

50376
1992
49

61429

50376
1992
49

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

de

DOCTORAT D'UNIVERSITE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

YANN TIERNY

CLONAGE ET EXPRESSION CHEZ *Escherichia coli*
DE GENES DE *Bacteroides thetaiotaomicron*
IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DES PECTINES



Soutenue le Janvier 1992 devant la commission d'examen:

Président:

Professeur J.-B. GUILLAUME

Rapporteurs:

Professeur S. BALL,

Dr. Y. DUVAL (Directeur de Recherches INRA)

Examineurs:

Professeur H.-C. DUBOURGUIER,

Dr. H.J. FLINT

N° d'ordre : 852



J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur J.-B. GUILLAUME qui m'a initié aux Bacteroides et m'a permis d'effectuer mes travaux de recherches au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Je tiens également à remercier:

Monsieur le Professeur S. BALL, avec lequel je collabore pour l'enseignement pratique de génie génétique et qui a accepté d'être rapporteur de mes travaux pour la soutenance de ma thèse,

Madame le Docteur Y. DUVAL, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique et spécialiste des interactions microbiennes dans le tube digestif, qui a également accepté d'être rapporteur,

Monsieur le Docteur H.J. FLINT, du Rowett Research Institute d'Aberdeen, et spécialiste de la génétique des Bacteroidaceae, qui a toujours manifesté de l'intérêt pour nos travaux et avec lequel notre Laboratoire a établi une collaboration fructueuse,

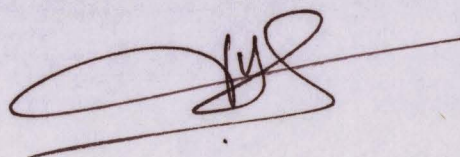
Monsieur le Professeur H.C.DUBOURGUIER, microbiologiste, qui a pris le relais de Monsieur Guillaume et s'attache à développer l'étude des interactions microbiennes.

Je réserve à Monsieur M. BECHET une mention particulière car il m'a toujours encouragé avec beaucoup de patience, de gentillesse et de compétence. Qu'il soit aussi remercié pour l'aide et les conseils judicieux qu'il m'a apportés.

Messieurs J.-C. JONCQUIERT et P. PHEULPIN ont aussi été les pionniers dans des domaines parallèles. Avec eux, j'ai travaillé dans une ambiance sympathique. Mon cordial souvenir à tous les deux.

Bien sûr, depuis mon arrivée au Laboratoire, j'ai appris beaucoup et j'ai toujours profité des échanges de vues au travers de discussions informelles avec tous ceux du Laboratoire. Mes remerciements à tous.

*Je dédie ce manuscrit à mes parents.
Vous m'avez permis d'effectuer mes études
dans les meilleures conditions,
et vous m'avez toujours apporté votre soutien.*

A handwritten signature in dark ink, consisting of a large, stylized initial 'S' followed by a smaller, more complex set of initials, all underlined with a single horizontal stroke.

I/ INTRODUCTION

1 - <u>PRESENTATION DU GENRE BACTEROIDES</u>	1
1.1 - <u>Le genre Bacteroides</u>	1
1.2 - <u>Caractères bactériologiques de l'espèce <i>thetaitotaomicron</i></u>	1
2 - <u>BACTERIES PROCHES DU GENRE BACTEROIDES</u>	8
3 - <u>LOCALISATION ET ABONDANCE DU GENRE BACTEROIDES</u>	9
3.1 - CHEZ L'HOMME.....	9
3.1.1 - <u>Bacteroides de la cavité buccale</u>	9
3.1.2 - <u>Bacteroides du tube digestif</u>	10
3.2 - CHEZ LES RUMINANTS.....	10
3.3 - AUTRES HABITATS.....	11
4 - <u>PATHOGENICITE DU GENRE BACTEROIDES</u>	12
4.1 - GENERALITES.....	12
4.2 - CHEZ L'HOMME.....	12
4.2.1 - <u>Cavité buccale</u>	12
4.2.2 - <u>Cavité abdominale</u>	13
4.2.3 - <u>Cavité pelvienne</u>	14
4.3 - CHEZ L'ANIMAL.....	14
5 - <u>ANTIBIORESISTANCE</u>	15
5.1 - ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE DES CONSTITUANTS DE LA PAROI BACTERIENNE.....	15
5.2 - ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE PROTEIQUE.....	16
5.2.1 - <u>Résistance aux aminoglycosides</u>	16
5.2.2 - <u>Résistance au chloramphénicol</u>	16
5.2.3 - <u>Résistance à la tétracycline</u>	16
5.2.4 - <u>Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines</u>	17
5.3 - APPARITION DE SOUCHES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES....	17
6 - <u>METABOLISME</u>	18
6.1 - BESOINS NUTRITIONNELS DE BASE.....	18

6.1.1 - <u>Besoins en CO₂</u>	18
6.1.2 - <u>Besoins en azote</u>	18
6.1.3 - <u>Besoins en facteurs de croissance</u>	19
6.2 - METABOLISME DES MONOSACCHARIDES.....	19
6.2.1 - <u>Métabolisme du glucose</u>	19
6.2.1.1 - Voie conduisant au succinate.....	20
6.2.1.2 - Autres voies de fermentation.....	20
6.2.1.3 - Composition et nature des acides gras volatils issus de la fermentation.....	21
6.2.2 - <u>Souches de Bacteroides ne fermentant pas le glucose</u>	21
6.3 - COMPOSES MUTAGENES OU CANCEROGENES ISSUS DU CATABOLISME DE CERTAINES SUBSTANCES.....	21
7 - <u>DEGRADATION DES POLYSACCHARIDES</u>	22
7.1 - TYPES DE RAPPORTS HÔTE/MICRO-ORGANISME.....	22
7.1.1 - <u>Modèle compétitif</u>	22
7.1.2 - <u>Modèle coopératif</u>	23
7.1.2.1 - Relations de synergisme dans le rumen.....	24
7.1.3 - <u>Modèle mixte ou combiné</u>	25
7.2 - NATURE DES POLYSACCHARIDES UTILISES PAR LES BACTEROIDES DU CÔLON ET ENZYMES IMPLIQUEES DANS CES DEGRADATIONS.....	25
7.2.1 - <u>Présentation</u>	25
7.2.2 - <u>Polysaccharides cytoplasmiques</u>	26
7.2.2.1 - Amidon.....	26
7.2.2.2 - Cyclodextrines.....	27
7.2.3 - <u>Polysaccharides pariétaux</u>	28
7.2.3.1 - Hémicellulose.....	28
7.2.3.2 - Galactomannanes.....	29
7.2.3.3 - Laminarine.....	29
7.2.3.4 - Pectines.....	30
7.2.4 - <u>Mucopolysaccharides</u>	30
7.2.4.1 - Chondroïtine-sulfate.....	32
A - Activités chondroïtine lyases de <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	32
B - Activités chondroïtines lyases présentes chez d'autres espèces de <i>Bacteroides</i>	33
7.2.4.2 - Acide hyaluronique.....	33
7.2.5 - <u>Autres polysaccharides</u>	34

7.2.5.1 - Dextrans.....	34
7.3 - PROBLEMES LIES A LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA PLUPART DES POLYSACCHARIDASES DE <i>BACTEROIDES</i>	34
8 - <u>LES PECTINES</u>	36
8.1 - DEFINITION ET LOCALISATION.....	36
8.2 - STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE DES PECTINES.....	37
8.3 - PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES PECTINES.....	37
8.4 - UTILISATION DES PECTINES DANS LE DOMAINE INDUSTRIEL.....	41
8.5 - ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES PECTINES.....	41
9 - <u>LES ENZYMES PECTINOLYTIQUES</u>	42
9.1 - PRESENTATION.....	42
9.2 - CLASSIFICATION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES.....	43
9.2.1 - <u>Les pectine méthylestérases</u>	43
9.2.1.1 - Caractéristiques.....	45
9.2.1.2 - Mode d'action.....	45
9.2.1.3 - Pectine méthylestérases de <i>Bacteroides</i>	46
9.2.2 - <u>Les polygalacturonases</u>	46
9.2.2.1 - Présentation.....	46
9.2.2.2 - Les endo-polygalacturonases.....	47
9.2.2.3 - Les exo-polygalacturonases.....	48
9.2.2.4 - Polygalacturonases de <i>Bacteroides</i>	48
9.2.3 - <u>Les lyases</u>	49
9.2.3.1 - Mécanisme d'action.....	49
9.2.3.2 - Présentation.....	49
9.2.3.3 - Les endo-pectate lyases.....	50
9.2.3.4 - Les exopectate lyases.....	51
9.2.3.5 - Les pectine lyases.....	51
9.2.3.6 - Les oligogalacturonate lyases.....	52
9.2.3.7 - Activités lyases présentes chez <i>Bacteroides</i>	52
A - Activités endopectate lyases.....	52
B - Activités exopectate lyases.....	53
9.3 - APPLICATIONS INDUSTRIELLES.....	53
9.3.1 - <u>Extraction des jus de fruits</u>	53
9.3.2 - <u>Clarification ou stabilisation des jus de fruits</u> ..	55
9.3.3 - <u>Défécation du cidre de haute qualité</u>	55
9.3.4 - <u>Liquéfaction et macération</u>	55
9.3.5 - <u>Rouissage du lin</u>	55

10 - <u>CLONAGE DE GENES DONT LES PRODUITS SONT IMPLIQUES DANS LE CATABOLISME DES PECTINES</u>	56
10.1 - <u>LE MODELE ERWINIA</u>	56
10.1.1 - <u>Présentation du genre</u>	56
10.1.2 - <u>Voie de dégradation des pectines et du galacturonate chez <i>Erwinia chrysanthemi</i></u>	57
10.1.3 - <u>Système de régulation des enzymes impliquées dans l'utilisation des pectines</u>	58
10.1.4 - <u>Organisation des gènes responsables de l'utilisation des pectines chez <i>E. chrysanthemi</i></u>	59
10.1.5 - <u>Clonage chez <i>Escherichia coli</i> et séquençage de gènes codant pour des pectinases d' <i>Erwinia</i></u>	60
10.1.5.1 - <u>Clonage</u>	60
10.1.5.2 - <u>Séquençage</u>	64
10.2 - <u>CLONAGE DES PECTINASES APPARTENANT A D'AUTRES GENRES BACTERIENS</u>	66
10.2.1 - <u>Pectate lyase de <i>Cellvibrio mixtus</i></u>	66
10.2.2 - <u>Pectate lyase de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i></u>	68
10.2.3 - <u>Pectate lyase de <i>Pseudomonas fluorescens</i></u>	68
10.2.4 - <u>Pectinestérase de <i>Pseudomonas solanacearum</i></u>	69
10.2.5 - <u>Endopolygalacturonase de <i>P. solanacearum</i></u>	70
10.3 - <u>CONCLUSION</u>	70
11 - <u>GENES DE BACTEROIDES CLONES CHEZ <i>E. COLI</i></u>	71
11.1 - <u>CLONAGE DE GENES DE BACTEROIDES IMPLIQUES DANS CERTAINES FONCTIONS METABOLIQUES ET PATHOLOGIQUES</u>	71
11.1.1 - <u>Sous-unités de pilines de <i>Bacteroides</i></u>	71
11.1.1.1 - <u>Sous-unité de la piline de <i>Dichelobacter nodosus</i></u>	71
11.1.1.2 - <u>Sous-unité de la piline de <i>Porphyromonas gingivalis</i></u>	73
11.1.2 - <u>Protéine membranaire de <i>P. gingivalis</i></u>	73
11.1.3 - <u>Protéase de <i>D. nodosus</i></u>	73
11.1.4 - <u>Glutamine synthétase de <i>Bacteroides fragilis</i></u>	75
11.1.5 - <u>Gène <i>recA</i>-like de <i>B. fragilis</i></u>	75
11.1.6 - <u>β-lactamase de <i>B. fragilis</i></u>	76

11.1.7 - <u>Eléments conjugatifs impliqués dans le transfert des gènes de résistances à l'érythromycine et à la tétracycline de <i>B. thetaiotaomicron</i></u>	76
11.1.8 - <u>Invertase de <i>B. fragilis</i></u>	77
11.2 - CLONAGE DE GENES CODANT POUR DES POLYSACCHARIDASES DE <i>BACTEROIDES</i> CHEZ <i>E. COLI</i>	77
11.2.1 - Cellulases de <i>Fibrobacter succinogenes</i> et de <i>Prevotella ruminicola</i>	77
11.2.1.1 - Cellulases de <i>F. succinogenes</i>	77
11.2.1.2 - Endoglucanases de <i>P. ruminicola</i>	80
11.2.2 - <u>Xylanases de <i>Bacteroides ovatus</i>, <i>F. succinogenes</i> et <i>P. ruminicola</i></u>	80
11.2.2.1 - Xylanases de <i>B. ovatus</i>	80
11.2.2.2 - Xylanase de <i>P. ruminicola</i> 23.....	80
11.2.2.3 - Xylanase de <i>P. ruminicola</i> D31d.....	81
11.2.2.3 - Xylanase de <i>F. succinogenes</i>	81
11.2.3 - <u>Pullulanase de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i></u>	82
11.2.4 - <u>Dextranase de <i>B. thetaiotaomicron</i></u>	82
11.3 - CLONAGE DE GENES CODANT POUR DES MUCOPOLYSACCHARIDASES DE <i>BACTEROIDES</i> CHEZ <i>E. COLI</i>	83
11.3.1 - <u>Chondroïtine lyase II de <i>B. thetaiotaomicron</i></u>	83
11.3.2 - <u>Neuraminidase de <i>B. fragilis</i></u>	83
11.4 - CONCLUSION.....	84

II/ MATERIELS ET METHODES

1 - <u>SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES</u>	85
1.1 - <i>E. COLI</i>	85
1.1.1 - <u>Souche HB101</u>	85
1.1.2 - <u>Souche C600 GalK⁻</u>	85
1.1.3 - <u>Souche LE392</u>	85
1.2 - <i>BACTEROIDES</i>	85
2 - <u>VECTEURS DE CLONAGE ET DE SOUS-CLONAGE EMPLOYES</u>	86
2.1 - VECTEURS UTILISES POUR LA MISE EN PLACE DES BANQUES D'ADN GENOMIQUES.....	86
2.1.1 - <u>pBR322</u>	86
2.1.2 - <u>pHC79</u>	86

2.1.3 - <u>Lambda EMBL3</u>	86
2.2 - VECTEURS UTILISES EN SOUS-CLONAGE.....	89
2.2.1 - <u>pBR322</u>	89
2.2.2 - <u>pBR325</u>	89
2.2.3 - <u>pDR720</u>	89
3 - <u>MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURES</u>	89
3.1 - PREPARATION DES SUBSTRATS.....	89
3.1.1 - <u>Polygalacturonate</u>	89
3.1.2 - <u>Pectine</u>	89
3.2 - CULTURE D' <i>E. COLI</i>	90
3.2.1 - <u>Milieu LB</u>	90
3.2.2 - <u>Milieu de Lennox</u>	90
3.2.3 - <u>Milieu YC gélosé</u>	91
3.2.4 - <u>Milieu de polygalacturonate de magnésium</u>	91
3.2.5 - <u>Gélose molle ou "top agar"</u>	91
3.2.6 - <u>Conditions de culture d'<i>E. coli</i></u>	92
3.3 - CULTURE DE <i>BACTEROIDES</i>	92
3.3.1 - <u>Bouillon cerveau-coeur</u>	92
3.3.2 - <u>Milieu de Caspari et Macy</u>	93
3.3.3 - <u>Milieu YC gélosé adapté pour <i>Bacteroides</i></u>	93
3.3.4 - <u>Conditions de culture de <i>Bacteroides</i></u>	94
3.4 - ANTIBIOTIQUES INCORPORES DANS LES MILIEUX SELECTIFS... 94	94
4 - <u>TECHNIQUES D'EXTRACTION D'ADN</u>	94
4.1 - EXTRACTION D'ADN TOTAL DE <i>BACTEROIDES</i>	94
4.2 - EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE.....	95
4.2.1 - <u>Méthode de Ish-Horowicz et Burke</u>	95
4.2.2 - <u>Extraction rapide d'ADN plasmidique selon la technique de Grosveld et al.</u>	97
5 - <u>METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	98
5.1 - ELECTROPHORESE HORIZONTALE.....	98
5.2 - ELECTROPHORESE VERTICALE.....	99
5.3 - ELECTROELUTION.....	100
6 - <u>TECHNIQUES DE TRANSFERT D'ADN</u>	100
6.1 - TRANSFORMATION.....	100
6.2 - TRANSDUCTION.....	101

6.3 - TRANSFECTION.....	102
7 - <u>TECHNIQUE D'HYBRIDATION ADN/ADN SELON LA METHODE DE SOUTHERN</u>	102
7.1 - PRINCIPE.....	102
7.2 - TRANSFERT DE L'ADN SUR MEMBRANE D'HYBRIDATION.....	103
7.3 - HYBRIDATION A L'AIDE DE LA SONDE RADIOMARQUEE.....	104
7.3.1 - <u>Préhybridation</u>	104
7.3.2 - <u>Préparation de la sonde radiomarquée</u>	104
7.3.3 - <u>Hybridation proprement dite</u>	105
8 - <u>TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DU BACTERIOPHAGE LAMBDA EMBL3</u>	106
8.1 - PREPARATION D'UN STOCK DE PHAGES.....	106
8.1.1 - <u>Lyse sur milieu solide</u>	106
8.1.2 - <u>Lyse en milieu liquide</u>	107
8.2 - EXTRACTION D'ADN PHAGIQUE.....	107
9 - <u>ENZYMES UTILISEES POUR L'ANALYSE ET LA PREPARATION DE L'ADN</u>	109
9.1 - ENZYMES DE RESTRICTION.....	109
9.2 - LIGATURE.....	109
9.3 - DEPHOSPHORYLATION.....	109
10 - <u>EXTRACTION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES</u>	110
10.1 - CHEZ <i>BACTEROIDES</i>	110
10.1.1 - <u>Presse de French</u>	110
10.2 - CHEZ <i>E. COLI</i>	111
10.2.1 - <u>Presse de French</u>	111
10.2.2 - <u>Sphéroplast</u>	111
10.2.3 - <u>Lyse par le mélange lysozyme/SDS</u>	112
10.2.4 - <u>Lyse par les vapeurs de chloroforme</u>	112
11 - <u>MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTS TYPES D'ACTIVITES PECTINOLYTIQUES</u>	113
11.1 - ACTIVITE PECTINE METHYLESTERASE.....	113
11.2 - ACTIVITE PECTATE LYASE.....	113
11.2.1 - <u>Dosage direct en milieu tamponné liquide</u>	114
11.2.2 - <u>Mise en évidence de l'activité sur tampon gélosé</u> ..	115

11.2.3 - <u>Mise en évidence sur milieu riche gélosé</u>	116
11.3 - <u>ACTIVITE POLYGALACTURONASE</u>	116
11.3.1 - <u>Dosage des sucres réducteurs en milieu tamponné liquide</u>	116
11.3.2 - <u>Mise en évidence de l'activité sur tampon gélosé</u> ..	117
11.3.3 - <u>Mise en évidence de l'activité sur milieu de culture gélosé</u>	117
12 - <u>QUANTIFICATION DE CES ACTIVITES ET EXPRESSION EN TERME D'ACTIVITE SPECIFIQUE</u>	117
12.1 - <u>DOSAGE DES COMPOSES INSATURES A 235 nm</u>	117
12.2 - <u>DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE DE NELSON-SOMOGYI</u>	117
12.3 - <u>DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY</u>	118
13 - <u>CARACTERISATION DES PECTINASES PRODUITES PAR BACTEROIDES OU E. COLI</u>	119
13.1 - <u>LOCALISATION</u>	119
13.2 - <u>pH OPTIMUM D'ACTION</u>	120
13.3 - <u>TEMPERATURE OPTIMALE</u>	120
13.4 - <u>THERMOSTABILITE</u>	121
13.5 - <u>INFLUENCE DES IONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITE PECTATE LYASE</u>	121
13.6 - <u>DETERMINATION DU TYPE D'ACTIVITE DE DEPOLYMERISATION PAR VISCOSIMETRIE</u>	121
13.7 - <u>MISE EN EVIDENCE DES SUBSTRATS INDUCTEURS DES DIFFERENTS TYPES D'ACTIVITES</u>	122

III/ RESULTATS ET DISCUSSION

1 - <u>CHOIX DE LA SOUCHE DE BACTEROIDES</u>	123
2 - <u>CARACTERISATION DES PECTINASES PRODUITES PAR B. THETA IOTAOMICRON 217</u>	126
2.1 - <u>PECTINE METHYLESTERASE</u>	126
2.2 - <u>PECTATE LYASE</u>	129

2.2.1 - <u>Localisation</u>	129
2.2.2 - <u>pH optimum</u>	129
2.2.3 - <u>Température optimale</u>	130
2.2.4 - <u>Thermostabilité</u>	130
2.2.5 - <u>Effet du SDS</u>	130
2.2.6 - <u>Influence des ions divalents</u>	135
2.2.7 - <u>Mode d'action</u>	135
2.2.8 - <u>Conservation</u>	140
2.3 - POLYGALACTURONASE.....	140
2.3.1 - <u>Localisation</u>	140
2.3.2 - <u>pH optimum</u>	140
2.3.3 - <u>Température optimale</u>	142
2.3.4 - <u>Influence des ions divalents</u>	142
2.3.5 - <u>Mode d'action</u>	142
2.3.6 - <u>Conservation</u>	146
2.4 - SUBSTRATS INDUCTEURS DE CES ACTIVITES.....	146
2.5 - CONCLUSION.....	146
3 - <u>MISE EN PLACE DE BANQUES D'ADN GENOMIQUE</u>	148
3.1 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE pBR322.....	148
3.1.1 - <u>Préparation du vecteur</u>	148
3.1.2 - <u>Préparation des fragments d'ADN génomique</u>	148
3.1.3 - <u>Ligature</u>	149
3.1.4 - <u>Transformation</u>	149
3.1.5 - <u>Sélection des transformants recombinants</u> <u>pectinolytiques</u>	149
3.1.6 - <u>Conclusion</u>	151
3.2 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE pHC79.....	152
3.2.1 - <u>Préparation du vecteur</u>	152
3.2.2 - <u>Préparation des fragments d'ADN génomique</u>	152
3.2.3 - <u>Ligature et transduction</u>	152
3.2.4 - <u>Sélection des transductants recombinants</u> <u>pectinolytiques</u>	153
3.2.5 - <u>Conclusion</u>	153
3.3 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE VECTEUR PHAGIQUE lambda EMBL3.....	153
3.3.1 - <u>Préparation du vecteur</u>	153
3.3.2 - <u>Préparation des fragments d'ADN génomique</u>	154
3.3.3 - <u>Ligature et transfection</u>	154

