin. Microbiol. 22:75-79.

Van Winkelhoff, A.J., T.J.M. Van Steenberg, and J. De Graaff. 1986. Oxygen tolerance of oral and non-oral black-pigmented *Bacteroides* species. FEMS Microbiol. Lett. 33:215-218.

Van Winkelhoff, A.J., T.J.M. Van Steenberg, and J. De Graaff. 1988. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J. Clin. Periodont. 15:145-155.

Walker, G.J. 1972. Some properties of a dextranoglucosidase isolated from streptococci and its use in studies on dextran synthesis. J. Dent. Res. 51:409-414.

Walker, G.J., A. Pulkownik, and J.G. Morrey-Jones. 1981. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. J. Gen. Microbiol. 127:201-208.

Watabe, J., Y. Benno, and T. Mitsuoka. 1983. Taxonomic study of *Bacteroides oralis* and related organisms and proposal of *Bacteroides veroralis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:57-64.

Webb, E., and I. Spencer-Martins. 1983. Extracellular endodextranase from the yeast *Lipomyces starkeyi*. Can. J. Microbiol. 29:1092-1095.

Weisburg, W.G., Y. Oyaizu, H. Oyaizu, and C.R. Woese. 1985. Natural relationship between *Bacteroides* and *Flavobacteria*. J. Bacteriol. 164:230-236.

Whitehead, T.R., and R.B. Hespell. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a xylanase gene from *Bacteroides ruminicola* 23. Appl. Environ. Microbiol. 55:893-896.

Whitehead, T.R., and R.B. Hespell. 1990a. Heterologous expression of the *Bacteroides ruminicola* xylanase gene in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis*. FEMS Microbiol. Lett. 66:61-66.

Whitehead, T.R., and R.B. Hespell. 1990b. The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. J. Bacteriol. 172:2408-2412.

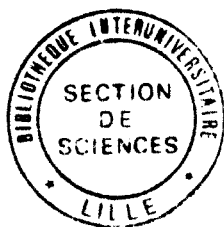
Willemot, R.M., P. Monsan, and G. Durand. 1988. Effects of dextran on the activity of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 542:169-172.

Williams, A.G., and S.E. Witters. 1985. Formation of polysaccharide depolymerase and glycoside hydrolase enzymes by *Bacteroides ruminicola* subsp. *ruminicola* grown in batch and continuous culture. Curr. Microbiol. 12:79-84.

Wojciechowicz, M. 1971. Partial purification of pectinolytic enzymes of *Bacteroides ruminicola* isolated from the rumen of a sheep. Acta Microbiol. Polon. 3:45-55.

Wojciechowicz, M. 1972. Comparison of the action of *Bacteroides ruminicola* polygalacturonic lyase and of pectinase on lower oligogalacturonides. Acta Microbiol. Polon. 4:189-196.

Woods, J.R., J.F. Hudman, and K. Gregg. 1989. Isolation of an endoglucanase gene from *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis*. J. Gen. Microbiol. 135:2543-2549.



RESUME

Des gènes de la souche *Bacteroides thetaiotaomicron* 489 impliqués dans la dégradation du dextran ont été clonés chez *E. coli*. Après criblage d'une banque génomique dans le vecteur plasmidique pBR322 et repiquage de 16000 transformants de la souche *E. coli* HB101, 43 clones produisant des zones de dégradation ont été mis en évidence sur milieu riche contenant du bleu dextran T2000. Après de multiples repiquages, 10 clones se sont révélés être stables et donner des halos de dégradation reproductibles. L'étude de ces 10 plasmides a été entreprise et les cartes de restriction ont été établies. Les inserts portés par les différents plasmides ont des tailles comprises entre 3,2 et 8,4 kb et 2 des inserts sont identiques. Des expériences d'hybridation insert/DNA chromosomique de *Bacteroides* et insert/insert ont été réalisées et les résultats montrent certaines homologies entre différents inserts. L'expression de l'activité dextranasique est faible chez *E. coli* en utilisant le pBR322.

Nous avons donc réalisé le sous-clonage du plus petit insert (3,2 kb) dans le plasmide d'expression pDR720 (qui porte le promoteur de l'opéron tryptophane) et 1 clone positif a été isolé. La taille de l'insert a ainsi été réduite à 0,7 kb. Le niveau d'expression des gènes a été augmenté mais la dégradation du dextran se fait suivant un phénomène retardé. Ces résultats semblent indiquer que les enzymes sont intracellulaires et ne sont repérés qu'après lyse des cellules. Le séquençage ultérieur de l'insert sous-cloné devrait permettre d'optimiser la production de l'enzyme correspondant dans une souche d'intérêt industriel.