3.3.4 - <u>Sélection des bactériophages recombinants pectinolytiques</u>	154
4 - <u>CARACTERISATION DES ACTIVITES CLONEES</u>	158
5 - <u>CARTE DE RESTRICTION DE L'INSERT</u>	161
6 - <u>SOUS-CLONAGE SEPRE DES DEUX GENES</u>	174
6.1 - SOUS-CLONAGE DES FRAGMENTS <i>Sali</i> DE L'INSERT DE 13,2 KB AU NIVEAU DU SITE <i>Sali</i> DES VECTEURS pBR322 ET pDR720.....	174
6.1.1 - <u>Transformation réalisée avec le pDR720</u>	174
6.1.2 - <u>Transformation réalisée avec le pBR322</u>	174
6.2 - SOUS-CLONAGE DES FRAGMENTS <i>EcoRI</i> DE L'INSERT DE 13,2 KB AU NIVEAU DU SITE <i>EcoRI</i> DU pBR325.....	175
6.3 - <u>CARTE DE RESTRICTION DES VECTEURS RECOMBINANTS</u>	182
6.3.1 - <u>pDR720::<i>Sali</i>-6,4 kb ou pBT1</u>	182
6.3.2 - <u>pBR322::<i>Sali</i>-6,4 kb ou pBT2</u>	185
6.3.3 - <u>pBR322::<i>Sali</i>-5,9 kb ou pBT3</u>	188
6.3.4 - <u>pBR325::<i>EcoRI</i>-3,7 kb ou pBT4 et pBT4.1</u>	190
6.3.5 - <u>pBR325::<i>EcoRI</i>-4,5 kb ou pBT5</u>	194
7 - <u>VERIFICATION DE L'ORIGINE DES FRAGMENTS <i>EcoRI</i> DE 3,7 ET 4,5 KB PAR HYBRIDATION</u>	198
7.1 - HYBRIDATION AVEC LE FRAGMENT <i>EcoRI</i> DE 3,7 KB.....	198
7.2 - HYBRIDATION AVEC LE FRAGMENT <i>EcoRI</i> DE 4,5 KB.....	198
8 - <u>LOCALISATION ET NIVEAU D'EXPRESSION DES ACTIVITES PECTINE METHYLESTERASE ET PECTATE LYASE CHEZ <i>E. COLI</i></u>	201
9 - <u>CARACTERISTIQUES DE LA PECTATE LYASE SYNTHETISEE PAR <i>E. COLI</i></u>	203
9.1 - pH OPTIMUM D'ACTIVITE.....	203
9.2 - TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION.....	203
9.3 - THERMOSTABILITE A 50°C.....	207
9.4 - INFLUENCE DES IONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITE.....	207
9.5 - MODE D'ACTION.....	207
9.6 - CONSERVATION A -20°C.....	211
9.7 - CONCLUSION.....	211

10 - <u>MISE EN EVIDENCE SUR MILIEU DE CULTURE GELOSE DES CLONES</u> <u>D'E. COLI RECOMBINANTS POUR LES ACTIVITES PECTINE METHYLESTERASE</u> <u>ET PECTATE LYASE</u>	213
IV/ CONCLUSION.....	219
V/ BIBLIOGRAPHIE.....	224

ABREVIATIONS UTILISEES

aa.....	Acide aminé
Ap.....	Ampicilline
BBT.....	Bleu de bromothymol
BHI.....	Brain heart infusion
Cm.....	Chloramphénicol
CM.....	Caspari et Macy
CMC.....	Carboxyméthyl cellulose
CTAB.....	Cetyl triméthylammonium bromide
D.E.....	Degrés d'estérification
DEAE.....	Diéthylaminoethyl
D.O.....	Densité optique
EDTA.....	Ethylenediamine tetraacetic acid
FCP.....	Fraction cyto-périplasmique
FM.....	Fraction membranaire
HM.....	High methoxy
Kb.....	Kilobase
KDa.....	Kilodalton
LB.....	Luria-Bertani
LM.....	Low methoxy
MUC.....	4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside
OGL.....	Oligogalacturonate lyase
ORF.....	Open reading frame
Pa.....	Pascal
pb.....	Paire de base
PEC.....	Pectine
PEG.....	Polyethylene glycol
PG.....	Polygalacturonase
PGA.....	Polygalacturonate
pI.....	Point isoélectrique
PL.....	Pectate lyase
PM.....	Poids moléculaire
PME.....	Pectine méthylestérase
RBB-xylan.....	Bleu brillant rémazol-xylane
SDS.....	Sodium dodecylsulphate
Sm.....	Streptomycine
SSC.....	Standard saline citrate
Surn.....	Surnageant de culture
T.....	Tris-HCl
Tc.....	Tétracycline
TSE.....	Tris Saccharose EDTA
YC.....	Yeast-Casamino acids

INTRODUCTION

1 - PRESENTATION DU GENRE BACTEROIDES.

1.1 - Le genre Bacteroides.

La famille des *Bacteroidaceae* comprend 13 genres dont le plus connu et le plus important est le genre *Bacteroides*. Toutes les bactéries appartenant à cette famille sont Gram-négatives, anaérobies strictes, chimio-organotrophes et non sporulantes. Les différences entre les genres se situent au niveau de la forme des bacilles (droits, incurvés ou hélicoïdaux), de la mobilité, du % G+C, des produits de fermentation et de l'habitat (99). En ce qui concerne la pathogénicité, seule celle des genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* est bien établie (Tableau 1).

Les bactéries appartenant au genre *Bacteroides* représentent l'un des groupes bactériens les plus importants de la flore dite de Veillon, flore endogène regroupant les bactéries anaérobies strictes, non sporulées et à Gram-négatif ou positif. L'espèce type du genre est représentée par *Bacteroides fragilis* dont l'identification s'effectue le plus souvent par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques de paroi ou de capsule ou encore par mise en évidence des produits de fermentation des sucres et des peptones, qui sont principalement le succinate, le propionate et l'acétate.

Le genre *Bacteroides* est subdivisé en deux groupes : saccharoclastique et asaccharoclastique. Les bactéries appartenant à ce genre présentent les caractéristiques principales suivantes (225) :

- * Production de quantités importantes de succinate.
- * Présence d'une malate déhydrogénase et d'une glutamate déhydrogénase.
- * % G+C compris entre 40 et 52.
- * Présence de sphingolipides, d'acides gras saturés à chaînes rectilignes et d'acides gras à longues chaînes possédant des branchements méthylés antéiso et iso.
- * Ménaquinone (Vitamine K₂) utilisée comme seule quinone respiratoire.

Ce genre est en constant remaniement. En effet, des 39 espèces répertoriées par Holdeman *et al.* en 1984 dans le volume 1 du Bergey's manual of systematic bacteriology (99), il subsiste actuellement 13 espèces (Tableau 2a), auxquelles il faut ajouter les 9 espèces nouvellement décrites (Tableau 2b). La tendance étant d'ailleurs de restreindre le genre *Bacteroides* aux espèces étroitement apparentées au groupe *fragilis* (41,229), telles que : *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* et *B. vulgatus*.

Cette tendance s'explique par le fait que les espèces appartenant au genre *Bacteroides* forment un groupe hétérogène tant du point de vue de l'habitat, du % G+C, des caractères métaboliques - capacité d'utilisation de tel ou tel substrat et caractéristique des produits de fermentation - que du pouvoir pathogène - certaines espèces telles que les espèces mélanogènes

Genre	Forme des bacilles/mobilité	Produits de fermentation/ Dégradation des pectines	Pathogénicité	% G+C
<i>Bacteroides</i>	droite/-	succinate, acétate, lactate, propionate, et formate/+	+	28/61
<i>Fusobacterium</i>	fusiforme/-	butyrate/-	+	26/34
<i>Leptotrichia</i>	incurvée/-	lactate/-	-	25
<i>Butyrivibrio</i>	incurvée/+	butyrate/+	-	36/41
<i>Succinomonas</i>	droite/+	succinate et acétate/-	-	ND
<i>Succinivibrio</i>	incurvée/+	succinate, acétate, formate et lactate/-	-	ND
<i>Anaerobio spirillum</i>	hélicoïdale/+	succinate et acétate/-	-	44
<i>Wolinella</i>	polymorphe/+	H ₂ S/-	+/-	42/48
<i>Selenomonas</i>	hélicoïdale incurvée/+	acétate et propionate/+/-	+/-	54/61
<i>Anaerovibrio</i>	incurvée/+	acétate, propionate et CO ₂ /-	-	ND
<i>Pectinatus</i>	incurvée/+	lactate, succinate, acétate et propionate/-	-	40
<i>Acetivibrio</i>	incurvée/+	acétate/-	-	37/40
<i>Lachnospira</i>	incurvée/+	formate, acétate, éthanol, CO ₂ et H ₂ /+	-	ND

Tableau 1. Récapitulatif présentant les différentes caractéristiques des bactéries appartenant à la famille des *Bacteroidaceae* (99). N.D : non défini.

Espèce	Genre	% G+C	Référence
<i>capillosus</i>	<i>Bacteroides</i>	60	99
<i>coagulans</i>	<i>Bacteroides</i>	37	99
<i>distasonis</i>	<i>Bacteroides</i>	43 à 45	99
<i>eggerthii</i>	<i>Bacteroides</i>	44 à 46	99
<i>fragilis</i>	<i>Bacteroides</i>	41 à 44	99
<i>levii</i>	<i>Bacteroides</i>	48	99
<i>macacae</i>	<i>Bacteroides</i>	43 à 44	99
<i>ovatus</i>	<i>Bacteroides</i>	39 à 43	99
<i>putredinis</i>	<i>Bacteroides</i>	-	99
<i>splanchnicus</i>	<i>Bacteroides</i>	40	99
<i>thetaitotaomicron</i>	<i>Bacteroides</i>	40 à 43	99
<i>uniformis</i>	<i>Bacteroides</i>	45 à 48	99
<i>vulgatus</i>	<i>Bacteroides</i>	40 à 42	99

Tableau 2a. Différentes espèces appartenant au genre *Bacteroides*, décrites par Holdeman *et al.* dans la dernière édition du Bergey's manual (1984) et n'ayant pas subi de reclassification.

Espèce	Genre	% G+C	Référence
<i>caccae</i>	<i>Bacteroides</i>	40 à 42	120
<i>cellulosolvens</i>	<i>Bacteroides</i>	43	167
<i>galacturonicus</i>	<i>Bacteroides</i>	36	116
<i>merdae</i>	<i>Bacteroides</i>	43 à 46	120
<i>pectinophilus</i>	<i>Bacteroides</i>	45	116
<i>pentosaceus</i>	<i>Bacteroides</i>	50 à 51	222
<i>polypragmatus</i>	<i>Bacteroides</i>	61	180
<i>stercoris</i>	<i>Bacteroides</i>	43 à 47	120
<i>xylanolyticus</i>	<i>Bacteroides</i>	34 à 35,6	220

Tableau 2b. Différentes espèces nouvellement décrites dans le genre *Bacteroides*.

étant plus souvent impliquées dans des processus infectieux que d'autres.

De nombreuses reclassifications concernant les espèces appartenant au genre *Bacteroides* se sont donc opérées depuis la parution de la dernière édition du Bergey's manual en 1984 (Tableaux 2c et 2d). Ainsi récemment, certaines espèces appartenant au groupe des mélanogènes (*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides endodontalis* et *Bacteroides asaccharolyticus*) ont été classées dans le genre *Porphyromonas* (228), cette reclassification s'expliquant par le fait que ces trois espèces possèdent des caractères biochimiques éloignés de l'espèce type *fragilis*. De même, *Bacteroides nodosus* a été placé dans le genre *Dichelobacter*, ceci après analyse des ARN ribosomiques 16S (52,132). D'autres reclassifications ponctuelles ont été également réalisées (Tableau 2d). Dernièrement, un grand nombre d'espèces ont été reclassées dans le genre *Prevotella* (230) (Tableau 2c) et les espèces *B. gracilis* et *B. ureolyticus* ont été déclassées car étant des microaérophiles (91). En ce qui concerne les *Bacteroides* inféodés au rumen, *Bacteroides succinogenes* a été reclassé dans le genre *Fibrobacter* (161), *Bacteroides amylophilus* dans le genre *Ruminobacter* appartenant au groupe des bactéries pourpres (242) et *Bacteroides ruminicola* dans le genre *Prevotella* (230).

Durant cette même période, quelques propositions de classification de nouvelles espèces à l'intérieur du genre *Bacteroides* ont été faites. Il s'agit des espèces *Bacteroides cellulosolvans* (167) et *Bacteroides polypragmatus* (180) isolées des vases d'égout, de *Bacteroides heparinolyticus* isolé chez des patients souffrant de périodontite (174) mais qui a été ensuite reclassé dans le genre *Prevotella* (230), des espèces *Bacteroides pectinophilus* et *Bacteroides galacturonicus* localisées au niveau du tractus digestif humain (116) et enfin de *Bacteroides xylanolyticus* isolée du fumier de bovins (220) (Tableau 2b).

Les nombreux remaniements qui ont été effectués depuis 7 ans s'expliquent en partie par le fait que les espèces constituant le genre *Bacteroides* forment un groupe hétérogène, en effet Paster *et al.* (179) ont déterminé des pourcentages d'homologies par hybridation ADN chromosomique / ARNr 16S et ont différencié 3 groupes à l'intérieur du genre *Bacteroides* :

1. Le groupe comprenant les espèces apparentées au type *fragilis* constitué par les espèces *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* et *B. uniformis*.
2. Le groupe représenté par *B. ruminicola* et *Fusobacterium*.
3. Le groupe *Bacteroides distasonis*.

L'utilisation de nouvelles techniques d'identification et de détermination des espèces telles que l'analyse des ARN ribosomiques 16S (118), l'hybridation des acides nucléiques à l'aide de sondes ADN ou ARN (86,131), l'étude de la distribution des acides gras cellulaires par chromatographie en phase gaz couplée à un spectromètre de masse (23,24,254), des produits de fermentation par chromatographie en phase gaz (31) et l'analyse des hydrates de carbone cellulaires par chromatographie capillaire en phase gaz (66) expliquent également ces remaniements.

Espèce	Genre	% G+C	Référence
<i>bivia</i>	<i>Prevotella</i>	40	97,230
<i>buccae</i>	<i>Prevotella</i>	50 à 52	230
<i>buccalis</i>	<i>Prevotella</i>	45 à 46	222,230
<i>corporis</i>	<i>Prevotella</i>	43 à 46	118,230
<i>denticola</i>	<i>Prevotella</i>	49 à 51	222,230
<i>disiens</i>	<i>Prevotella</i>	40 à 42	97,230
<i>heparinolytica</i>	<i>Prevotella</i>	47 à 49	174,230
<i>intermedia</i>	<i>Prevotella</i>	41 à 44	118,230
<i>loescheii</i>	<i>Prevotella</i>	46	98,230
<i>melaninogenica</i>	<i>Prevotella</i>	36 à 40	230
<i>oralis</i>	<i>Prevotella</i>	43	143,230
<i>oris</i>	<i>Prevotella</i>	42 à 46	98,230
<i>ouloria</i>	<i>Prevotella</i>	45 à 46	225,230
<i>ruminicola</i>	<i>Prevotella</i>	49 à 50	29,230
<i>veroralis</i>	<i>Prevotella</i>	42	230,261
<i>zooglyphiformans</i>	<i>Prevotella</i>	47	230,263

Tableau 2c. Différentes espèces ayant appartenu au genre *Bacteroides* et actuellement reclassées dans le genre *Prevotella*.

Espèce	Genre	% G+C	Référence
<i>amylophilus</i>	<i>Ruminobacter</i>	40 à 42	242
<i>asaccharolyticus</i>	<i>Porphyromonas</i>	52 à 54	228
<i>endodontalis</i>	<i>Porphyromonas</i>	49 à 51	228
<i>furcosus</i>	<i>Anaerorhabdus</i>	34	227
<i>gingivalis</i>	<i>Porphyromonas</i>	46 à 48	228
<i>hypermegas</i>	<i>Megamonas</i>	61	223
<i>microfusus</i>	<i>Rikenella</i>	60 à 61	38
<i>multiacidus</i>	<i>Mitsuokella</i>	56 à 58	224
<i>nodosus</i>	<i>Dichelobacter</i>	45	52,132
<i>praecutus</i>	<i>Tissierella</i>	28 à 30	40
<i>succinogenes</i>	<i>Fibrobacter</i>	47 à 49	161
<i>termitidis</i>	<i>Sebaldella</i>	34 à 36	39

Tableau 2d. Différentes espèces ayant appartenu au genre *Bacteroides* et actuellement reclassées dans d'autres genres.

1.2 - Caractères bactériologiques de l'espèce *thetaitotaomicron*.

La souche type de l'espèce est : ATCC 29148 (NCTC 10582). Ce nom d'espèce correspond aux trois lettres grecques theta, iota et omicron et est en relation avec la morphologie des formes vacuolées. Des capsules sont présentes chez certaines souches, ce qui leur confère une morphologie particulière ainsi qu'une résistance aux bactériophages. Sur gélose au sang, les colonies ont un aspect ponctiforme, circulaire, convexe, blanchâtre et brillant. En milieu liquide, les cultures sont troubles avec un dépôt muqueux et un pH final de 5,0 à 5,5.

Cette espèce est capable d'utiliser un grand nombre de substrats simples tels que : amygdaline, amylose, arabinose, cellobiose, dextrine, esculine, fructose, fucose, galacturonate, glucose, glycogène, lactose, maltose, mannose, mélibiose, raffinose, rhamnose, ribose, saccharose, tréhalose et xylose. Mais aussi, un certain nombre de polysaccharides tels que : amidon, amylopectine, chondroïtine sulfate, dextrans, héparine, hyaluronate, arabinogalactane de mélèze, pectine et polygalacturonate (99).

2 - BACTERIES PROCHES DU GENRE *BACTEROIDES*.

La flore endogène humaine comprend également d'autres micro-organismes anaérobies stricts tels que des bacilles à Gram-négatif non sporulés (*Fusobacterium*); des cocci à Gram-négatif (*Veillonella*); des cocci à Gram-positif en amas (*Peptococcus*) ou en chaînettes (*Peptostreptococcus*); des bacilles à Gram-positif non sporulés (*Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces* et *Propionibacterium*); des spirochètes, des spirilles et des vibrions (*Mobiluncus*).

Les *Capnocytophaga* sont des bacilles fusiformes, micro-aérophiles et dont la croissance exige la présence de gaz carbonique. Ces bactéries commensales de la cavité buccale sont responsables dans certains cas, de l'inflammation des tissus de soutien de la dent (99,133).

Les *Fusobacterium* sont des bacilles très polymorphes, qui ont des exigences nutritionnelles proches de celles de *Bacteroides*, qui sont assez sensibles à l'oxygène et que l'on rencontre au niveau des cavités buccale, intestinale et vaginale. Les bactéries appartenant à ce genre sont des pathogènes opportunistes puisqu'à la faveur de certaines circonstances favorisantes, elles peuvent être à l'origine d'une pathologie infectieuse voisine de celle occasionnée par les bactéries appartenant au genre *Bacteroides* (99).

Les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* sont proches des Flavobactéries et des *Cytophagaceae* et sont génétiquement distants des autres bactéries Gram-négatives (179,264). D'après Salyers *et al.*, la séparation du groupe *Flavobacterium-Bacteroides* des autres eubactéries se serait effectuée avant la séparation des bactéries Gram-positives, des bactéries pourpres et des cyanobactéries (210).

3 - LOCALISATION ET ABONDANCE DU GENRE BACTEROIDES.

3.1 - CHEZ L'HOMME.

Le genre *Bacteroides* constitue l'un des principaux groupes bactériens de la flore endogène humaine. Chez l'homme, ils sont présents en grand nombre dans la bouche (10^7 à 10^8 /ml de salive), dans l'intestin grêle (10^{10} à 10^{12} bactéries/g de selles), ainsi que dans le vagin (10^7 à 10^8 bactéries/g de sécrétion). La répartition des espèces varie selon le site considéré, l'âge et l'état physiologique du sujet.

Dans la bouche, les espèces les plus représentées sont *Prevotella (Bacteroides) oris*, *Prevotella (Bacteroides) buccae*, *Prevotella (Bacteroides) oralis*, ainsi que les espèces mélanogènes telles que *Prevotella (Bacteroides) intermedia*, *Porphyromonas (Bacteroides) asaccharolyticus*, *Prevotella (Bacteroides) melaninogenica*, *Prevotella (Bacteroides) denticola*, *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* et *Prevotella (Bacteroides) corporis*.

Les espèces appartenant au groupe *fragilis* sont essentiellement présentes au niveau du côlon.

Les *Bacteroides* de la cavité vaginale étant représentés par les espèces *Prevotella (Bacteroides) disiens*, *Prevotella (Bacteroides) bivia* et *Bacteroides coagulans*.

3.1.1 - Bacteroides de la cavité buccale.

La cavité buccale est composée de nombreuses niches écologiques -totalisant plus de 300 espèces différentes- parmi lesquelles on distingue la voûte du palais, la langue, la plaque dentaire, les gencives et le liquide salivaire. Chacune de ces niches est colonisée par des communautés microbiennes bien spécifiques. Ces habitats sont en perpétuel remaniement du fait que les conditions auxquelles ils sont soumis évoluent en permanence (hygiène buccale, alimentation, flux salivaire...).

Les *Bacteroides* de la cavité buccale sont localisés essentiellement au niveau du sillon gingivo-dentaire, ce sillon représente un biotope particulier puisque caractérisé par un potentiel d'oxydo-réduction évoluant progressivement vers l'anaérobiose. Ce gradient est réalisé par la présence de *Streptococcus* buccaux, de *Neisseria* et de *Lactobacillus* permettant aux *Bacteroides*, *Veillonella*, et *Fusobacterium* de se développer.

Certaines bactéries ont des rôles antagonistes au niveau de la plaque dentaire, c'est le cas

de *P. oralis* qui hydrolyse les dextrans synthétisés par *Streptococcus mutans*.

D'autres espèces de *Bacteroides*, possédant le plus souvent une activité collagénolytique, sont à l'origine d'infections telles que des abcès dentaires. Il s'agit dans ce cas d'espèces appartenant au groupe mélanogène, telles que *P. gingivalis*, *P. asaccharolyticus*, et *P. melaninogenica*.

Enfin, certaines espèces de *Bacteroides* peuvent être à l'origine d'infections oto-rhino-laryngologiques et respiratoires.

3.1.2 - *Bacteroides* du tube digestif.

Plus de 300 à 400 espèces différentes ont été mises en évidence dans la flore intestinale humaine. Cette flore peut être subdivisée en 3 groupes principaux :

- la flore dominante représentant 99% de la flore totale. Cette flore comprend les genres *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* et *Clostridium*. On les trouve à des taux variant de 10^9 à 10^{11} bactéries/g de matière fécale. Le genre *Bacteroides* y est bien représenté puisqu'il constitue à lui seul 30% des bactéries de cette flore. Les espèces les plus fréquemment rencontrées étant *B.thetaiotaomicron*, *B.fragilis*, *B.vulgatus*, *B.distasonis* et *B.ovatus*.

- la flore sous-dominante composée de bactéries aéro-anaérobies facultatives et microaérophiles. On y trouve des *Streptococcus*, *Escherichia coli* et *Lactobacillus*. Leur nombre est compris entre 10^6 et 10^8 bactéries/g de matière fécale.

- la flore fluctuante ou de transit. Il s'agit d'une flore plus hétérogène et présente en nombre faible (inférieur à 10^5 bactéries/g de fèces). Elle est constituée de bacilles Gram-négatif, Gram-positif, levures et moisissures. Sa faible représentativité ne doit pas être sous-estimée puisqu'elle peut être à l'origine d'infections opportunistes.

3.2 - CHEZ LES RUMINANTS.

Chez les ruminants, la dégradation des polysaccharides d'origine végétale (cytoplasmiques ou pariétaux) s'effectue dans la panse ou rumen et est due à l'action combinée de nombreux micro-organismes. La panse qui correspond à un des quatre compartiments formant l'estomac, représente à elle seule 80% du volume total de l'estomac soit environ 250 litres chez la vache.

Le rumen de par sa température (39 à 40°C), son humidité, son pH compris entre 5,7 et 7,3, son atmosphère anaérobie (principalement constituée de gaz carbonique et de méthane) et son approvisionnement constant en nourriture constitue un excellent fermenteur. Il forme donc un environnement de choix pour le développement des micro-organismes anaérobies tels que *Butyrivibrio*, *Megasphaera*, *Ruminobacter*, *Selenomonas*, *Streptococcus* et *Bacteroides*.

La population du rumen est constituée essentiellement de bactéries, présentes à la concentration de 10^{10} /ml de jus de rumen, mais aussi de protozoaires en plus faible nombre (10^6 /ml) ainsi que de champignons anaérobies tels que des phycomycètes (10^5 /ml). Il existe entre les différentes espèces qui cohabitent dans le rumen des relations de symbiose et de compétition complexes. Cette population très hétérogène est représentée par 200 espèces bactériennes dont 30 seulement sont spécifiques du rumen (107). L'écosystème microbien du rumen est donc caractérisé par une structure de fermentation dynamique et ouverte où les produits de fermentation des substrats organiques apportent l'énergie nécessaire à la croissance et à l'entretien de la population microbienne ainsi qu'à l'hôte (140).

Le genre *Bacteroides* y est essentiellement représenté par les espèces *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola*, *Fibrobacter* (*Bacteroides*) *succinogenes* et *Ruminobacter* (*Bacteroides*) *amylophilus*. *R. amylophilus* est capable de dégrader l'amidon alors que les deux autres espèces sont capables de dégrader des polysaccharides complexes (pariétaux) tels que les pectines (*P. ruminicola*), la cellulose dégradée essentiellement par *F. succinogenes* (70) ou encore l'hémicellulose (*P. ruminicola* et *F. succinogenes*).

3.3 - AUTRES HABITATS.

Parmi les 39 espèces de *Bacteroides* recensées dans le Bergey's manual (99), seules 5 espèces ne sont ni rencontrées chez l'homme, ni chez les ruminants.

Il s'agit des espèces suivantes :

- *Bacteroides macacae* rencontré dans la cavité buccale des macaques (99).
- *Rikenella* (*Bacteroides*) *microfusus* isolé de fèces de veau et du caecum de poulet (38).
- *Dichelobacter* (*Bacteroides*) *nodosus* responsable de la maladie du pied de mouton ou fourchet (foot rot) (52,132).
- *Bacteroides putredinis* inféodé au côlon du mouton (99).
- *Sebaldella* (*Bacteroides*) *termitidis* que l'on trouve dans l'intestin des termites (39).

A cette liste, il faut ajouter les espèces nouvellement recensées telles que *B. polypragmatus* (181) et *B. cellulosolvans* (167) isolées à partir de vases d'égout.

4 - PATHOGENICITE DU GENRE BACTEROIDES.

4.1 - GENERALITES.

Les différentes espèces appartenant au genre *Bacteroides* vivent habituellement en commensaux chez leur hôte; cependant, à la faveur d'opportunités, certaines espèces deviennent capables d'envahir des terrains qui leur sont normalement étrangers : ce sont des pathogènes opportunistes.

Ce sont de loin les bactéries anaérobies strictes non sporulées les plus fréquemment isolées de produits pathologiques. Cependant, les *Bacteroides* sont peu virulents du fait qu'ils ne produisent pas d'exotoxine puissante.

Leur pouvoir invasif et pathogène est conféré par diverses enzymes comprenant entre autres, une collagénase, une hyaluronidase et une chondroïtine lyase. Ces enzymes étant élaborées par certaines espèces mélanogènes ainsi que par quelques espèces appartenant au groupe *fragilis*. En dénaturant les constituants cellulaires tels que le collagène, l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate, ces enzymes facilitent l'invasion et la colonisation bactérienne des tissus. De plus, la diminution du potentiel d'oxydo-réduction tissulaire - due à la nécrose tissulaire et à la présence éventuelle de bactéries anaérobies facultatives dans le foyer infectieux - favorise la multiplication des *Bacteroides* et celle des autres bactéries anaérobies strictes pouvant être présentes au point d'infection. La prolifération cellulaire qui en résulte est susceptible de créer des abcès ainsi que des suppurations.

4.2 - CHEZ L'HOMME.

Certaines espèces appartenant au genre *Bacteroides* sont responsables d'infections de l'appareil digestif, du tractus génital féminin, de la cavité buccale, des sinus et de l'oreille moyenne ainsi que de certaines surinfections cutanées et d'ulcères des membres inférieurs. A partir de tous ces foyers, les *Bacteroides* peuvent être à l'origine de septicémies associées à un taux de mortalité important. Cette capacité d'engendrer des infections s'explique par l'abondance du genre à l'intérieur de l'hôte, l'équipement enzymatique de l'agresseur le rendant plus invasif ainsi que par son métabolisme anaérobie.

4.2.1 - Cavité buccale.

Chez *Bacteroides*, les espèces pathogènes de la cavité buccale appartiennent au groupe des bactéries asaccharolytiques pigmentées en noir (153). On y trouve les espèces *P. asaccharolyticus* distribué largement dans les tissus et liquides biologiques humain et animal,

Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis, *P. gingivalis* et *P. oralis* dont la répartition se limite à la cavité buccale.

L'espèce pathogène la plus virulente et la plus fréquemment rencontrée lors d'infections orales est *P. gingivalis*, ce qui explique les nombreuses études réalisées sur cette dernière. (15,83,168,177). L'espèce est d'ailleurs séparée en 2 groupes : les souches pathogènes présentant des activités collagénolytiques et protéolytiques importantes contrairement aux souches non pathogènes (15,83,177,257).

La virulence des souches est également liée à leur capacité d'attachement aux collagènes des tissus entourant la dent grâce à la présence de fimbriae localisés au niveau des membranes externes (168), à la disponibilité dans le milieu de certains facteurs tels que l'hémine, le fer et la vitamine K (90,149), aux produits issus du métabolisme fermentatif entraînant une augmentation de l'acidité responsable en partie de la solubilisation de l'émail dentaire et éventuellement à des activités enzymatiques susceptibles de perturber les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte (153). Cette virulence est potentialisée par le fait que certaines bactéries appartenant entre autres aux genres *Streptococcus* et *Leuconostoc* synthétisent des polysaccharides extracellulaires tels que les dextrans qui permettent la stabilisation et la consolidation de la plaque dentaire.

Ces bactéries essentiellement présentes au niveau du sillon gingivo-dentaire sont à l'origine de gingivites, parodontites, ou d'abcès du périodonte.

4.2.2 - Cavité abdominale.

Les espèces anaérobies rencontrées lors d'infections abdominales appartiennent aux genres *Peptostreptococcus*, *Clostridium* et essentiellement au groupe *fragilis* en ce qui concerne le genre *Bacteroides* (26).

La distribution des différentes souches varie selon les types et les sites d'infections. *B. fragilis* est isolé dans 63% des cas, suivi par *B. thetaiotaomicron* (14%), *B. vulgatus* et *B. ovatus* (7%), *B. distasonis* (6%) et *B. uniformis* (2%) (26).

Ces bactéries abondent dans les sites d'infection polymicrobiens localisés au niveau du côlon et sont responsables d'infections de l'appareil digestif telles que des péritonites, abcès viscéraux, abcès hépatiques ou sous-phréniques, infections périnéales ou périrectales.

Ici encore, la virulence des souches dépend d'un grand nombre de facteurs tels que la capacité d'encapsulation, l'existence de pilis ou fimbriae, la présence de certaines enzymes de protection vis-à-vis de l'oxygène telles que catalase, superoxyde-dismutase, ou de dispersion telles que hyaluronidases, chondroïtine lyase, collagénase, trypsine ou fibrinolytase (25,26,79).

4.2.3 - Cavité pelvienne.

P. bivia et *P. disiens* sont les 2 principales espèces rencontrées lors d'infections de la cavité pelvienne en association avec certaines espèces du groupe *fragilis*. Elles sont responsables de diverses infections génitales chez la femme telles que des vaginites, abcès des glandes de Bartholin ou de la vulve, endométrites, salpingites... Le traitement de ces infections est rendu difficile par l'antibiorésistance multiple de la plupart des souches.

4.3 - CHEZ L'ANIMAL.

Une seule espèce est pathogène chez le mouton, il s'agit de *D. nodosus* qui est responsable de l'inflammation du pied ou fourchet (foot rot disease). La maladie est caractérisée par une attaque des tissus épithéliaux de l'espace interdigité des sabots de l'animal, entraînant une claudication, puis un affaiblissement de l'état général se soldant pour l'éleveur par une baisse de production de viande et de laine.

Les souches pathogènes synthétisent de grandes quantités de protéases thermostables et sont très mobiles. De plus, elles possèdent au niveau de leurs membranes externes des pilis ou fimbriae jouant un rôle important dans l'attachement et la colonisation des tissus épithéliaux du sabot mais également lors de la réponse immunitaire de l'hôte car reconnus comme antigènes. Ces pilis - structures filamenteuses flexibles de 5 à 6 nm de diamètre et de 10 μm de long - sont constitués de nombreuses sous-unités d'une protéine dont la taille varie de 16,5 à 19 kDa selon le sérotype de la souche (5).

L'éradication de cette maladie est basée sur la vaccination, les pilis constituant les antigènes immunoprotecteurs les plus efficaces (65). Le clonage et l'étude de l'expression chez *E. coli* (4,20,62) ou chez *Pseudomonas aeruginosa* (64,65) des gènes codant pour les sous-unités des pilis, a permis d'obtenir un vaccin meilleur marché et plus spécifique, donc mieux toléré par les animaux.

5 - ANTIBIORESISTANCE.

Le traitement des différentes infections décrites dans les paragraphes précédents est rendu difficile par le fait que la plupart des espèces appartenant au genre *Bacteroides* sont résistantes à un grand nombre d'antibiotiques. Les phénomènes d'antibiorésistances ont été surtout étudiés chez les espèces appartenant au groupe *fragilis*, à l'origine de la majeure partie des infections rencontrées chez l'homme (26).

5.1 - ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE DES CONSTITUANTS DE LA PAROI BACTÉRIENNE.

Il s'agit essentiellement d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines. Ces antibiotiques sont caractérisés par la présence d'une fonction amide cyclisée (cycle β -lactame) qui est responsable de l'activité antibactérienne. Ils sont divisés en deux familles principales; celle des pénicillines et celle des céphalosporines.

La résistance acquise par les micro-organismes vis-à-vis de ces antibiotiques peut s'expliquer par :

- * l'inactivation de l'antibiotique par une enzyme ouvrant le cycle β -lactame (β -lactamase);

- * la diminution de la perméabilité de la membrane externe vis-à-vis des β -lactamines par l'absence des porines responsables du passage de l'antibiotique;

- * la modification de l'affinité des protéines de liaisons aux pénicillines pour l'antibiotique. Ces protéines sont associées à la membrane interne et responsables de la synthèse du peptidoglycane.

Les β -lactamases sont très nombreuses dans le règne bactérien et sont périplasmiques chez les bactéries à Gram-négatif et extracellulaires chez les bactéries à Gram-positif. Les pénicillinases hydrolysent les pénicillines, alors que les céphalosporinases détruisent les pénicillines et céphalosporines.

Les *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis* possèdent 3 β -lactamases synthétisées de façon constitutive et qui sont très actives sur les céphalosporines ainsi que sur la pénicilline G et les aminopénicillines -ampicilline ou amoxicilline- (26,175). Cependant, les céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération, de même que les carboxypénicillines et l'imipénem sont actives vis-à-vis du groupe *fragilis* (2,22,48,266).

L'emploi d'inhibiteurs compétitifs des β -lactamases tels que l'acide clavulanique (28,265,266), le sulbactam (48,266) et le tazobactam (266) a permis d'élargir le spectre d'activité de certains antibiotiques. Ainsi, l'acide clavulanique est employé en association avec l'amoxicilline ou la ticarcilline et le sulbactam est utilisé en association avec l'ampicilline et le

céfoperazone (22,48).

Certaines espèces ne synthétisant pas ou très peu de β -lactamase paraissent cependant résistantes aux β -lactamines, ce qui peut s'expliquer par le fait que les β -lactamases synthétisées par d'autres bactéries et libérées dans le milieu extérieur, entraînent localement une diminution de la concentration en antibiotique permettant ainsi aux bactéries sensibles de se développer (26), ce qui correspond au phénomène de satellitisme observé sur milieu gélosé additionné d'ampicilline.

5.2 - ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE.

On y trouve les aminosides (kanamycine, acide nalidixique, néomycine et streptomycine entre autres), le chloramphénicol, les tétracyclines ainsi que les macrolides, lincosamides et streptogramines.

5.2.1 - Résistance aux aminoglycosides.

La résistance vis-à-vis des aminoglycosides s'explique soit par modification de l'antibiotique le rendant ainsi incapable d'atteindre sa cible, soit par l'absence d'un mécanisme de transport actif à travers la membrane cytoplasmique la rendant ainsi imperméable. C'est ce dernier type de résistance que possèdent la plupart des souches de *Bacteroides* peuplant le côlon ou la cavité buccale.

5.2.2 - Résistance au chloramphénicol.

La plupart des *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis* sont très sensibles à cet antibiotique ainsi qu'au métronidazole (22,48,95,121,266). Cependant, la toxicité du chloramphénicol limite son utilisation dans le domaine médical. Certaines souches de *B. uniformis* sont résistantes au chloramphénicol dans ce cas, la résistance est conférée par un plasmide porteur du gène codant pour la chloramphénicol-acétyl-transférase (150).

5.2.3 - Résistance à la tétracycline.

60% des souches de *B. fragilis* sont résistantes aux tétracyclines. Cette résistance d'origine chromosomique, s'explique par l'impossibilité pour l'antibiotique de pénétrer dans la bactérie (67).

5.2.4 - Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines.

La plupart des *Bacteroides* y sont sensibles et dans ce groupe, la clindamycine s'avère être l'antibiotique de référence pour le traitement des infections, la proportion de souches résistantes étant d'environ 10% en ce qui concerne les souches appartenant au groupe *fragilis* (95,266). Cependant, le nombre de souches de *Bacteroides* résistantes à ce type d'antibiotiques augmente d'année en année, ce qui s'explique par l'origine plasmidique de la résistance rendant possible son transfert d'une souche à une autre.

5.3 - APPARITION DE SOUCHES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.

Une étude réalisée entre 1981 et 1986 sur 534 isolats cliniques de *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis*, a permis de montrer que le nombre de souches résistantes à différents antibiotiques est en constante augmentation. En effet, le pourcentage de souches résistantes à la clindamycine était nul en 1981 et approchait les 8% en 1986. De même, le nombre de souches résistantes vis-à-vis du métronidazole ou du chloramphénicol augmente d'année en année (215).

Récemment, plusieurs souches de *B. distasonis* possédant une résistance vis-à-vis de l'imipénem ont été isolées. Cette résistance très inhabituelle (95) est due à l'acquisition d'un nouveau type de β -lactamase associé à une imperméabilité membranaire vis-à-vis de l'acide clavulanique (59,108).

D'autre part, depuis quelques années, le nombre de souches de *Bacteroides* résistantes aux β -lactamines et n'appartenant pas au groupe *fragilis* ne cesse de croître. Ainsi récemment, Jacobs *et al.* ont testé 234 souches de *Bacteroides* non affiliées au groupe *fragilis* (provenant d'isolats cliniques) pour la production de β -lactamase et il s'avère que 99 souches (soit environ 42,3%) répondent positivement (111).

Tous ces problèmes d'acquisition de résistance aux antibiotiques montrent qu'il existe chez *Bacteroides*, des mécanismes de transferts actifs de gènes impliqués dans certaines antibiorésistances, et expliquent qu'actuellement le traitement d'une infection à *Bacteroides* repose sur une poly-antibiothérapie associée éventuellement à un traitement chirurgical.

6 - METABOLISME.

6.1 - BESOINS NUTRITIONNELS DE BASE.

Ils sont relativement simples (259) et sont le reflet de l'environnement dans lequel vivent les espèces appartenant au genre *Bacteroides*.

6.1.1 - Besoins en CO₂.

De nombreux organismes anaérobies parmi lesquels figure le genre *Bacteroides* produisent du succinate. Ces bactéries ont besoin de CO₂ non seulement pour leur anabolisme mais également pour transformer les hydrates de carbone en acides gras volatils, processus libérant de l'énergie sous forme d'ATP. En effet, lorsque le fumarate est réduit en succinate, de l'ATP est formé par l'intermédiaire d'un mécanisme primitif de transport d'électrons.

Des études concernant la formation du succinate prouvent que le CO₂ est indispensable pour la fermentation des hexoses. Il est en effet directement impliqué dans le catabolisme anaérobie de certains substrats pour engendrer des produits de fermentation tels que le succinate et le propionate (147). Ce besoin s'explique également par le fait que tous les environnements dans lesquels se développent *Bacteroides* contiennent de fortes teneurs en CO₂ et en bicarbonates (32).

La présence de bicarbonates à forte concentration dans le milieu est essentielle, puisqu'ils vont jouer un rôle tampon en limitant l'abaissement du pH consécutif à la formation d'acides gras volatils durant les processus de fermentation. En effet, malgré les fortes concentrations en bicarbonates, le pH en fin de culture sur milieu minimum glucosé à 1% est souvent proche de 5.

L'oxygène empêche la croissance de ces bactéries; néanmoins certaines souches appartenant notamment au groupe *fragilis* peuvent supporter des expositions de quelques heures (177,258). Cette tolérance vis-à-vis de l'oxygène serait due en partie à la présence d'une superoxyde-dismutase et/ou d'une catalase.

6.1.2 - Besoins en azote.

Tous les *Bacteroides* sont capables d'utiliser l'ammoniac comme source d'azote (280), c'est d'ailleurs la seule source utilisée par *R. amylophilus* et *F. succinogenes*. Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* utilisent difficilement les composés azotés organiques, la source d'azote préférentielle étant les ions ammonium (NH₄⁺) (259). La méthionine, de même que la

cystéine, sont indispensables à la croissance de *P. ruminicola*. Cette espèce est incapable d'utiliser les acides aminés comme source d'azote mais peut en revanche utiliser des oligopeptides dont le poids moléculaire est supérieur ou égal à 2 kDa.

6.1.3 - Besoins en facteurs de croissance.

Il est important de compléter le milieu de culture en hémine car cette molécule est indispensable à la formation du cytochrome b et de la NADH-fumarate oxydoréductase (240). Cette enzyme catalysant la formation d'acide succinique à partir de l'acide fumarique. En présence d'hémine, les produits de fermentation sont le succinate, l'acétate et le propionate. Sur le même milieu dépourvu d'hémine, le catabolisme anaérobie libère du fumarate, malate et acétate.

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont besoin de vitamine B₁₂ ou de méthionine pour leur développement. Les *Bacteroides* du rumen quant à eux ont des exigences en biotine et dans certains cas en acide para-aminobenzoïque (PAB). Certaines espèces telles que *R. amylophilus* n'ont aucun besoin en vitamine.

Les besoins en ions sont relativement complexes puisqu'il est nécessaire de compléter le milieu minimum en Co⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ et Na⁺. Tous les *Bacteroides* du rumen ont besoin pour leur croissance de fortes concentrations en ions Na⁺ contrairement aux autres *Bacteroides* (30).

La source de soufre est constituée par le sulfate d'ammonium pour les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et de cystéine pour les *Bacteroides* du rumen (259).

Mis à part certains *Bacteroides* du rumen tels que *P. ruminicola*, les *Bacteroides* n'ont pas de besoins particuliers en acides gras volatils.

Aucun milieu de culture minimum n'a été défini pour les *Bacteroides* du rumen. En effet, leurs exigences nutritionnelles étant beaucoup plus complexes que celles des autres *Bacteroides*, il est nécessaire de compléter le milieu de culture en jus de rumen.

En milieu liquide et riche, complété en hémine et vitamine B₁₂ et dans les conditions de température optimale de la souche (37°C pour *B. fragilis*), le temps de génération est de 60 mn. Sur milieu minimum glucosé et complété en hémine et vitamine B₁₂, le temps de doublement est de 2 heures; en absence d'hémine, aucune croissance n'est observée (240).

6.2 - METABOLISME DES MONOSACCHARIDES.

6.2.1 - Métabolisme du glucose.

La capture des hexoses tels que le glucose ou mannose chez *B. thetaiotaomicron* est liée

à un transporteur indépendant du système phospho-énol-pyruvate glucose phospho-transférase (71,147). La source d'énergie nécessaire au fonctionnement du système a vraisemblablement pour origine le système de transport d'électrons couplé à la fumarate réductase (71). Le système phospho-énol-pyruvate glucose phospho-transférase existe par contre chez *Prevotella (Bacteroides) intermedius* (90).

Dans certains cas, l'énergie nécessaire aux synthèses peut être fournie par des réactions de phosphorylation oxydative et ceci par un système primitif de transport d'électrons dépendant du NADH, des quinones et des cytochromes (147).

6.2.1.1 - Voie conduisant au succinate.

La transformation du glucose en phospho-énol-pyruvate (PEP) s'effectue par la voie anaérobie d'Embden-Meyerhoff. En effet, une activité fructose 1,6-diphosphate aldolase a été mise en évidence chez toutes les espèces de *Bacteroides* testées.

Le PEP peut ensuite être transformé en acide oxaloacétique par l'intermédiaire d'une PEP-carboxykinase ADP-dépendante, enzyme présente chez les espèces du groupe *fragilis* et chez *P. ruminicola*. Cette réaction s'accompagne d'une libération d'ATP.

La réduction de l'acide oxaloacétique en malate est catalysée par la malate-déhydrogénase NAD-dépendante.

Le fumarate formé à partir du malate peut être alors réduit en succinate par l'intermédiaire de la NADH-fumarate oxydoréductase dépendante du cytochrome b. Cette réaction qui s'accompagne de libération d'ATP, ne peut s'effectuer que si de l'hémine est présente dans le milieu (exception faite pour *R. amylophilus* où l'enzyme est indépendante du cytochrome b et fonctionne aussi bien en présence qu'en l'absence d'hémine).

Le succinate constitue le produit majeur de fermentation des sucres; cependant, il peut être décarboxylé en propionate par l'intermédiaire d'un mécanisme comparable à ce qui se passe chez les genres *Veillonella* ou *Propionibacterium*. Le succinate est alors transformé en succinyl-CoA puis en méthyl-malonyl-CoA par transfert d'un groupement méthyl par la méthyl-malonyl-CoA mutase. La vitamine B₁₂ constituant un cofacteur indispensable à l'activité de cette enzyme.

Quand peu de CO₂ est disponible, l'activité PEP-carboxykinase augmente et le succinate est décarboxylé en propionate et CO₂, ce dernier étant alors recyclé et utilisé pour former du succinate (32).

6.2.1.2 - Autres voies de fermentation.

Le PEP peut être transformé en pyruvate, lui-même réduit en lactate par l'intermédiaire

de la lactate-déhydrogénase à NAD. La décarboxylation oxydative du pyruvate aboutit à la formation d'acétyl-CoA puis d'acétate.

6.2.1.3 - Composition et nature des acides gras volatils issus de la fermentation.

La nature et la composition des produits de fermentation issus de l'utilisation des sucres dépendent : du type de sucre fermenté, du temps de génération lié à la disponibilité en substrat, du pH, de la présence dans le milieu de certains facteurs de croissance tels que l'hémine ou la vitamine B₁₂ et de la concentration en CO₂ (32,90,147).

L'influence du temps de division sur la nature des produits de fermentation du glucose a été étudiée par Kotarski et Salyers sur *B. thetaiotaomicron*. Pour un temps de génération de 3 h 30 mn, les principaux produits de fermentation sont l'acétate et le succinate; lorsque ce temps passe à 28 h, c'est essentiellement du propionate qui est produit (127a).

6.2.2 - Souches de *Bacteroides* ne fermentant pas le glucose.

La plupart des espèces de *Bacteroides* protéolytiques vivant dans la cavité orale n'utilisent pas ou très peu de glucose pour leur métabolisme énergétique. Ceci s'explique par le fait que dans leur environnement naturel, le glucose disponible se trouve à très faible concentration. C'est le cas de *P. gingivalis* qui n'utilise que 3% du glucose disponible dans le milieu pour ses besoins de croissance (227a).

Un autre exemple nous est fourni par une espèce vivant dans le rumen : *R. amylophilus* qui, bien que capable de dégrader l'amidon et le maltose, n'utilise pas le glucose comme source d'énergie (99,107).

6.3 - COMPOSES MUTAGENES OU CANCEROGENES ISSUS DU CATABOLISME DE CERTAINES SUBSTANCES.

Un certain nombre d'études, réalisées sur la flore microbienne du côlon, ont permis de montrer que cette dernière pouvait être en partie responsable de l'apparition du cancer du côlon. En effet, des composés cancérigènes ou co-cancérigènes peuvent apparaître lors du catabolisme microbien des acides biliaires, des graisses, de certains acides aminés à noyau phénolique tels que le tryptophane ou la tyrosine, ou encore de sucres flavonoïdes présents dans les fruits et légumes (quercitine ou rutine) (17,147).

L'hydrolyse de certains sucres flavonoïdes par l' α -rhamnosidase ou la β -glucosidase aboutit à la formation de composés polyphénoliques non sucrés potentiellement mutagènes (Test d'Ames positif). Ces enzymes sont présentes chez certaines bactéries du côlon telles que

B. distasonis, *B. uniformis* et *B. ovatus* (17). Cependant, ces composés peuvent être métabolisés par d'autres bactéries ou inactivés par conjugaison sous forme de sulfates et glucuronides au niveau du foie puis excrétés dans les urines (17). De même, *B. fragilis* possède une nitropyrrène-reductase capable d'inactiver certains agents mutagènes (147).

En conséquence, vu le nombre et la diversité des micro-organismes peuplant le côlon et les interactions qui peuvent exister entre espèces différentes, il est difficile d'attribuer pour chaque espèce, sa part de responsabilité dans l'apparition d'un cancer. Pour le moment, aucune corrélation n'a été faite entre le type de bactéries peuplant le côlon et le risque associé de cancer.

7 - DEGRADATION DES POLYSACCHARIDES.

7.1 - TYPES DE RAPPORTS HÔTE/MICRO-ORGANISME.

Les tractus digestifs des animaux sont des organes dont la fonction est de transformer la nourriture en nutriments directement assimilables par l'organisme. Cette transformation s'effectue principalement par broyage puis hydrolyse chimique et enzymatique des aliments. Cependant, dans la plupart des cas, cette dégradation n'est pas suffisante pour permettre à l'animal de tirer un maximum de profit de la nourriture qu'il ingère.

Ces tractus digestifs, de par leur température, pH, humidité, anaérobiose et approvisionnement en nourriture, constituent d'excellents milieux de culture pour la plupart des micro-organismes capables de fermentation. Ces micro-organismes, par leurs capacités à dégrader des polysaccharides complexes, vont augmenter le potentiel enzymatique de l'hôte.

Trois types de rapports hôte/micro-organisme peuvent exister, il s'agit de rapports de compétition, de coopération, ou mixtes. Ces types de rapports sont déterminés par le régime alimentaire de l'hôte, son potentiel enzymatique et les conditions physico-chimiques régnant à l'intérieur du système digestif de l'hôte.

7.1.1 - Modèle compétitif.

Dans ce modèle, la nourriture ingérée par l'animal contient peu de matériaux d'origine végétale et peut être digérée aussi bien par l'hôte que par les bactéries qui lui sont associées. De ce fait, pour limiter la prolifération microbienne qui diminuerait la quantité de nourriture disponible pour l'hôte, ce dernier secrète dans l'estomac de l'acide chlorhydrique ainsi que des protéases. Cette acidité stomacale a un effet létal sur la plupart des micro-organismes associés à

la nourriture et a pour conséquence de limiter leur entrée dans l'intestin grêle. De plus, les mouvements péristaltiques limitent fortement l'implantation des micro-organismes au niveau de l'intestin grêle (zone d'absorption active des nutriments).

Au niveau du côlon par contre, le nombre de micro-organismes augmente fortement puisqu'ils ne sont plus en compétition directe avec les enzymes digestives de l'hôte. Les bactéries peuvent alors utiliser les aliments non digérés par l'hôte tels que des polysaccharides complexes (cellulose, hémicellulose, pectine...) ou des composés synthétisés par l'hôte comme des mucines et des mucopolysaccharides.

Les *Bacteroides* du tractus digestif de l'homme s'inscrivent dans ce modèle. Ils appartiennent au groupe *fragilis* et représentent 30% de la flore du côlon. Ils sont capables de dégrader un certain nombre de polysaccharides d'origine végétale ou des molécules entrant dans la composition des sécrétions de la muqueuse intestinale. La plupart des enzymes impliquées dans ces dégradations sont inductibles, ce qui permet à la bactérie d'adapter son équipement enzymatique en fonction du substrat disponible tout en limitant les dépenses d'énergie nécessaires aux synthèses d'enzymes. Cette capacité d'adaptation au substrat est très rapide puisque le système de dégradation du chondroïtine sulfate (mucopolysaccharide) de *B. thetaiotaomicron* est opérationnel en 30 mn, le pic d'activité étant atteint au bout de 2 h seulement (207).

La plupart des polysaccharidases sont associées aux cellules ce qui s'explique par les rapports de compétition existant entre espèces capables d'utiliser des substrats identiques. Dans certains cas cependant, les enzymes produites sont extracellulaires quand le substrat possède un poids moléculaire important.

Chez *Bacteroides*, l'hydrolyse de ces polysaccharides s'accompagne d'une production d'acides gras volatils, de vitamines et de certains acides aminés qui sont assimilés avec profit par l'hôte au niveau de la muqueuse intestinale. Ce qui rend la présence de ces micro-organismes bénéfique pour l'hôte.

7.1.2 - Modèle coopératif.

Il s'agit d'un modèle interactif à bénéfice réciproque. On y trouve des animaux consommant de grandes quantités de fibres végétales (ruminants).

Les enzymes digestives des ruminants sont incapables de dégrader les parois des tissus végétaux, en conséquence, la présence de micro-organismes capables de les dégrader est essentielle à la survie de l'hôte. Ceci explique qu'une partie du tube digestif de l'hôte soit aménagée en chambre de fermentation encore appelée rumen et située en aval de l'estomac.

Au niveau du rumen, la quantité de micro-organismes (bactéries, protozoaires et

champignons) est très élevée puisque de l'ordre de 2.10^{10} /ml de jus de rumen. Les micro-organismes présents dans cette poche de fermentation convertissent les matériaux végétaux sous une forme assimilable par l'hôte. Les polysaccharides tels que la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et l'amidon sont dans un premier temps transformés en sucres simples qui seront fermentés en pyruvate par la voie d'Embden-Meyerhoff ou la voie des pentoses phosphates. Le pyruvate est alors converti en acides gras volatils, la nature de ces derniers dépendant des conditions de fermentation et des micro-organismes présents. Les produits majeurs de fermentation sont par ordre d'importance : l'acétate (56 à 70%), le propionate (17 à 29%), et le butyrate (9 à 19%). Du CO_2 (65%) et du méthane (35%) sont également produits lors des fermentations; ces gaz n'ont aucune valeur énergétique pour l'hôte. Les acides gras volatils et l'eau sont absorbés au niveau de l'omasum, les micro-organismes sont lysés au niveau de l'abomasum par des sécrétions acides et de l'intestin grêle par digestion enzymatique; c'est au niveau de ce dernier qu'a lieu l'absorption des acides aminés et protéines microbiennes.

Le genre *Bacteroides* est représenté dans le rumen par les espèces *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes*, *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* et *Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus*. Certaines bactéries telles que *F. succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* ont des spectres trophiques étroits, fermentant de façon prépondérante la cellulose et ses produits de dégradation contrairement à d'autres espèces, qui sont capables d'utiliser une grande variété de substrats différents, telles que *P. ruminicola* ou *Butyrivibrio fibrisolvens* qui fermentent la cellulose, l'hémicellulose, la pectine, l'amidon et d'autres sucres (107).

Le modèle coopératif est donc caractérisé par une coopération hôte/micro-organismes mais également par des relations de compétition et de coopération entre micro-organismes.

7.1.2.1 - Relations de synergisme dans le rumen.

La très grande hétérogénéité des polymères végétaux qui parviennent dans le rumen, nécessite pour être dégradée totalement, la présence d'une multitude d'enzymes que ne peut posséder une seule souche. Les parois végétales étant constituées de polysaccharides intimement liés les uns aux autres, cela signifie que la solubilisation d'un polysaccharide nécessitera la dégradation d'un autre. C'est donc l'action conjuguée de souches ayant des équipements enzymatiques complémentaires, et si possible extracellulaires, qui permettra la dégradation des polymères végétaux.

Ces phénomènes de synergie concernant la dégradation de polysaccharides complexes dans le rumen ont été étudiés par Osborne *et al.* En effet *F. succinogenes* dégrade la cellulose mais ne l'utilise pas contrairement à *P. ruminicola*. Lorsque les 2 souches sont associées, l'utilisation de l'hémicellulose est beaucoup plus importante qu'avec *P. ruminicola* cultivé seul

(176).

On observe le même phénomène concernant la dégradation de la pectine présente dans le fourrage lorsqu'on associe *P. ruminicola* et *Lachnospira multiparus* (176), ou *P. ruminicola* et *Ruminococcus flavefaciens* (82).

Dans d'autres situations, on peut parler d'opportunisme, c'est le cas de *Selenomonas ruminantium* qui utilise les trimères ou tétramères d'acide galacturonique provenant de l'hydrolyse extracellulaire de la pectine par *Streptococcus bovis* (276).

7.1.3 - Modèle mixte ou combiné.

Modèle rencontré chez le cheval, chez les rongeurs, mais aussi chez de nombreux invertébrés tels que les termites. Dans ce cas, les aliments d'origine essentiellement végétale sont dans un premier temps dégradés par l'acidité stomacale et les enzymes digestives de l'hôte, puis par les micro-organismes situés au niveau du caecum et du gros intestin transformés en chambre de fermentation avec absorption active des produits de fermentation.

Le point faible de ce modèle, réside dans le fait que les enzymes digestives de l'hôte ne peuvent lyser les micro-organismes issus de la fermentation puisqu'elles agissent en amont de la chambre de fermentation. De ce fait, les protéines d'origine microbienne sont perdues. Cependant, les animaux pratiquant la coprophagie tels que certains rongeurs ou les termites utilisent avec profit ces protéines microbiennes (107).

7.2 - NATURE DES POLYSACCHARIDES UTILISES PAR LES *BACTEROIDES* DU CÔLON ET ENZYMES IMPLIQUEES DANS CES DEGRADATIONS.

7.2.1 - Présentation.

La plupart des espèces appartenant au genre *Bacteroides* sont capables de dégrader une grande variété de polysaccharides. Ces capacités de dégradation dépendent de la nature du (ou des) substrat(s) disponible(s) et des relations de compétition ou de coopération que partagent les espèces différentes vivant dans la même niche écologique.

Des études nutritionnelles ont établi que plus de la moitié des polysaccharides complexes qui sont ingérés par l'hôte sont dégradés durant leur passage dans le côlon et que cette dégradation est imputable aux bactéries s'y trouvant. Ces polysaccharides constituent d'ailleurs une des seules source de glucides disponible pour les bactéries vivant dans cet écosystème puisque les sucres les plus facilement utilisables (mono- et disaccharides) sont absorbés par la muqueuse intestinale lors de leur passage dans l'intestin grêle. Le genre *Bacteroides* y est

largement représenté car capable d'utiliser un grand nombre de polysaccharides complexes.

B. ovatus et *B. thetaiotaomicron* sont capables de fermenter une grande variété de polysaccharides ou mucopolysaccharides tels que dextran, arabinogalactane de mélèze, pectine, polygalacturonate, chondroïtine sulfate, héparine et hyaluronate (99). Cette capacité d'hydrolyse d'un grand nombre de polysaccharides différents leur permet de s'adapter en permanence aux variations de régime alimentaire de l'hôte et constitue un avantage fondamental vis-à-vis d'autres souches implantées dans le même biotope mais possédant un équipement enzymatique plus restreint.

7.2.2 - Polysaccharides cytoplasmiques.

7.2.2.1 - Amidon.

Il constitue la principale réserve glucidique des végétaux. Son poids moléculaire est très variable et dépend de son origine. Il est constitué par des enchaînements de molécules de glucose reliées par des liaisons en α -1,4. L'amidon peut se présenter sous forme linéaire ou ramifié, dans ce dernier cas, les ramifications se font par une liaison glycosidique α à partir de l'oxydyle de l'alcool primaire situé en position 6.

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon fait appel aux amylases, il en existe essentiellement deux types :

- les α -amylases qui scindent les liaisons glycosidiques 1,4 en s'attaquant aussi bien aux chaînes internes qu'aux chaînes externes et hydrolysent l'amidon en α -maltose, glucose et α -oligodextrines. Elles sont caractéristiques des amylases bactériennes et des sécrétions digestives.

- les β -amylases ou amylases végétales hydrolysent presque complètement l'amylose et pour moitié l'amylopectine, le maltose formé a alors une structure de β -maltose.

- les gluco-amylases ou gamma-amylases capables d'hydrolyser toutes les liaisons α -glucosidiques 1,4 et 1,6 ont été trouvées dans les levures, champignons et lysosomes du foie des animaux.

- les pullulanases qui s'attaquent aux liaisons α -1,6 reliant les unités de maltotriose, le maltotriose étant constitué de trois molécules de glucose reliées par des liaisons en α -1,4. Elles libèrent donc du maltotriose.

Tous les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont capables de dégrader l'amidon. Les systèmes enzymatiques permettant l'utilisation de l'amidon comme source d'énergie ont été largement étudiés chez *B. thetaiotaomicron* et *B. vulgatus*.

* *B. vulgatus* contrairement aux autres espèces utilise un nombre limité de

polysaccharides, ses substrats préférentiels étant l'amylose et l'amylopectine. Les enzymes impliquées dans la dégradation de ces substrats sont l' α -glucosidase et l'amylase. Il s'agit d'enzymes inductibles puisque produites à des taux 20 à 40 fois supérieurs lorsque la souche est cultivée sur maltose, amylose et amylopectine, que sur glucose (156). Ces deux enzymes ont des points isoélectriques identiques et il n'est pas possible de les séparer par purification (156), ce qui laisserait à penser qu'elles forment un complexe dont le poids moléculaire est évalué à 150 kDa, ou qu'une même protéine serait douée de deux activités différentes. En ce qui concerne leur localisation, elle est membranaire pour 40% et cytopériplasmique pour 60%.

* *B. thetaiotaomicron* est capable d'utiliser trois types d'amidon comme seule source d'énergie : amylose, amylopectine et pullulane. Les activités amylase, amylopectinase et pullulanase sont localisées au niveau de l'espace périplasmique et les activités α -glucosidase et maltase au niveau du cytoplasme (6). L'activité pullulanase est inductible, possède un pH optimum de 6,5 et à un poids moléculaire de 77 kDa (235). Récemment une activité néopullulanase a été mise en évidence. Il s'agit d'une enzyme soluble, de 70 kDa, qui coupe les liaisons glycosidiques en α -1,4 du pullulane, de l'amylose et des oligosaccharides résultant de l'action des α -amylases (236).

Anderson et Salyers ont mis en évidence l'existence de protéines de fixation de l'amidon au niveau de la membrane externe. Ces récepteurs jouant le rôle de sites d'accrochage pour l'amidon ou ses dérivés oligomériques, sont saturables. De plus, la synthèse de ces récepteurs est induite par le maltose, tout comme celle des enzymes de dégradation de l'amidon. Le rôle de ces sites est essentiel puisque des mutants possédant les enzymes de dégradation de l'amidon mais dépourvus de récepteurs deviennent incapables de l'utiliser (7).

Il existe deux types de sites de fixation :

- les sites de type A qui fixent préférentiellement les polymères de haut poids moléculaire.

- les sites de type M qui ont une forte affinité vis-à-vis des maltodextrines de faible degré de polymérisation (G4 à G7). Les gènes codant pour les protéines de fixation de l'amidon ainsi que ceux codant pour les enzymes de dégradation de l'amidon sont soumis aux mêmes contrôles de régulation.

Chez *B. thetaiotaomicron*, l'utilisation de l'amidon passe donc par une première étape de fixation au niveau des membranes externes, suivie d'une pénétration vers l'espace périplasmique où il peut y être transformé par les enzymes de dégradation de l'amidon (amylase, amylopectinase et pullulanase).

7.2.2.2 - Cyclodextrines.

Il s'agit d'oligosaccharides cycliques dérivés de l'amidon, qui comportent de nombreux

groupements hydroxyles dirigés vers l'intérieur du cycle et constitués au minimum de 6 unités de glucose reliées par des liaisons en α -1,4. Les entités les plus fréquentes contiennent 6 molécules de glucose (alpha-cyclodextrine), 7 (bêta-cyclodextrine) ou 8 (gamma-cyclodextrine). Ces molécules sont utilisées comme agents stabilisants dans le domaine alimentaire et pharmaceutique. De par leur structure cyclique, les cyclodextrines ne sont que très faiblement dégradées par les amylases salivaires et intestinales. L'hydrolyse de ces molécules s'effectue au niveau du côlon et s'accompagne de libération d'acides gras volatils.

Antenucci et Palmer ont étudié la dégradation des α et β -cyclodextrines par *B. ovatus* et *B. distasonis* (9). Les cyclodextrinases de ces deux espèces sont stables et très actives à pH 6,8 et à 37°C. Leur localisation est intracellulaire et aucune activité n'est décelée lorsque la souche est cultivée sur glucose; il s'agit donc d'enzymes inductibles.

Les modes d'action des enzymes synthétisées par *B. distasonis* et *B. ovatus* diffèrent. En effet, au bout de 18 h d'incubation à 37°C et à pH 6,8, les produits de dégradation des α ou β -cyclodextrines sont le glucose pour *B. ovatus* et le glucose, maltose et maltotriose pour *B. distasonis* (9). Ces enzymes ont d'ailleurs des températures optimales différentes : 55°C pour la cyclodextrinase de *B. distasonis* et 42°C pour celle de *B. ovatus*.

7.2.3 - Polysaccharides pariétaux.

7.2.3.1 - Hémicellulose.

Le nom d'hémicellulose désigne un groupe hétérogène de polysaccharides ramifiés qui se lient étroitement aux microfibrilles de cellulose et aux molécules de pectine, et pouvant représenter jusqu'à 40% de la teneur en hydrates de carbone chez certaines plantes fourragères. Il existe de nombreuses classes d'hémicelluloses, toutes possèdent un long squelette linéaire de type cellulosique composé de molécules de D-xylopyranose liées en β -1,4 (xylane), ainsi que de courtes chaînes latérales constituées par d'autres glucides (xylose, fucose, galactose, arabinose ou rhamnose).

Un nombre restreint d'espèces appartenant au genre *Bacteroides* sont capables de dégrader l'hémicellulose. Il s'agit essentiellement d'espèces vivant dans le rumen telles que *P. ruminicola* et *F. succinogenes* mais également d'espèces rencontrées dans le colon humain telles que *B. eggerthii* et *B. ovatus* (207a). Cette dégradation est rendu possible par la présence d'une xylanase que possèdent *F. succinogenes*, *P. ruminicola*, *Bacteroides xylanolyticus* et *B. ovatus*. L'utilisation de ce composé nécessite en plus la présence d'une xylosidase et d'une arabinosidase dont est pourvu *B. ovatus* (269).

7.2.3.2 - Galactomannanes.

Les galactomannanes sont des polyosides végétaux de poids moléculaire élevé, constitués de molécules de mannose unies par des liaisons en β -1,4 et de radicaux d' α -galactose en proportion variable, attachés en 6 sur la chaîne des mannoses, à l'origine de la formation de structures branchées. La gomme guar est un galactomannane de haut poids moléculaire que *B. ovatus* est capable de dégrader.

La dégradation de ce polysaccharide nécessite l'intervention de deux types enzymes :

- * α -galactosidase qui élimine les résidus galactose.

- * β -mannanase qui dépolymérise la structure linéaire du squelette mannane.

B. ovatus est capable de produire deux α -galactosidases différentes qui sont inductibles, solubles et associées à la cellule. En présence de gomme guar, il synthétise une α -galactosidase I représentant 90% de l'activité α -galactosidase totale tandis que, cultivé sur galactose, mélibiose, raffinose ou stachiose, il produit une α -galactosidase II. Ces deux enzymes existent sous forme de trimère à l'état natif, ont des pH optima identiques mais des pI et des poids moléculaires différents (76). Ces enzymes sont en outre capables d'éliminer les résidus galactose de la gomme guar à condition que celle-ci ait été préalablement dégradée par la β -mannanase.

L'activité mannanase de *B. ovatus* est essentiellement présente au niveau des membranes externes (77). Elle est formée de 3 polypeptides majeurs de 95, 61 et 43 kDa et fonctionne selon le mode endo, puisque libérant des oligosaccharides de haut poids moléculaire. La 2^{ème} activité mannanase de *B. ovatus* est soluble et associée à la cellule. Elle est formée de 3 monomères de 61 kDa et possède un pI de 4,8 contre 6,9 pour la mannanase membranaire (78).

Une activité α -galactosidase extracellulaire a été mise en évidence chez *B. fragilis*. Cette enzyme possède des caractéristiques différentes de celle de *B. ovatus* à savoir un pH optimum de 5,5, un pI de 6,2 et un PM de 125 kDa pour la protéine non dénaturée (13).

7.2.3.3 - Laminarine.

Il s'agit d'un polymère de glucose en β -1,3, extrait de certaines algues appartenant à la famille des laminaires.

La dégradation de ce polysaccharide nécessite la présence d'un complexe enzymatique comprenant 3 activités principales :

- * endoglucanase qui engendre la formation d'oligosaccharides constitués d'au moins 2 unités de glucose.

- * exoglucanase qui procède par dégradation récurrente à partir des extrémités terminales

réductrices du substrat.

* β -glucosidase hydrolysant les di- ou trisaccharides avec formation de glucose.

L'activité laminarase a été étudié par Salyers *et al.* chez *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis* et *B. fragilis*. Il s'agit d'un complexe multi-enzymatique intracellulaire et inductible par la laminarine ou les oligosaccharides dérivant de son hydrolyse. Son mode d'action diffère selon les espèces, libérant du glucose chez *B. thetaiotaomicron* et des oligosaccharides chez *B. distasonis* (205).

7.2.3.4 - Pectines.

De nombreuses espèces de *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis*, de même que certaines espèces du rumen et deux espèces nouvellement décrites sont capables de dégrader les pectines (Tableau 3). Les caractéristiques physico-chimiques des pectines seront décrites dans le chapitre 8, le chapitre 9 sera consacré quant à lui, à la description des différentes enzymes impliquées dans la dégradation des pectines et à la présentation de leurs caractéristiques biochimiques, que ce soit chez *Bacteroides* ou chez d'autres genres bactériens.

7.2.4 - Mucopolysaccharides.

Les mucopolysaccharides (MPS) entrent dans la composition du tissu collagène, des cartilages, des mucus et sécrétions digestives. Ils contiennent toujours une osamine (D-glucosamine ou D-galactosamine) et un acide uronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique). La liaison glycosidique du diholoside de base est : soit du type α (héparine, héparane sulfate), soit du type β (acide hyaluronique, dermatane-sulfate, chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate). Le caractère acide est dû à l'existence de groupements carboxyliques, sulfuriques ou des deux. Les MPS confèrent au tissu conjonctif sa structure et entrent dans la composition des sécrétions de la muqueuse intestinale.

Un certain nombre de micro-organismes vivant dans le côlon sont capables d'utiliser ces MPS. La dégradation de ces MPS nécessite la présence d'un certain nombre d'enzymes dont sont pourvus *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, les *Bacteroides* du groupe 3452A ainsi qu'une souche de *Bacteroides* isolée de la cavité orale (141,142,245).

B. thetaiotaomicron ne fermente pas les glycoprotéines qui sont similaires à celles que l'on trouve associées aux mucines, ce qui explique qu'il ne soit pas considéré comme un utilisateur important de ces mucopolysaccharides. Des expériences de mutagenèse chimique et par transposition, réalisées par Salyers *et al.*, ont d'ailleurs prouvé que des mutations touchant les gènes impliqués dans la synthèse des enzymes de dégradation des mucines ne sont pas

Souche/ Origine	Type d'activité/ Localisation	Caractéristiques/ Produits formés	Réf.
<i>B. pectinophilus</i> Côlon	PME Extracellulaire	Polygalacturonate	115,
	ExoPL Extracellulaire	pH 9,0 à 9,5; Ca ⁺⁺ ; inductible; trigalac- turonate insaturé	116
<i>B. galacturonicus</i> Côlon	PME Extracellulaire	Polygalacturonate	115,
	ExoPL Extracellulaire	pH 8,2 à 8,5; Ca ⁺⁺ ; inductible; trigalac- turonate insaturé	116
<i>B. thetaiotaomicron</i> Côlon	EndoPL Cytoplasmique	pH 8,7; 74 kDa; pI 7,5; Ca ⁺⁺ ; inductible; digal- lacturonate insaturé	154
	EndoPG Membranaire	pH 5,4; pI 4,7 à 4,9; inductible; galacturonate	
<i>B. ovatus</i> Côlon	EndoPL Cytoplasmique	pH 8,4 à 8,8; pI 7,2; Ca ⁺⁺ ; 50 kDa; induc- tible; digal. insaturé	155
<i>B. fragilis</i> Côlon	EndoPL Cytoplasmique	Idem sauf pI 6,1	155
<i>B. vulgatus</i> Côlon	EndoPL Cytoplasmique	Idem sauf pI 7,7	155
<i>B. sp. 3452A</i> Côlon	EndoPL Cytoplasmique	Idem sauf pI 5,8	155
<i>P. ruminicola</i> Rumen	PME Extracellulaire	Polygalacturonate	271
	EndoPL Extracellulaire	pH 8,0 à 8,5; Ca ⁺⁺ ; digal. insaturé	271
	EndoPG	Galacturonate	272

Tableau 3. Caractéristiques des différentes enzymes pectinolytiques produites par les espèces appartenant ou ayant appartenu au genre *Bacteroides*.

létales pour *B. thetaiotaomicron* (211).

7.2.4.1 - Chondroïtine-sulfate.

Il est constitué par une unité diholosidique de base comportant une molécule d'acide D-glucuronique unie par une liaison β -1,3 à une molécule de N-acétyl-galactosamine sulfatée en C4 (chondroïtine-sulfate A), ou en C6 (chondroïtine-sulfate C). La réunion des unités diholosidiques se fait par une liaison β -1,4 galactosaminidique. Au niveau des tissus, les molécules de chondroïtine-sulfate A et C sont liées de façon covalente aux protéines par l'intermédiaire de ponts contenant des résidus de galactose, xylose et sérine. Le poids moléculaire des chondroïtine-sulfates varie entre 10 et 20 kDa.

L'utilisation du chondroïtine-sulfate requiert l'action conjuguée de trois types d'enzymes différentes :

- la chondroïtine lyase qui dégrade le sulfate de chondroïtine en disaccharides sulfatés insaturés.

- la sulfatase qui élimine les résidus sulfates présents au niveau des C4 ou C6 des disaccharides.

- la β -glucuronidase qui libère des molécules de N-acétyl-glucosamine et d'acide glucuronique insaturé en 4,5, à partir des disaccharides dé-sulfatés.

La dégradation du chondroïtine-sulfate a surtout été étudiée chez *B. thetaiotaomicron*. Lorsqu'il est cultivé sur chondroïtine-sulfate, *B. thetaiotaomicron* produit les chondroïtine lyases I et II, une chondroïtine sulfatase ainsi qu'une glucuronidase. Il s'agit d'enzymes intracellulaires à localisation périplasmique pour la lyase et cytoplasmique pour la sulfatase et la glucuronidase (206). Toutes ces enzymes sont inductibles par le chondroïtine-sulfate et ses produits de dégradation (207).

A - Activités chondroïtine lyases de *B. thetaiotaomicron*.

Il s'agit d'enzymes microconstitutives puisque des niveaux d'activité spécifique de l'ordre de 0,06 à 0,08 U/mg de protéine sont observés lorsque la souche est cultivée sur glucose. Les gènes gouvernant la synthèse de ces enzymes sont inductibles, puisqu'en présence de chondroïtine-sulfate, l'activité spécifique lyase est multipliée par 10 en 1 h 30 mn (207). D'autre part, le niveau d'activité spécifique dépend du temps de génération puisque cette activité spécifique diminue de 40%, lorsque le temps de génération passe de 12 h à 24 h (208). Les oligosaccharides de degré de polymérisation supérieur ou égal à 8, jouent le rôle de substrats inducteurs au même titre que le chondroïtine-sulfate (207). L'inductibilité est perdue en présence d'oxygène bien que ces enzymes y soient insensibles (207).

La chondroïtine lyase I possède un poids moléculaire (PM) de 115 kDa, un pH optimum

de 7,2 aussi bien sur chondroïtine sulfate A (CSA) que sur CSC et un Km de 0,05 mg/ml pour les deux substrats. La chondroïtine lyase II possède quant à elle, un PM de 109 kDa, un pH optimum de 7,6 pour les deux substrats et un Km identique à celui de la chondroïtine lyase I (142).

Salyers et O'Brien ont pu démontrer que ces enzymes étaient périplasmiques, puisque libérées par traitement des bactéries au lysozyme et à l'EDTA et non localisées au niveau des membranes externes. Ce qui est confirmé par le fait que le sodium polyanéthole sulfonate (SPS), n'a aucun effet *in vivo* sur l'utilisation du chondroïtine sulfate chez *B. thetaiotaomicron* bien qu'il s'agisse d'un inhibiteur de l'activité chondroïtine lyase (206).

Cette localisation intracellulaire pose de nouveau le problème du passage de molécules de taille importante et chargées négativement au travers de la membrane externe. Kotarski *et al.* ont suggéré l'existence probable de récepteurs localisés au niveau des membranes externes, facilitant le passage du chondroïtine-sulfate vers l'espace périplasmique (129). En effet, lorsque *B. thetaiotaomicron* est cultivé sur chondroïtine-sulfate, le profil protéique de l'électrophorèse bidimensionnelle des membranes externes présente 11 taches supplémentaires par rapport au témoin cultivé sur glucose ou acide glucuronique. Deux de ces polypeptides sont également présents lorsque la souche est cultivée sur polygalacturonate. La synthèse de ces polypeptides membranaires paraît donc régulée de façon coordonnée avec celle des enzymes de dégradation des polysaccharides complexes et ne paraît pas spécifique d'un polysaccharide particulier.

B - Activités chondroïtines lyases présentes chez d'autres espèces de *Bacteroides*.

B. ovatus et *Bacteroides* sp. 3452A possèdent également des chondroïtine lyases I et II. Ces enzymes ont des caractéristiques très proches de celles de *B. thetaiotaomicron* puisqu'ayant des pH optima compris entre 7,2 et 7,6, des PM compris entre 106 et 115 kDa et des Km compris entre 0,04 et 0,12 mg/ml. Elles sont également inductibles par le chondroïtine-sulfate et ses produits de dégradation et sont associées aux cellules. Cependant, elles diffèrent de celles de *B. thetaiotaomicron* par les profils de digestion peptidiques et par l'absence d'hybridation entre les gènes responsables de la synthèse des lyases. De plus, des anticorps réalisés à partir de la chondroïtine lyase II de *B. thetaiotaomicron* ne présentent pas de réaction croisée avec les chondroïtine lyases I et II de *B. ovatus* et de *Bacteroides* sp. 3452A (142).

7.2.4.2 - Acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique est constitué de molécules d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-glucosamine, unies par une liaison β -1,3 formant l'acide hyalobiuronique. Ces unités diholosidiques sont réunies par des liaisons glucosaminidiques en β -1,4 pour former le polymère.

La hyaluronidase bactérienne (*Pneumococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*) est une endo-poly- β -hexosaminidase; cette enzyme n'agit que sur l'acide hyaluronique et la chondroïtine. Cette enzyme est également connue sous le nom de hyaluronate lyase puisque libérant des disaccharides insaturés.

B. thetaiotaomicron, *B. ovatus* et *Bacteroides* sp. 3452A sont capables de fermenter l'acide hyaluronique, les propriétés de (ou des) enzyme(s) impliquée(s) dans ces dégradations n'ont pas été étudiées. On dispose cependant de plus d'informations, concernant les caractéristiques d'une enzyme isolée d'une souche de *Bacteroides* vivant dans la cavité orale et capable de dégrader l'acide hyaluronique. Cette enzyme possède un PM de 89 kDa, un pI de 7,0 et un pH optimum de 6,5. Les ions divalents tels que Ca^{++} et Mg^{++} ont un effet activateur sur l'activité contrairement aux ions Mn^{++} . L'acide hyaluronique est plus rapidement dégradé que le chondroïtine-sulfate A ou C. Par contre, aucune activité n'a pu être mise en évidence sur chondroïtine-sulfate B, héparine et héparane-sulfate. Les principaux produits d'hydrolyse étant des disaccharides insaturés (247).

7.2.5 - Autres polysaccharides.

7.2.5.1 - **Dextrans.**

Il s'agit d'un polymère de glucose de haut poids moléculaire. Au niveau de la chaîne principale, les molécules de glucose sont liées en α -1,6, des ramifications à l'origine de structure branchées existent et sont attachées à la chaîne principale par des liaisons α -1,3. Les dextrans sont produits par certaines bactéries de la cavité buccale appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Streptococcus* à l'aide d'une dextran-sucrase; ces dextrans participent à la formation de la plaque dentaire et servent de support d'attachement pour la colonisation bactérienne de cette plaque.

Les dextranases sont produites par une grande variété de micro-organismes tels que des champignons, levures et bactéries. Il s'agit d' α -1,6-glucanohydrolases fonctionnant selon les modes endo ou exo et de mutanases qui sont des enzymes de débranchement.

P. oralis et *Capnocytophaga* (*Bacteroides*) *ochracea* disposent d'une endo-dextranase périplasmique possédant un PM de 52 kDa, d'une exo-dextranase cytoplasmique d'un PM de 44 kDa ainsi que d'une mutanase cytoplasmique (244,245).

7.3 - **PROBLEMES LIES A LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA PLUPART DES POLYSACCHARIDASES DE BACTEROIDES.**

Les systèmes enzymatiques de dégradation des polysaccharides, qui sont associés aux

cellules plutôt qu'extracellulaires, sont largement répandus dans la nature et plus particulièrement dans les écosystèmes où les relations de compétition entre micro-organismes sont importantes, comme c'est le cas du côlon humain ou du rumen. Dans de tels biotopes, la production d'enzymes extracellulaires ne constitue pas un avantage, dans la mesure où les produits de dégradation peuvent être rapidement utilisés par d'autres bactéries. Ceci explique, que chez *Bacteroides*, la plupart des enzymes de dégradation des polysaccharides soient intracellulaires (6,7,9,84,102,129,154,155,166,206,244,245,270).

Dans le cas de *B. thetaiotaomicron* et des autres espèces de *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis*, les enzymes impliquées dans la dégradation du polygalacturonate (PGA), de l'amidon, et du chondroïtine-sulfate (CS) sont intracellulaires. Il se pose alors le problème de savoir comment ces molécules de grande taille et chargées négativement dans le cas du PGA et du CS, sont capables de passer à travers la membrane externe et ainsi d'entrer en contact avec les enzymes de dégradation.

Kotarski et Salyers ont mis en évidence une augmentation de concentration concernant certains polypeptides localisés au niveau des membranes externes, lorsque *B. thetaiotaomicron* est cultivé sur PGA (128). Ces récepteurs sont vraisemblablement impliqués dans le passage du PGA vers l'espace périplasmique, tout comme ceux mis en évidence lors de l'utilisation de l'amidon (6,7) ou du CS (129,142).

Mais se pose alors un autre problème, celui de l'induction des gènes responsables de la synthèse de ces récepteurs. McCarthy *et al.* ont réalisé des expériences d'induction des enzymes de dégradation des pectines chez *B. thetaiotaomicron* en utilisant différents substrats de croissance tels que le PGA, le glucose ou l'acide galacturonique. Dans tous les cas, les activités pectate lyase (PL) et polygalacturonase (PG) sont détectables, les niveaux d'activité étant cependant 30 à 50 fois plus faibles, lorsque les bactéries sont cultivées sur glucose ou sur acide galacturonique (154). Ces phénomènes d'induction sont également observés, dans le cas de l'utilisation de l'amidon (156) ou du CS (207). On peut donc parler d'activités inductibles et microconstitutives.

Cette "microconstitutivité" permet d'expliquer que lorsque les bactéries sont mises en contact avec le substrat, les activités spécifiques augmentent très rapidement, c'est-à-dire dans les 15 à 30 mn qui suivent l'exposition au PGA dans le cas des PL et PG de *B. thetaiotaomicron* (154). En effet, les faibles quantités d'enzymes présentes dans le milieu extracellulaire vont être à l'origine de la formation des inducteurs réels (oligosaccharides), qui vont pouvoir pénétrer dans la bactérie et induire rapidement les gènes responsables de la synthèse des enzymes de dégradation du polysaccharide (287) et des récepteurs membranaires dans le cas où ces enzymes sont intracellulaires.

Il est possible, à partir de toutes ces constatations, d'imaginer une séquence d'événements permettant d'expliquer les phénomènes d'induction des gènes responsables de la dégradation de

ces polysaccharides et de l'entrée de ces derniers dans la bactérie.

1. Libération des enzymes normalement intracellulaires dans le milieu extérieur par autolyse des bactéries.

2. Formation d'oligosaccharides par dégradation des polysaccharides.

3. Pénétration de ces molécules à l'intérieur de la bactérie.

4. Induction des gènes impliqués dans la synthèse des récepteurs membranaires facilitant le passage des polysaccharides et dans la synthèse des enzymes de dégradation.

5. Entrée du polysaccharide dans la bactérie et dégradation de ce dernier.

Dans ce modèle, ce n'est pas le polysaccharide qui se comporte comme un inducteur mais ses produits de dégradation.

8 - LES PECTINES.

8.1 - DEFINITION ET LOCALISATION.

Le mot pectine provient du grec pektos qui signifie gelée, ferme, rigide. En effet, c'est le français J. Braconnot qui l'isola en 1825 à partir d'extraits végétaux et la baptisa pectine, faisant ainsi allusion à sa caractéristique essentielle, celle de former des gels.

Les pectines constituent le troisième type majeur de polysaccharides de la paroi des végétaux. Il s'agit de polysaccharides hétérogènes, ramifiés, très hydratés et qui sont associées aux autres composés pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine) par des liaisons chimiques ou physiques, pour former un ciment intercellulaire dans la lamelle moyenne et une membrane dans la paroi primaire. Dans les tissus végétaux, les substances pectiques sont présentes sous une forme insoluble appelée protopectine; la conversion de cette dernière en pectine soluble, pectate et dérivés oligomériques d'acide galacturonique est un des mécanismes jouant un rôle important dans la maturation ou les processus d'infection des plantes.

La teneur en pectines varie selon l'origine du produit végétal, elle peut représenter jusqu'à 10% de la matière sèche de certains fourrages et ne constitue pas un facteur limitant pour la digestion des parois cellulaires des végétaux contrairement à l'hémicellulose ou la lignine. Les sous-produits des industries agro-alimentaires les plus riches en pectines (teneur supérieure à 15% en poids sec) sont le marc de pomme, l'écorce des agrumes, les capitules de tournesol et les pulpes de betterave (221,250).

8.2 - STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE DES PECTINES.

Il s'agit d'un polymère de masse moléculaire élevée (20 à 360 kDa) constitué par un enchaînement linéaire de molécules d'acide α -D-galacturonique reliées par des liaisons en α -1,4 ; cette chaîne constitue l'acide polygalacturonique (PGA) ou acide pectique ou galacturonane. Elle possède une extrémité réductrice puisque le carbone 1 d'un des motifs situés à l'extrémité terminale porte une fonction pseudo-aldéhydique non engagée dans une liaison.

Les substances pectiques ont en général une structure plus complexe résultant de la substitution de certains groupes sur la chaîne principale. La présence de β -L-rhamnose en 1,2, qui peut servir de site d'attachement aux pectines neutres (arabinogalactanes), a pour conséquence une déviation de l'axe de l'hélice voisine de 90° , appelée "coude pectique"; c'est cette particularité de structure qui facilite la formation d'un réseau tridimensionnel gélifié (Figure 1 B et figure 3 A).

Aux fonctions hydroxyles portées par les carbones 2 et 3 du motif principal ou par le carbone 4 du rhamnose, sont parfois liés des sucres neutres (arabanes, galactanes, xylanes...) ainsi que des groupes acétyles (Figure 2 B). Ces sucres neutres introduisent des ruptures dans les chaînes qui servent de sites d'attachement pour les pectines neutres. Ces dernières lient les molécules de pectines à l'hémicellulose (Figure 1 A).

Les fonctions acides sont souvent neutralisées par des ions mono- ou divalents formant alors des sels ou pectates. Ces mêmes fonctions peuvent être estérifiées à différents degrés par le méthanol et on définit le degré d'estérification (D.E) comme le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour 100 motifs d'acide anhydro-galacturonique de la chaîne principale. Ce paramètre est d'ailleurs un des critères essentiels utilisés pour la classification des substances pectiques :

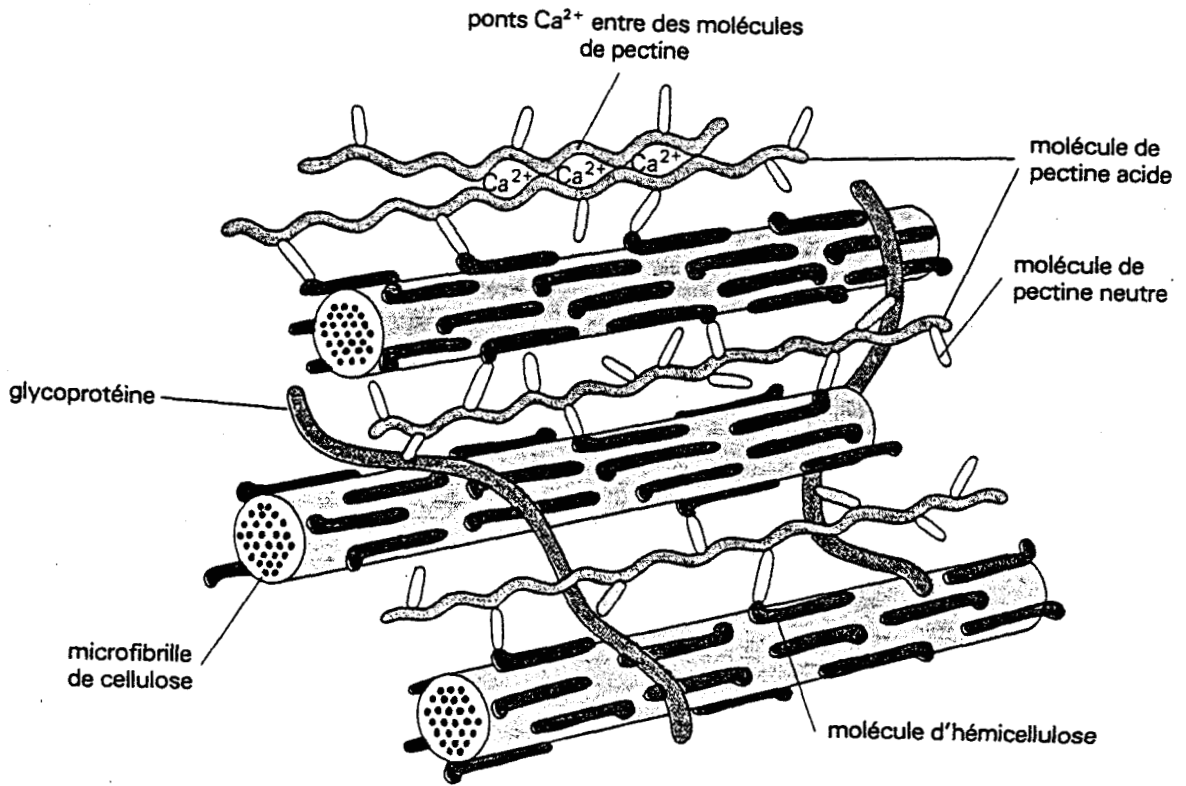
- D.E < 3,5% = Acide pectique ou PGA.
- 3,5% < D.E < 50% = Pectine faiblement méthylée ou LMP
- D.E > 50% = Pectine hautement méthylée ou HMP.

Dans la nature, les pectines existent sous forme hautement méthylée. Parfois des groupes amidés apparaissent à la place des groupes méthoxyles; cette substitution est due au procédé de déméthylation en milieu ammoniacal.

8.3 - PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES PECTINES.

La propriété principale des pectines est de former des gels dont les caractéristiques dépendent du milieu et du type de pectine utilisée. En effet, les pectines forment, selon le contexte physico-chimique et leur concentration : une solution apparente, une dispersion visqueuse ou un gel. La viscosité de la solution dépend de la concentration en pectine, de la

A



B

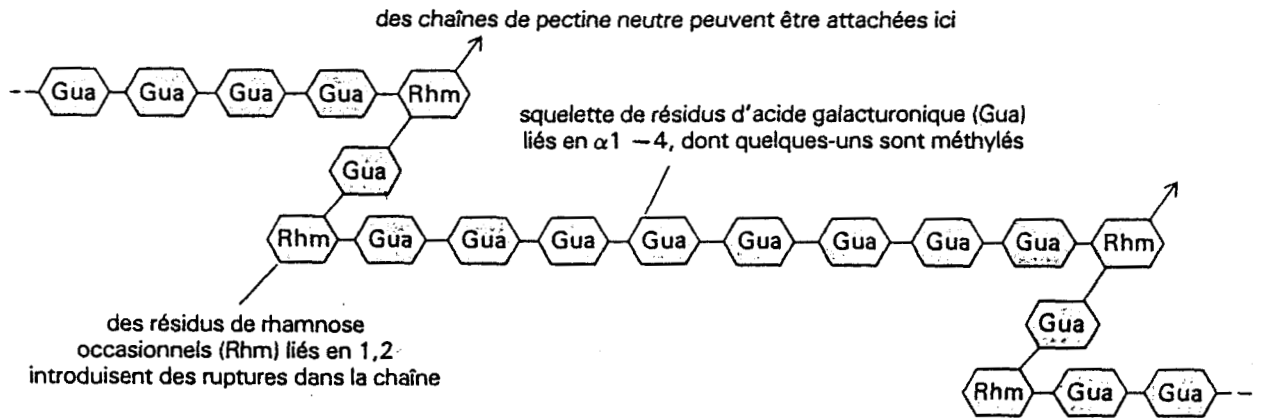
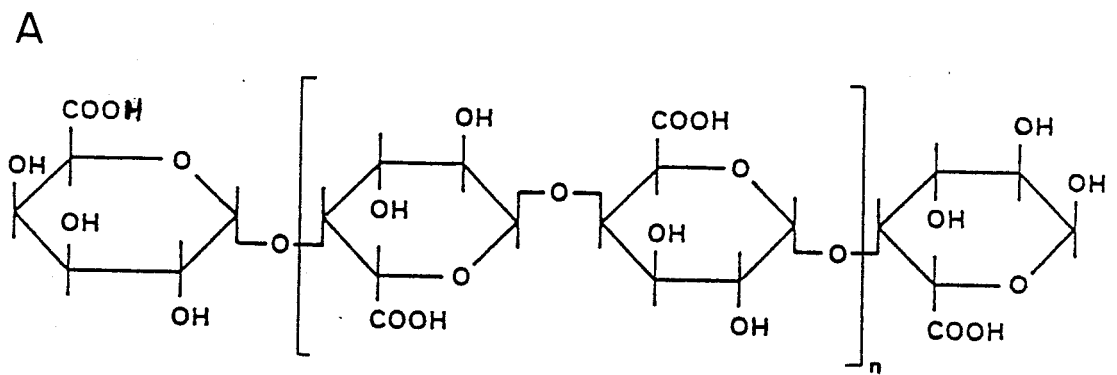


Figure 1.

A - Structure et composition chimique de la paroi des végétaux supérieurs. Pectine neutre = arabinogalactane. Pectine acide = rhamnogalacturonane.

B - Exemple de pectine acide (rhamnogalacturonane). Des ruptures dans la chaîne pectique sont introduites par des résidus de rhamnose, ces derniers servent aussi de sites d'attachement pour les pectines neutres.



B

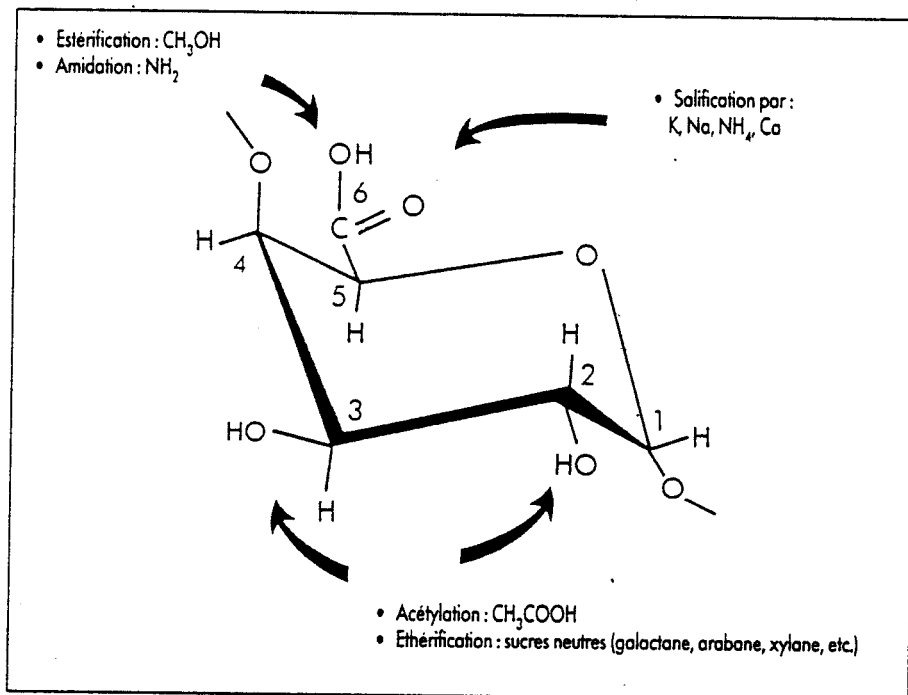
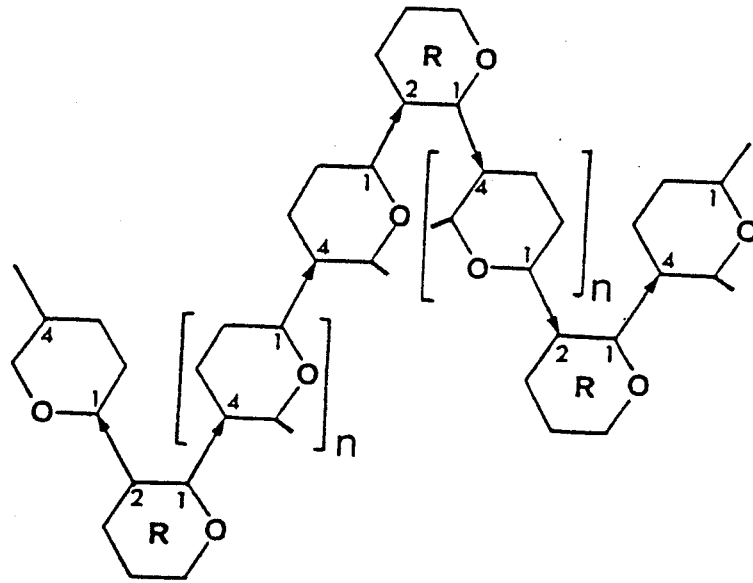


Figure 2.

A - Structure de l'acide polygalacturonique.

B - Substitutions pouvant s'opérer sur l'acide α -D-galacturonique.

A



B

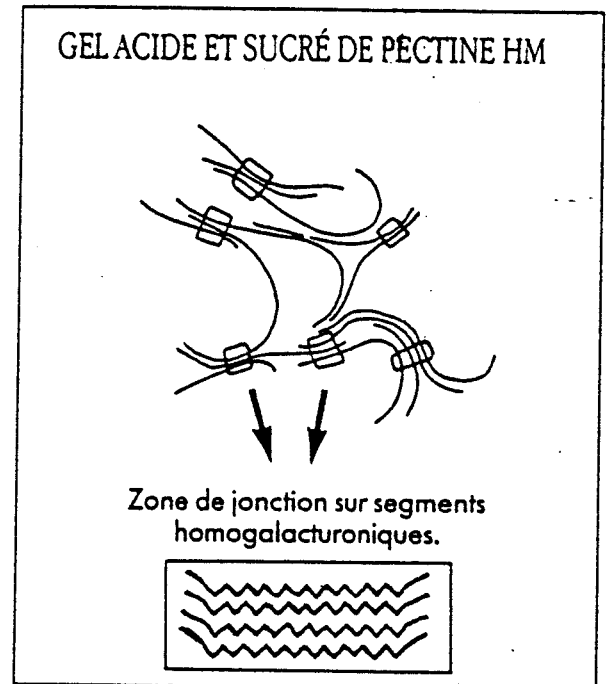
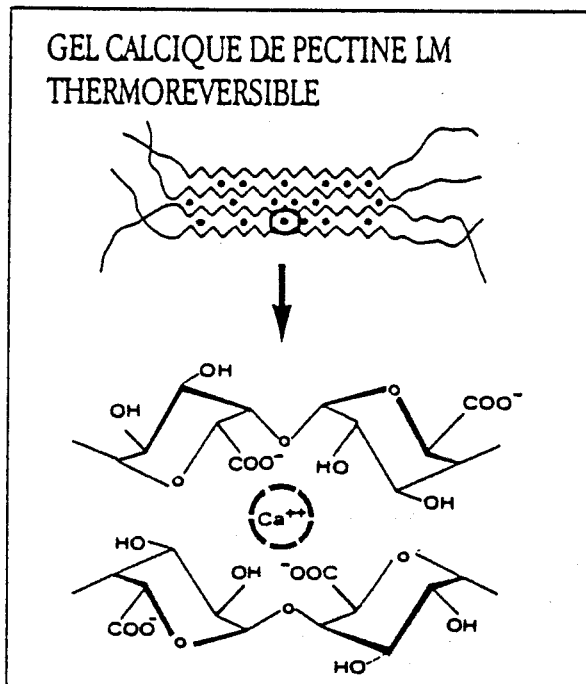


Figure 3.

A - Coude pectique dû à la nature des liaisons existant entre le rhamnose et l'acide galacturonique et caractérisé par une déviation de l'axe de la chaîne pectique de 90°.

B - La présence de ces coudes pectiques facilite la formation d'un réseau tridimensionnel gélifié. Les conditions de gélification varient principalement selon le degré d'estérification de la pectine (HM : hautement méthylée et LM : faiblement méthylée).

température, du poids moléculaire, du D.E, du pH et de la présence de certains ions divalents tels que Ca^{++} et Mg^{++} pour les pectines LM.

Les pectines HM forment des gels irréversibles en milieu acide (pH compris entre 2,2 et 3,5) et très sucrés (teneur en sucres supérieure à 60%) alors que les pectines LM forment des gels thermoréversibles en présence d'ions divalents (Ca^{++} ou Mg^{++}) (Figure 3 B). Ici, le pH et la teneur en sucres sont des facteurs secondaires qui vont influencer la vitesse et la température des gélification ainsi que la texture du gel. Dans le cas des pectines LM, les ions divalents prennent part à des liaisons avec deux molécules de pectine au niveau des groupements carboxyliques pour former des ponts, c'est le modèle de la "boîte à oeufs" proposé par Rees. Le gel d'une pectine LM est plus structuré mais plus friable que celui d'une pectine HM qui est plus souple et plus solide.

De plus, la solubilité des pectines est proportionnelle à leur degré d'estérification. Les solutions de pectines sont stables à pH acide (2,5 à 4,5) même à température élevée; par contre, à pH neutre ou basique, des dégradations spontanées telles que déméthylation ou dépolymérisation se produisent.

8.4 - UTILISATION DES PECTINES DANS LE DOMAINE INDUSTRIEL.

Du fait de son pouvoir gélifiant élevé, la pectine trouve une utilisation pratique dans l'industrie alimentaire (confiserie, fabrication des confitures, des gélatines de fruits, des sucres de fruits et des glaces) et pâtisserie (produits de fourrage et de nappage). Elle est employée comme stabilisant des émulsions et comme succédané des mucilages et des caoutchoucs, dans la préparation des apprêts et de produits analogues dans l'industrie textile. Elle est également utilisée dans les domaines pharmaceutique (pommade, fabrication de vitamine C) et médical (actions physiologiques diverses), pour la fabrication des milieux de culture pour micro-organismes et en parfumerie.

8.5 - ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DES PECTINES (221).

Les pectines jouent un rôle important dans l'équilibre physiologique humain, étant responsables entre autres d'une :

- Diminution du taux de cholestérol sanguin et de celui des lipides dans le foie en limitant leur absorption au niveau de l'intestin entraînant de ce fait, une augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol.

- Action régulatrice de la glycémie en ralentissant l'absorption du glucose.

- Action anti-diarrhéique par phénomène d'absorption d'eau et "effet détoxifiant".

- Protection de la muqueuse gastrique par formation d'un film protecteur au niveau des

parois gastriques.

- Interaction avec le métabolisme intestinal des ions par fixation de ces derniers sur les pectines.

- Interaction positive avec les médicaments en augmentant leur durée d'absorption par libération progressive des principes actifs.

9 - LES ENZYMES PECTINOLYTIQUES.

9.1 - PRESENTATION.

De très nombreux micro-organismes parmi lesquels on trouve des bactéries, champignons et levures, ainsi que les végétaux eux-mêmes, produisent des enzymes pectinolytiques. Ces micro-organismes vivent dans des biotopes très diversifiés en tant que décomposeurs dans les sols et lacs (*Clostridium*) (113,182,217) ou en tant que bactéries (*Agrobacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*) ou champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia*) (75,158,218,232). Les pectines sont également dégradées par certaines bactéries du rumen ou du côlon appartenant entre autres au genre *Bacteroides*. Ces enzymes jouent des rôles très importants dans les processus de maturation, d'infection et de dégradation des végétaux (44,75).

Dans la nature, la dégradation des pectines nécessite l'action conjuguée d'un nombre important d'enzymes ayant des modes d'action différents et complémentaires, comprenant les pectinases mais également des cellulases, hémicellulases et protéases. En effet, les pectines sont étroitement associées à des molécules de cellulose, hémicellulose et glycoprotéines au niveau des parois cellulaires des végétaux, ce qui explique que les micro-organismes phytopathogènes et décomposeurs possèdent un équipement enzymatique complet.

Dans le côlon et le rumen, la situation est quelque peu différente, puisque de nombreux micro-organismes possédant des équipements enzymatiques différents cohabitent, ce qui explique que la plupart des souches isolées à partir de ces habitats et capables de dégrader les pectines ne possèdent qu'un équipement enzymatique restreint. Les échanges dans ces types d'habitats sont tels que certaines espèces ne possèdent que les enzymes capables de dégrader les oligosaccharides; c'est le cas de *Selenomonas ruminantium* (94).

On peut donc distinguer 3 grandes catégories de micro-organismes pectinolytiques :

- * Phytopathogènes qui possèdent des pectinases, des enzymes de solubilisation des pectines et des enzymes de pénétration dans les végétaux.

- * Décomposeurs pourvus des pectinases et des enzymes de solubilisation des pectines.
- * Micro-organismes vivant dans les tractus digestifs ne possédant que les pectinases, l'hôte ou sa flore digestive prenant en charge une partie de la prédégradation.

9.2 - CLASSIFICATION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES.

Les enzymes impliquées dans la dégradation des pectines sont divisées en deux catégories, comprenant des enzymes à action dé-estérifiantes et dépolymérisantes.

On y trouve :

- les pectinestérases ou pectine méthylestérases (PMEs), encore appelées enzymes saponifiantes qui catalysent la dé-estérification des pectines aboutissant à la formation de polygalacturonate et de méthanol (216).

- les enzymes dépolymérisantes catalysant la coupure des liaisons glycosidiques en α -1,4 reliant les molécules d'acide galacturonique. Ces enzymes sont divisées en 8 groupes selon 3 critères qui sont :

- * le mécanisme d'action (hydrolyse ou β -élimination);
- * le mode d'action (exo- ou endo-);
- * le substrat préférentiel (pectine ou pectate).

Parmi les enzymes dépolymérisantes on distingue donc :

Les endo ou exo, pectine ou pectate lyases dégradant le substrat par mécanisme de β -élimination, donnant naissance à la formation de composés insaturés présentant un maximum d'absorption situé entre 232 et 235nm.

Les endo ou exo, pectine ou pectate hydrolases, encore appelées polygalacturonases, catalysant le clivage des liaisons glycosidiques en α -1,4 par hydrolyse avec formation de sucres réducteurs.

On parle d'endo-enzyme lorsque la coupure des liaisons glycosidiques s'effectue au hasard et d'exo-enzyme lorsqu'elle s'effectue par récurrence à partir d'une des extrémités terminales de la chaîne.

La dégradation des pectines peut s'effectuer selon deux voies principales :

- déméthylation préalable par la PME suivie de la coupure des liaisons glycosidiques α -1,4 par hydrolyse (polygalacturonase) ou β -élimination (pectate lyase) (Figure 4).
- dépolymérisation directe par la pectine lyase sans intervention préalable de la PME.

9.2.1 - Les pectine méthylestérases (EC 3.1.1.11).

Elles sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et localisées au niveau de la paroi cellulaire des fruits, feuilles, racines et tiges (126,195). D'autre part, de nombreux micro-

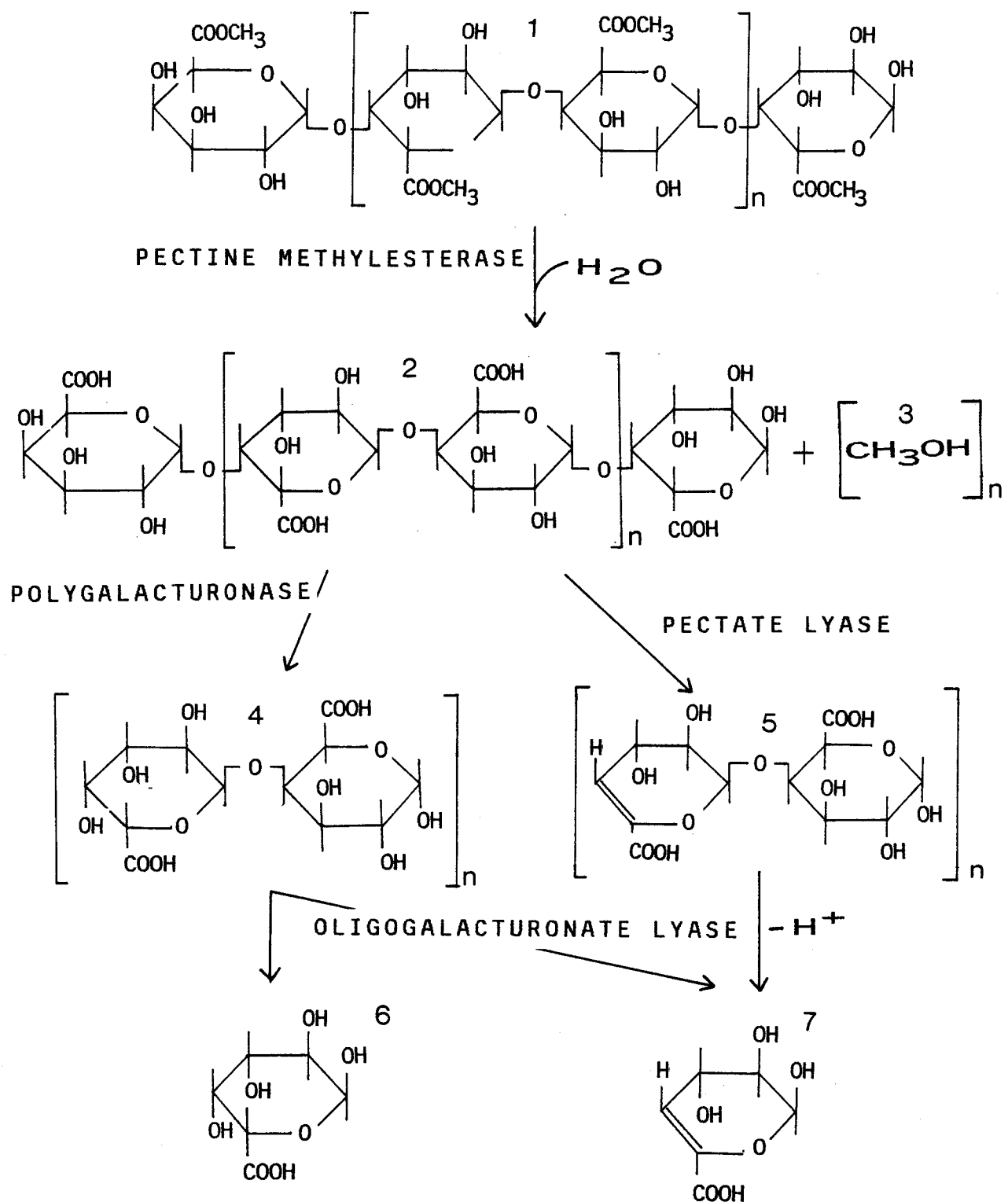


Figure 4. Schéma montrant l'action coordonnée des principales enzymes impliquées dans la dégradation des pectines aboutissant à la formation de galacturonate et de 5-céto-4-déoxyuronate. 1 : pectine ; 2 : polygalacturonate ; 3 : méthanol ; 4 : digalacturonate saturée ; 5 : digalacturonate insaturée ; 6 : galacturonate et 7 : 5-céto-4-déoxyuronate.

organismes pathogènes ou non, bactéries, champignons et levures produisent des PME extracellulaires dont la plupart sont inductibles par les pectines, pectates et leurs dérivés oligomériques (195).

9.2.1.1 - Caractéristiques.

Le poids moléculaire de ces enzymes varie de 25 à 37 kDa selon leur origine. Toutes les pectine méthylestérases (PMEs) provenant de végétaux supérieurs ont un pH optimum d'action compris entre 7 et 9, ce qui n'est pas le cas des PME d'origine microbienne où la gamme de pH optimum est plus étendue (4 à 9) (195). Cependant, des valeurs de pH optimum supérieures à 8, sont à prendre avec précaution puisqu'à partir de ce pH on observe une dé-estérification spontanée des pectines.

La présence d'ions univalents ou divalents entraîne une forte augmentation d'activité pour les PME d'origine végétale contrairement à celles d'origine microbienne.

Il s'agit d'enzymes à haute spécificité de substrat puisque les groupements estérifiés de polysaccharides autres que la pectine sont attaqués 1000 fois plus lentement, et l'ester méthylique de l'acide alginique ou de la gomme tragacathe n'est pas hydrolysé (11,126,195). Seuls les oligogalacturonates méthylés ayant un degré de polymérisation supérieur ou égal à 10 unités sont déméthylés par la PME.

9.2.1.2 - Mode d'action.

L'activité dé-estérifiante de la PME s'arrête à un certain degré d'estérification compris entre 10% et 30% et ne procède pas par dé-estérification complète du substrat.

L'action de la PME est complémentaire de celle des enzymes dépolymérisantes agissant sur des substrats faiblement ou pas méthylés (pectate lyases et polygalacturonase). En effet, l'activité initiale de ces enzymes dépolymérisantes est limitée par l'action de la PME. En ce qui concerne le mode d'action des PME, l'attaque initiale peut soit se porter pour moitié au voisinage de l'extrémité réductrice et pour moitié sur un ou plusieurs autres sites situés le long de la chaîne, - c'est le cas de la PME de tomate ou de *Fusarium oxysporum* -, soit en totalité à partir de l'extrémité réductrice (*Clostridium multifementans*) (11).

Dans le cas de PME agissant par dé-estérification à partir de l'extrémité réductrice de la chaîne, comme celle de *C. multifementans*, l'activité de l'enzyme est rapidement inhibée par les produits de la réaction sauf si une exo-pectate lyase élimine les portions d'acides galacturoniques déméthylés. Ce qui explique que ces deux enzymes travaillent en synergie et forment un complexe puisqu'il n'est pas possible de séparer ces deux activités par les techniques de purification usuelles (chromatographie de gel filtration, d'échange d'ions,

centrifugation zonale...)(231). Dans le cas de *C. multifementans*, la taille de ce complexe a été évaluée à 400 kDa et les deux sites actifs agissent de façon coordonnée.

9.2.1.3 - Pectine méthylestérases de *Bacteroides*.

Les caractéristiques et mode d'action de ces enzymes n'ont pas été étudiés chez *Bacteroides*. Cependant, Jensen et Canale-Parola ont mis en évidence l'existence d'une PME extracellulaire chez *B. galacturonicus* et *B. pectinophilus* (115,116). Cette enzyme agit en association avec une exopectate lyase en partie extracellulaire pour dégrader la pectine. Contrairement à *B. thetaiotaomicron*, ces deux espèces ne peuvent utiliser qu'un nombre très réduit de polysaccharides tels que la pectine et le polygalacturonate.

P. ruminicola possède également une PME extracellulaire étroitement associée à une exopectate lyase extracellulaire (271). Ces deux activités complémentaires n'ont pas pu être séparées après purification tout comme celles de *C. multifementans* (231).

On peut supposer à juste titre, que ce type d'enzyme existe chez d'autres espèces de *Bacteroides* ne possédant pas de pectine lyase et capables de dégrader les pectines comme les *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis*.

9.2.2 - Les polygalacturonases.

Il existe 4 types différents de polygalacturonases classés selon leur préférence vis-à-vis du substrat et leur mode d'action:

- Endo-polygalacturonases qui réalisent des coupures au hasard sur des pectines pas ou faiblement méthylées.
- Endo-méthyl-polygalacturonases qui ont le même mode d'action mais sur des pectines fortement méthylées.
- Exo-polygalacturonases qui procèdent à l'hydrolyse des pectines pas ou faiblement méthylées, par récurrence au niveau des liaisons situées aux extrémités terminales non réductrices des chaînes.
- Exo-méthyl-polygalacturonases qui ont le même mode d'action que les précédentes mais sur pectines fortement méthylées.

9.2.2.1 - Présentation.

Les polygalacturonases (PGs) sont synthétisées par les végétaux et par un grand nombre de micro-organismes phytopathogènes, saprophytes et vivant dans l'intestin ou le rumen. Certains insectes phytophages sont également capables de synthétiser des PGs. Ces enzymes

isolées à partir de la salive et au niveau du tractus digestif de l'insecte, jouent un rôle important pour la nutrition mais également dans la pénétration de l'insecte sous l'écorce de l'arbre, les enzymes contenues dans la salive facilitant la décomposition de la pectine cimentant les espaces intercellulaires du bois. Le suc digestif des escargots contient également des polygalacturonases.

En ce qui concerne la localisation des PGs, la plupart sont extracellulaires (42,145,158,183,203,204,271,272,273) sauf pour celle de *B. thaitaomicron* qui est située au niveau des membranes internes (154) et pour les genres *Selenomonas*, *Yersinia* et *Klebsiella* où elle est associée à la cellule (94,243).

Quelques micro-organismes produisent des PGs de façon constitutive, c'est le cas de certaines levures appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis* et *Geotrichum* (183,189) mais également de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (158). Dans ce cas, l'addition du substrat entraîne une augmentation de sécrétion, le niveau de synthèse restant identique. Cependant, dans la plupart des cas, l'enzyme n'est synthétisée qu'en présence du substrat inducteur (154,195,273,274). Le pH optimum des PGs est généralement situé entre 4,0 et 7,0 (42,94,145,154,158,183,203,204,273,274).

9.2.2.2 - Les endo-polygalacturonases (EC 3.2.1.15).

Une des méthodes permettant de les caractériser est basée sur la variation de viscosité qui s'opère durant la réaction d'hydrolyse du polygalacturonate (PGA). En effet, leur action entraîne une diminution rapide de la viscosité d'une solution de PGA et ceci pour un nombre relativement faible de liaisons glycosidiques coupées. Les produits de la réaction sont constitués par des oligosaccharides de haut poids moléculaire.

La plupart des endo-polygalacturonases (endoPGs) sont capables de dégrader les trimères d'acide galacturonique; cependant, les oligogalacturonates de haut poids moléculaire constituent des substrats de choix pour ces enzymes. Le taux de coupure des liaisons glycosidiques étant proportionnel à la taille du substrat.

Le mode d'action des endoPGs est différent d'une espèce à une autre, différences concernant le rapport baisse de viscosité sur nombre de liaisons glycosidiques coupées, ainsi que le mode d'attaque des oligosaccharides générés au cours de la réaction d'hydrolyse du PGA.

Trois grands modes d'action sont connus :

- Le mode A caractéristique des endoPGs de champignons et levures où le tétragalacturonate est clivé en tri- et monogalacturonate à partir de l'extrémité réductrice de la chaîne (183). Les enzymes appartenant à ce groupe ont une capacité très réduite de dégradation du trigalacturonate. Dans le cas de l'endoPG de *Saccharomyces fragilis*, lorsque 50% du PGA est hydrolysé, la vitesse de la réaction d'hydrolyse est environ 1500 fois inférieure à ce qu'elle

était initialement; cette réaction cesse lorsque 70% du polysaccharide est hydrolysé (183).

- Le mode B dans lequel on trouve l'endoPG de tomate. Ici, le tétragalacturonate peut être coupé, soit au niveau de la liaison centrale, engendrant la formation de deux molécules de digalacturonate, soit au niveau de la liaison située du côté de l'extrémité réductrice terminale de la chaîne, engendrant alors la formation de trigalacturonate et de monogalacturonate. Le trisaccharide est rapidement dégradé en mono- et digalacturonate.

- Le mode C observé dans le cas de l'endoPG produite par *Erwinia carotovora*. Il diffère de deux premiers modes par une hydrolyse spécifique du pentagalacturonate en di- et trigalacturonate et par le fait qu'il existe deux alternatives concernant le clivage de l'hexagalacturonate (3+3 ou 4+2). Le pentasaccharide est attaqué cinq fois plus rapidement que le tétrasaccharide.

9.2.2.3 - Les exo-polygalacturonases (EC 3.2.1.82).

Les exo-polygalacturonases (exoPGs) d'origine végétale et microbienne catalysent le clivage des liaisons glycosidiques en α -1,4 en partant de l'extrémité non réductrice des chaînes, entraînant la libération de molécules d'acide galacturonique. Le taux de coupure des liaisons glycosidiques est soit indépendant, soit inversement proportionnel au degré de polymérisation du substrat. Contrairement aux endoPGs, les exoPGs sont capables de dégrader les molécules de digalacturonate.

La viscosimétrie permet de différencier les activités exo et endoPGs; en effet, une diminution de viscosité de 50% correspond au clivage de 30 à 45% des liaisons glycosidiques dans le cas d'une activité de type exo et de 3 à 10% des liaisons glycosidiques pour une activité de type endo.

Les exoPGs d'origine végétale et microbienne montrent une spécificité très étroite vis-à-vis des substances non méthylées, elles n'hydrolysent que très faiblement les pectines (11). De plus, elles ne dégradent pas les chaînes d'acide galacturoniques présentant à leur extrémité réductrice une molécule d'acide galacturonique insaturé résultant de l'action d'une lyase. Enfin, le degré de dégradation dépend de la source de pectine (195).

L'exoPG de *Selenomonas ruminantium* (*Bacteroidaceae*) est une enzyme intracellulaire, présentant un pH optimum de 7,0 et capable de dégrader uniquement les oligogalacturonates de faible PM en digalacturonates insaturés (94).

9.2.2.4 - Polygalacturonases de *Bacteroides*.

Elles ont surtout été étudiées chez *B. thetaiotaomicron*. Il s'agit d'une endoPG (EC 3.2.1.15) associée aux membranes internes. Elle possède un pH optimum d'action de 5,4, un pI

de 4,7 à 4,9 et un K_m pour le PGA de 350 à 400 $\mu\text{g/ml}$. Le produit majeur d'hydrolyse du PGA étant l'acide galacturonique. Il s'agit d'une activité inducible puisqu'en présence de glucose ou d'acide galacturonique, le niveau d'activité endoPG est 30 à 50 fois inférieur à ce qu'il est lorsque la souche est cultivée sur PGA (154). Lorsque la souche est cultivée sur PGA, elle produit également une activité endopectate lyase dont les caractéristiques seront décrites ultérieurement.

P. ruminicola synthétise également une endoPG particulière puisque capable contrairement à la plupart des endoPGs de dégrader les molécules de digalacturonates saturées ou insaturées en monosaccharides (272).

9.2.3 - Les lyases.

9.2.3.1 - Mécanisme d'action.

Il s'agit d'enzymes ayant un mode d'action particulier puisque catalysant le clivage des liaisons glycosidiques par mécanisme de β -élimination ou trans-élimination. La coupure de la liaison glycosidique s'effectue entre le carbone 4 et l'oxygène placé en β reliant les deux molécules d'acide galacturonique. Cette réaction s'accompagne de l'élimination simultanée de l'atome d'hydrogène situé au niveau du carbone 5, ce qui entraîne la formation d'une double liaison entre les carbones 4 et 5. Les composés insaturés en 4,5 obtenus, présentent un maximum d'absorption situé autour de 235 nm, ce qui rend leur mise en évidence aisée.

9.2.3.2 - Présentation.

Il existe 5 types différents de lyases agissant sur les pectines :

- Endo-pectate lyases qui agissent sur des pectines fortement ou totalement dé-estérifiées, par coupure au hasard dans les chaînes.

- Exo-pectates lyases qui dépolymérisent les mêmes types de substrats, en démarrant à partir de l'extrémité réductrice des chaînes d'acide galacturonique.

- Endo-pectine lyases et exo-pectine lyases qui ont des modes d'action comparables aux précédentes et qui s'attaquent aux pectines fortement méthylées.

- Oligogalacturonate lyases qui agissent sur des substrats de faible degré de polymérisation.

Les pectine et pectate lyases sont des enzymes d'origine exclusivement microbienne. Leur présence n'a jamais été décelée dans les végétaux supérieurs.

9.2.3.3 - Les endo-pectate lyases (EC 4.2.2.2).

On distingue deux grands groupes d'endo-pectate lyases (endoPLs) :

- Les endoPLs appartenant au groupe A, dont la principale caractéristique est de dégrader le tétragalacturonate insaturé par coupure au niveau de la liaison centrale, entraînant la libération de deux molécules de digalacturonate insaturées. Elles sont également capables de dégrader les trisaccharides insaturés ou non, au niveau de la liaison 2 contrairement aux enzymes du groupe B. Ce mode d'action est observé dans le cas des endoPLs synthétisées par *P. ruminicola* (272), *B. thetaiotaomicron* (154), *E. carotovora* (162), *Lachnospira multiparus* (274), *Treponema pectinovorum* (262), par quelques espèces de *Clostridium* telle que *Clostridium aurantibutyricum* (145), ainsi que par certains tréponèmes du rumen (273).

- Les endoPLs du groupe B, dont le principal produit final est le trigalacturonate insaturé formé par coupure du tétra- ou pentagalacturonate. Ici, l'enzyme s'attaque préférentiellement à la 3^{ème} liaison glycosidique du tétrasaccharide qu'il soit saturé ou non. Ce mode d'action est caractéristique des endoPLs de *Bacillus pumilus* (11,51), de *Clostridium felsineum* (145) et de *Streptococcus bovis* (276).

Il s'agit pour la plupart d'enzymes inductibles (154,155). Cependant chez certaines bactéries phytopathogènes, il existe une forme enzymatique constitutive qui peut être ou non soumise à une répression catabolique. Dans le cas du genre *Erwinia*, le niveau de production d'endoPL augmente lorsque les souches sont cultivées en présence de PGA ou d'oligogalacturonates avec une répression par le glucose (répression catabolique) ou par certaines concentrations en digalacturonates insaturés (auto-répression catabolique) (44). Chez *Bacillus subtilis* par contre, le PGA, la pectine ou le galacturonate n'ont aucun effet sur la production de pectate lyase et aucune autre source de carbone n'induit ou ne réprime cette synthèse de façon significative (169).

La plupart des endo-pectate lyases synthétisées par les bactéries du rumen et les micro-organismes phytopathogènes sont extracellulaires (160,162,169,273,274,283).

Le poids moléculaire des différentes endoPLs connues est compris entre 32 et 42 kDa (160,169,283).

Leur pH optimum d'action se situe entre 8,2 et 9,5 (160,162,169,262,273,274,276).

Les cations divalents tels que Ca^{++} exercent une forte action stimulante sur l'activité de ces enzymes, ce qui explique que l'EDTA se comporte comme un inhibiteur (160,162,169,262,273, 274,276,283).

Les PLs produites par *Erwinia chrysanthemi* et *E. carotovora* sont extracellulaires, réparties selon leur point isoélectrique en 3 groupes : basique (9 < pI < 10) PLc, PLd et PLe, légèrement basique (7 < pI < 8,5) PLb et acide (4 < pI < 5) PLa (197), ont des poids moléculaires différents mais possèdent des caractéristiques fonctionnelles identiques et des capacités

variables de macération, l'activité PLe constituant un facteur important de pathogénicité (12,75,197,219,256).

9.2.3.4 - Les exo-pectate lyases (EC 4.2.2.9).

Les exo-pectate lyases (exoPLs) fongiques ou bactériennes ont des propriétés similaires. Elles dégradent le PGA en libérant des disaccharides insaturés. La dégradation s'opère à partir de l'extrémité réductrice des chaînes. Le taux de coupure des liaisons glycosidiques est indépendant de la taille du substrat, ce qui n'est pas le cas avec les endoPLs, le trimère et le tétramère étant dégradés à la même vitesse que le polymère (11,195). Les exoPLs sont incapables de dégrader des substrats dont le degré de polymérisation est inférieur à 3 molécules d'acide galacturonique.

Il s'agit pour la plupart d'enzymes extracellulaires, associées éventuellement à une activité PME également extracellulaire (159,231).

Leur activité est, tout comme les endoPLs, stimulée par certains ions divalents et inhibée par l'EDTA (92,116,159,275) et leur pH optimum est souvent compris entre 8,0 et 8,5 : c'est le cas des exoPLs de *B. galacturonicus* (116), *Butyrivibrio fibrisolvens* (275) et de *C. multifementans* (159), sauf dans le cas des exoPLs de *B. pectinophilus* où le pH optimum est compris entre 9,0 et 9,5 (116) et de *E. chrysanthemi* EC16 (7,5 à 8,0) (27).

9.2.3.5 - Les pectine lyases (EC 4.2.2.10).

Les pectine lyases (PNLs) sont essentiellement connues chez les champignons (1,178,232); cependant, de telles activités ont été mises en évidence chez un certain nombre de bactéries appartenant notamment aux genres *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Leuconostoc* (112,122,218). Les bactéries appartenant au genre *Bacteroides* ne produisent pas de PNL.

Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de champignons ou de bactéries, l'activité PNL est extracellulaire, elle n'est pas ou très peu active sur les oligosaccharides et sur des substrats faiblement estérifiés. En effet, l'affinité qu'a l'enzyme pour le substrat est proportionnelle au degré d'estérification de ce dernier.

Les ions divalents ont un effet activateur sur l'activité PNL des champignons (1,178,232). L'EDTA quant à lui reste sans effet sur l'activité PNL de *B. subtilis* et de *Pseudomonas fluorescens* (112,218).

Le pH optimum est généralement compris entre 8,0 et 8,5 chez les bactéries (112,218) et entre 5,0 et 5,5 chez les champignons et *L. mesenteroides* (1,122,178,232). De plus, le pH optimum varie selon le degré de méthylation de la pectine (11).

En ce qui concerne l'inductibilité du gène chez *E. carotovora* et *E. chrysanthemi*, la pectine lyase est synthétisée abondamment lorsque les bactéries sont cultivées en présence d'acide nalidixique, de mitomycine C ou exposées aux rayons UV. En effet, Zink *et al.* ont démontré que le produit du gène *recA* est requis pour l'induction du gène codant pour la pectine lyase chez *E. carotovora* subsp. *carotovora* (286).

9.2.3.6 - Les oligogalacturonate lyases (EC 4.2.2.6).

Les lyases coupant les liaisons glycosidiques situées aux extrémités réductrices des oligogalacturonates saturés ou insaturés sont qualifiées d'oligogalacturonate lyases (OGLs). Ces enzymes sont le plus souvent intracellulaires et sont capables de dégrader les digalacturonates en acide galacturonique et/ou 5-céto-4-déoxyuronate, selon que l'enzyme agit sur un digalacturonate saturé ou insaturé. Ces enzymes sont également capables de dégrader des oligogalacturonates possédant plus de deux molécules d'acide galacturonique, le taux de dégradation est alors inversement proportionnel à la longueur du polymère. Le pH optimum de ces enzymes est le plus souvent voisin de 7,0 et les ions Ca^{++} n'ont aucun effet activateur.

L'OGL paraît être une enzyme "clef de voûte" dans la dégradation des pectines chez le genre *Erwinia* (163). En effet, les monosaccharides qu'elle génère jouent un rôle important dans l'induction des gènes responsables de la synthèse des pectate lyases et d'un gène impliqué dans la régulation d'autres gènes de dégradation des pectines (35,193). Ce type d'activité n'a, jusqu'à présent, pas été mis en évidence chez *Bacteroides*.

9.2.3.7 - Activités lyases présentes chez *Bacteroides*.

A - Activités endopectate lyases.

Les pectate lyases de toutes les espèces de *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis* sont solubles, associées à la cellule, inductibles par le polygalacturonate (PGA) ou la pectine, stimulées par les ions Ca^{++} et inhibées par l'EDTA, possèdent un pH optimum d'action compris entre 8,4 et 8,8, ont une masse moléculaire voisine de 50 kDa et ont un mode d'action de type endo. Un des seuls paramètres permettant de les différencier est leur point isoélectrique qui est de 7,5 pour l'endoPL de *B. thetaiotaomicron*, 7,7 pour *B. vulgatus* et pour la souche 3452A, 5,8 et 7,2 pour *B. ovatus* et 6,1 pour *B. fragilis* (155). L'endoPL de *B. thetaiotaomicron* possède une forte affinité vis-à-vis du PGA puisque son K_m est de 40 à 70 $\mu\text{g/ml}$ et le principal produit d'hydrolyse du PGA est le digalacturonate insaturé (154).

P. ruminicola possède également une endoPL dont les caractéristiques sont identiques à celles du groupe *fragilis*. Le trisaccharide saturé est rapidement dégradé en disaccharide

insaturé et monosaccharide altéré contrairement au trisaccharide insaturé qui n'est que très lentement dégradé (272). Cette enzyme n'a pu être purifiée que partiellement car fortement liée à l'activité pectine méthylestérase (271).

B - Activités exopectate lyases.

Elles ont été mises en évidence uniquement chez *B. pectinophilus* et *B. galacturonicus* en association avec une pectine méthylestérase.

Il s'agit d'enzymes extracellulaires - une activité pectate lyase associée à la cellule est également présente chez les deux espèces - possédant des caractéristiques voisines des endoPLs du groupe *fragilis* sauf en ce qui concerne le pH optimum de l'exoPL de *B. pectinophilus* qui est compris entre 9,0 et 9,5. Leur mode d'action est particulier, puisque le principal produit de dégradation du PGA est le trigalacturonate insaturé.

Cette panoplie d'enzymes permet donc d'aboutir à la formation de monosaccharides saturés ou insaturés qui sont facilement utilisables par la bactérie (Figures 4 et 5). Chez *B. thetaiotaomicron*, l'utilisation des acides uroniques emprunte la même voie que chez *E. coli* (212), galacturonate et 5-céto-4-déoxyuronate subissent une série de modifications permettant d'aboutir au 2-céto-3-déoxygluconate puis au phospho-énol-pyruvate (Figure 5).

9.3 - APPLICATIONS INDUSTRIELLES.

Les préparations commerciales sont obtenues à partir de cultures de la moisissure *Aspergillus niger* et contiennent des proportions variables de pectinestérase, polygalacturonase et lyase, mais également d'autres enzymes telles que cellulases, xylanases, arabinases, glycosidases, protéases... Certaines de ces enzymes ont des actions défavorables sur le produit traité (perte d'arôme ou apparition d'amertume), ce qui explique que les fabricants mettent au point des préparations adaptées pour chaque type d'usage (10). Outre leur utilisation pour le traitement de la biomasse cellulosique en association avec des cellulases, les pectinases trouvent leurs applications industrielles dans :

9.3.1 - Extraction des jus de fruits.

Le traitement enzymatique des pulpes avant le pressurage est obligatoire pour l'extraction des jus de fruits de raisin, cassis, framboise, etc. En effet, lors de l'extraction des jus de fruits le travail mécanique de la pulpe produit un jus très visqueux. Il s'ensuit la formation d'une masse gélifiée dont il est difficile d'extraire le jus. L'addition d'enzymes pectinolytiques dégrade cette structure gélifiée et facilite ainsi l'écoulement du jus. Le traitement enzymatique de la pulpe

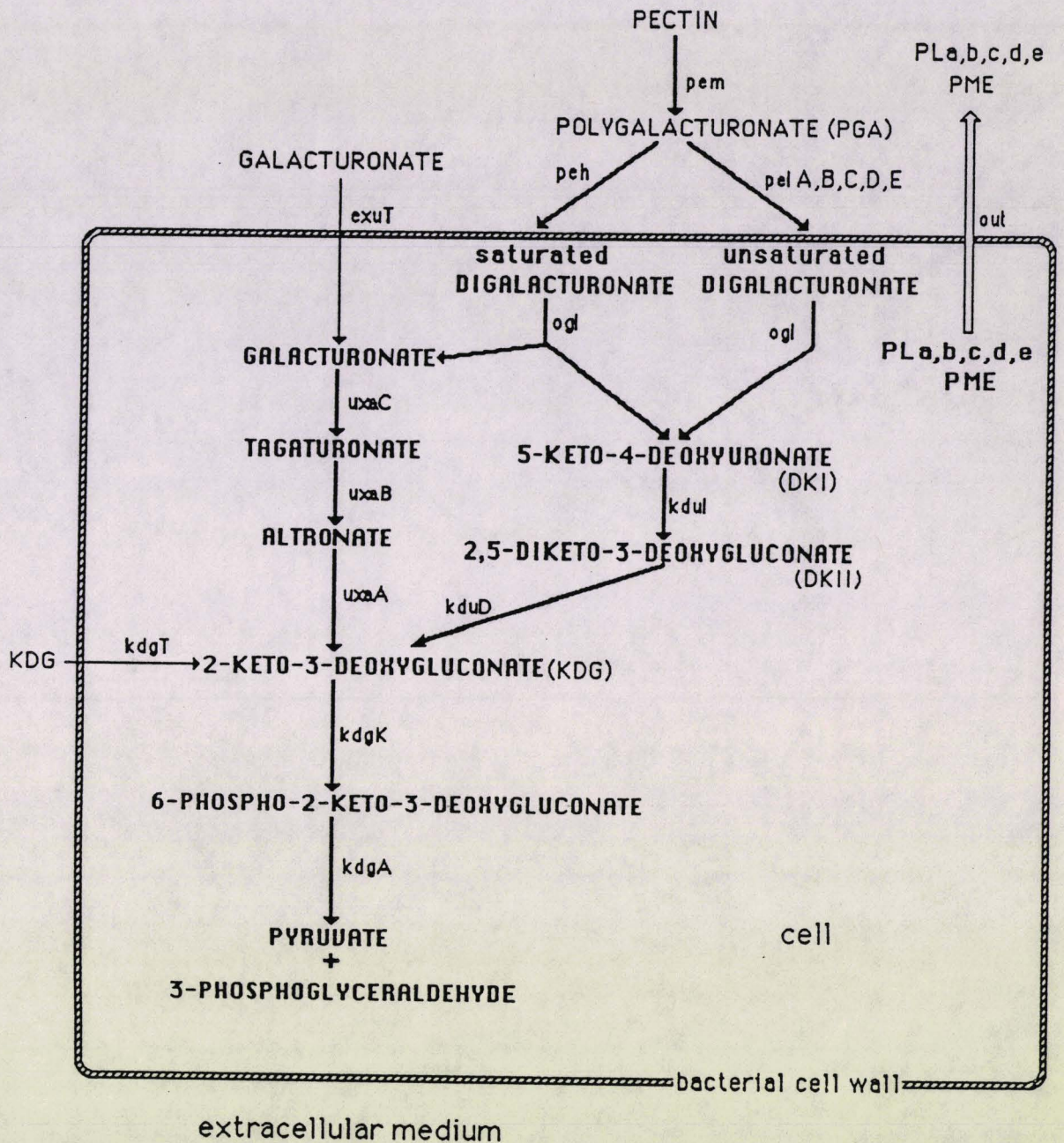


Figure 5. Modèle de dégradation des hexuronates et des pectines chez *Erwinia chrysanthemi*. Les enzymes qui agissent directement sur les composés pectiques sont excrétées par le système de transport *out*. Le galacturonate et le 2-céto-3-déoxygluconate extracellulaires peuvent pénétrer dans la bactérie par les systèmes de transport spécifiques *exuT* et *kdgT*. *pme* = pectine méthylestérase; *peh* = pectate hydrolase; *pel* = pectate lyase; *ogl* = oligogalacturonate lyase; *kduI* = 5-céto-4-déoxyuronate isomérase; *kduD* = 2-céto-3-déoxygluconate oxydoréductase; *kdgK* = 2-céto-3-déoxygluconate kinase; *kdgA* = 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate aldolase; *uxaA* = altronate hydrolyase; *uxaB* = altronate oxydoréductase; *uxaC* = altronate uronate isomérase.

par l'action conjuguée de pectinases et d'hémicellulases est également utilisé dans l'industrie de la pomme pour augmenter le rendement de pressurage.

9.3.2 - Clarification ou stabilisation des jus de fruits.

La dégradation des pectines présentes dans les jus de fruits permet d'obtenir des jus limpides, de produire des concentrés de jus de fruits à haute teneur en matière sèche et d'éviter l'apparition de troubles par formation d'un gel de polygalacturonate de calcium dû à l'action des pectinestérases naturellement présentes dans les fruits.

9.3.3 - Défécation du cidre de haute qualité.

Elle s'effectue par l'action de la pectine méthylestérase. En effet, en présence de faibles quantités de calcium, elle coagule la pectine du jus de pomme. Le coagulum se rétracte lentement et monte vers la surface du liquide entraînant les impuretés les plus fines alors que les bourbes grossières décantent au fond du tank. Cette action douce se produit en 36 h à température ambiante et permet d'obtenir un jus de pomme clarifié prêt à être fermenté.

9.3.4 - Liquéfaction et macération.

La mise au point de préparations enzymatiques spécifiques appelées "macérases" a permis d'améliorer la stabilité et la texture des boissons à base de pulpe de fruits ou nectars. L'action de ces enzymes se limite à une hydrolyse partielle des pectines présentes au niveau des lamelles moyennes des parois, ce qui explique l'aspect visqueux du jus.

9.3.5 - Rouissage du lin.

Le rouissage permet d'éliminer, par un séjour plus ou moins prolongé en milieu humide, les matières pectiques de la zone libérienne, dans laquelle sont noyés les faisceaux de fibres de certaines plantes textiles (lin, chanvre, jute, etc.). Certains auteurs pensent utiliser des pectine lyases dans un procédé de rouissage accéléré et contrôlé du lin (112).

10 - CLONAGE DE GENES DONT LES PRODUITS SONT IMPLIQUES DANS LE CATABOLISME DES PECTINES.

10.1 - LE MODELE *ERWINIA*.

10.1.1 - Présentation du genre.

Les bactéries appartenant à ce genre font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* dans laquelle on trouve les genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* et *Yersinia*. Il s'agit de bactéries formant des bâtonnets droits, mobiles, anaérobies facultatives, Gram-négatives, capables d'utiliser l'acétate, fumarate, gluconate, malate et succinate et ayant un métabolisme acidifiant par consommation de sucres. Ces bactéries sont responsables d'un nombre important d'infections chez les végétaux mono- et dicotylédones telles que des rouilles, ulcérations, décolorations des tissus, tâches foliaires et flétrissures. Elles sont également responsables de la macération des tissus charnus des végétaux tels que tiges, collets et fruits, communément appelée pourriture molle ou gangrène. Cette phytopathogénicité est due au fait que les bactéries appartenant au genre *Erwinia*, produisent un grand nombre d'enzymes extracellulaires telles que des cellulases, xylanases, protéases et pectinases qui attaquent les différents constituants de la paroi cellulaire des végétaux. Cette dernière ne peut alors plus jouer son rôle de barrière, ce qui se traduit par la mort cellulaire consécutive aux pertes importantes d'eau et d'électrolytes. De plus, la dégradation enzymatique des pectines entraîne la formation composés phytotoxiques (éthylène et H₂O₂) qui sont en partie responsables de cette mort cellulaire.

Le genre *Erwinia* peut être subdivisé en 3 groupes (99):

1. Le groupe *amylovora* comprenant des pathogènes qui causent des dommages de type nécrose ou flétrissure, dans lequel on trouve les espèces *amylovora*, *salicis* et *tracheiphila*.
2. Le groupe *herbicola* omniprésent dans la nature chez les végétaux, les animaux, l'homme, le sol, l'air et l'eau.
3. Le groupe *carotovora* comprenant des pathogènes plus virulents responsables de la pourriture molle (soft rot disease) et représenté par les espèces *carotovora* et *chrysanthemi*.

C'est ce dernier groupe qui a fait l'objet du plus grand nombre de recherches, concernant notamment l'étude des mécanismes de sécrétion des pectinases, le clonage des gènes responsables de la virulence des souches, la caractérisation de leurs produits et des mécanismes de régulation dont ils sont l'objet.

10.1.2 - Voie de dégradation des pectines et du galacturonate chez *E. chrysanthemi*.

Les bactéries appartenant au groupe *carotovora* sont capables de produire une grande variété d'enzymes pectinolytiques extracellulaires telles que des pectine méthylestérases, pectine lyases, pectate lyases et polygalacturonases (44). Ces bactéries possèdent un seul type d'hydrolase et 4 ou 5 pectate lyases différentes produites en grandes quantités et réparties selon leur point isoélectrique en 3 groupes : basique ($9 < pI < 10$), légèrement basique ($7 < pI < 8,5$) et acide ($4 < pI < 5$) (197).

Les oligogalacturonates résultant de l'action coordonnée de ces différentes enzymes sont attaqués par l'oligogalacturonate lyase pour donner des monosaccharides saturés (galacturonate) et insaturés (5-céto-4-déoxyuronate ou DK I) (163).

Les monosaccharides insaturés peuvent alors être transformés en 2,5-dicéto-3-déoxygluconate (DKII) par l'intermédiaire de l'uronate isomérase, puis en 2-céto-3-déoxygluconate grâce à l'intervention d'une oxydoréductase (46). Le catabolisme du galacturonate rejoint la voie de dégradation des pectines à ce niveau là. Le 2-céto-3-déoxygluconate (KDG) est alors phosphorylé par une kinase en 6-phospho-2-céto-3-déoxygluconate puis transformé en pyruvate et 3-phospho-glycéraldéhyde par une aldolase (Figure 5).

L'acide galacturonique et l'acide glucuronique, de même que le KDG extracellulaires peuvent pénétrer dans la bactérie par l'intermédiaire d'un système de transport formé par le produit de gène *exuT* pour le galacturonate et le glucuronate et celui du gène *kdgT* pour le KDG ainsi que le DK I et DKII (103).

Par contre, le polygalacturonate ou la pectine ne peuvent pénétrer dans la bactérie, ce qui implique que les enzymes de dégradation de ces substrats, en l'occurrence pectine méthylestérase et pectate lyases, soient extracellulaires. L'excrétion de ces enzymes est assurée par le système de transport *outJ*. Chez les mutants *Out⁻*, la localisation des cellulases et pectinases devient périplasmique (8,105,117,252,256); de tels mutants perdent leur pouvoir phytopathogène. Ji *et al.* ont cloné un gène codant pour une protéine de 81 kDa restaurant l'activité de sécrétion chez ces mutants *Out⁻* (105) et ont noté l'absence d'une protéine de 68 kDa au niveau du périplasme (117); Thurn et Chatterjee ont effectué la même observation concernant une protéine périplasmique de 35 kDa (252).

Les enzymes impliquées dans cette voie de dégradation sont soumises à un système de régulation relativement complexe comprenant des gènes de régulation négative (*kdgR*, *exuR*, *pecY*, *gpiR* et *cri*) et positive (*pecl* et *peclL*).

10.1.3 - Système de régulation des enzymes impliquées dans l'utilisation des pectines.

Le taux de production des pectinases d'*Erwinia* augmente en présence de pectine, polygalacturonate et oligogalacturonates. La synthèse de ces enzymes est réprimée en présence de glucose (répression par le catabolite) ou en présence de fortes concentrations en digalacturonates insaturés (répression auto-catabolitique). Le taux de production des pectinases chute lorsque la culture entre en phase de croissance stationnaire (inhibition de croissance). L'induction de synthèse des pectinases par des composés de haut poids moléculaire, commence par une phase de digestion extracellulaire au cours de laquelle, les oligosaccharides vont pénétrer dans la bactérie pour y être transformés en inducteurs réels.

Des expériences de mutagenèse chimique et par transposition réalisées chez *E. chrysanthemi* ont permis de mettre en évidence l'existence de composés inducteurs provenant de la dégradation des pectines et d'un certain nombre de gènes de régulation.

Des souches mutées pour le gène *kduD* dont le produit permet la transformation du DKII en KDG, deviennent incapables de croître sur pectine ou PGA (47). Les mutants KduD⁻ présentent des niveaux d'activités pectate lyases, polygalacturonase, oligogalacturonate lyase et isomérase supérieurs à la souche sauvage lorsqu'ils sont cultivés sur digalacturonate insaturés, DKII ou DKI suggérant de ce fait une accumulation intracellulaire d'inducteur(s) (35,47). L'expression du gène *kduD* a pu être étudiée par fusion de ce gène avec celui de la β -galactosidase, ce dernier étant placé sous le contrôle du promoteur du gène *kduD*. L'activité β -galactosidase devient alors sensible à la répression catabolique par le glucose et inductible par le PGA, galacturonate et les autres produits issus du catabolisme du PGA (47).

Chez des mutants KdgK⁻, incapables de transformer le KDG en 6-phospho-2-céto-3-déoxygluconate, le taux d'induction des enzymes impliquées dans la dégradation des pectines est fortement augmenté (multiplié par 5) (256). Ceci ne peut s'expliquer que par l'accumulation d'un inducteur de ces activités, en l'occurrence le KDG ou le DKII (le KDG pouvant être transformé en DKII).

Des souches d'*E. chrysanthemi* mutées pour le gène de l'oligogalacturonate lyase (Ogl⁻) présentent des activités pectate lyase, polygalacturonase et céto-déoxyuronate déhydrogénase inductibles par le DKII et par les produits de dégradation du digalacturonate insaturé mais pas par les digalacturonates (35).

De toutes ces observations, on peut conclure que le DKI, le DK II et le KDG paraissent être les inducteurs réels des gènes codant pour les pectate lyases, polygalacturonase, oligogalacturonate lyase, céto-déoxyuronate déhydrogénase et isomérase chez *E. chrysanthemi* (35,47,256).

Le seul gène de régulation négative clairement identifié est le gène *kdgR* dont le produit agit comme répresseur de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'utilisation des pectines : il contrôle partiellement l'expression des gènes *pem*, *pelA,B,C,D et E*, *ogl*, *kduD*, *kduI*, et totalement celle des gènes *kdgK*, *kdgT* et *kdgA* (104,106,194). Ce gène a été cloné à partir d'un fragment de 35 kb provenant du chromosome d'*E. chrysanthemi* et se trouve placé à proximité des gènes *ogl* et *kduD* (193). Les inducteurs tels que le DKI, DKII, et KDG interagissent avec le produit du gène *kdgR* en provoquant un effet de dérégulation. Ces composés gardent leur effet d'induction en l'absence du produit du gène *kdgR*, ils interagissent alors avec un second système de régulation dont les gènes *pecl* et *peclL* semblent faire partie (106).

D'autres gènes exercent un contrôle négatif sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation des pectines, il s'agit notamment du gène *pecY*, situé à proximité du gène *pem* et dont le produit agit comme répresseur de l'expression du gène *pem* (16), et des gènes *gpiR* et *cri* exerçant un contrôle négatif sur l'ensemble des gènes *pel* (192).

Le gène *exuR*, quant à lui, gouverne de façon négative le catabolisme des hexuronates en exerçant un contrôle sur les gènes *exuT*, *uxaA*, *uxaB* et *uxaC*.

En ce qui concerne les gènes de régulation positive dont l'expression est induite en présence des composés pectiques, ils sont au nombre de deux (106) :

- *pecl* agissant sur les gènes *pem* et *pelA,B,C,D et E*.
- *peclL* contrôlant l'expression des gènes *pelA,B,C,D et E*.

La voie de dégradation des pectines est donc contrôlée par un système de régulation complexe formant un circuit dans lequel on trouve un grand nombre de gènes de régulation dont l'expression varie et ayant des effets activateurs ou inhibiteurs sur l'expression des gènes de dégradation des pectines.

10.1.4 - Organisation des gènes responsables de l'utilisation des pectines chez *E. chrysanthemi*.

Le clonage des gènes impliqués dans l'utilisation des pectines a permis de préciser l'organisation et la localisation de ces gènes sur le chromosome; chez *E. chrysanthemi*, ils sont répartis sur 4 régions :

* Le complexe *pelDEA,pem* regroupé sur un fragment d'ADN de 5 kilobases, les 4 gènes constituant des unités de transcription indépendantes. Les gènes *pelD* et *pelE* étant transcrits dans la même direction. Ce complexe est localisé à proximité du marqueur *pro-1* (191,192) et le gène *pelD* est étroitement lié au gène *pem*, la distance séparant les deux gènes est évaluée à 2 kb (16,106,130).

* Le complexe *pelBC* situé près des marqueurs *cya*, *ile* et *leu* (130,194) auquel on trouve associé le gène *kdgK*, les gènes *pelB* et *pelC* possédant leur promoteur propre et étant séparés d'une centaine de paires de bases (125,130).

* Les gènes *ogl*, *kdgT* et *kduD* proches du marqueur *trp* (193).

* Le gène *kdgA* situé entre les marqueurs *trp* et *his*.

Le gène *kduI* n'a pour l'instant pas été localisé. L'ensemble des gènes impliqués dans le transport et la dégradation du galacturonate est situé à proximité du locus *thy*.

Chez *E. chrysanthemi* ENA49, l'organisation et la régulation des gènes *pel* paraît différente puisque les gènes *pelA*, *pelB* et *pelR* sont regroupés sur un fragment d'ADN de 7,3 kb et que le gène *pelR* est un gène de régulation négative contrôlant l'expression du gène *pelA* (282).

Tous ces gènes à l'exception du gène *kduI* ont été clonés chez *E. coli*.

10.1.5 - Clonage chez *E. coli* et séquençage de gènes codant pour des pectinases d'*Erwinia*.

10.1.5.1 - Clonage.

De nombreux gènes codant pour des pectine méthylestérase (PME), endo-pectate lyases (endoPLs), exo-pectate lyase (exoPL), polygalacturonase (PG), pectine lyase (PNL) et oligogalacturonate lyase (OGL) appartenant au genre *Erwinia*, ont été clonés chez *E. coli* (Tableaux 4a et 4b) et séquencés, ce qui a permis d'étudier l'expression de ces gènes chez *E. coli*, de définir précisément leur organisation sur le chromosome, de faire des comparaisons d'homologie entre les gènes dont les produits ont des modes d'action comparables et de produire des enzymes pures afin d'étudier précisément leur caractéristiques biochimiques (12,27,136,137).

En ce qui concerne l'expression chez *E. coli* des gènes codant pour des pectinases d'*Erwinia*, plusieurs constatations importantes peuvent être faites:

1 - Les gènes qui s'expriment chez *E. coli* sont, dans la quasi totalité des cas, sous le contrôle de leur propre promoteur. En effet, on observe une expression de ces gènes quelle que soit leur orientation sur le vecteur. C'est le cas des endoPLs (43,56,57,124,125,190,282), de la PME (186) et de l'exoPG (92) provenant de diverses souches d'*E. chrysanthemi* et des PLs d'*E. carotovora* (198).

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> ENA49 gène <i>pelA</i>	L47.1 (4,0 kb) réduit à 2,4 kb	Dépression sur gel de pectate de calcium 0,5%	282
gène <i>pelB</i>	L47.1 (7,0 kb) réduit à 1,8 kb pMYF131 (7,3 kb)	0,1% 0,4%	
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> B374 gènes <i>pelD,E,A</i> .	pMMB33 (35 kb) réduit à 2,7 kb	Halo opaque sur PGA + Acétate de cuivre 0,6%	190
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> B374 gènes <i>pelA,B,C,D,E</i> .	RP4::mini-Mu	Halo opaque sur PGA + Acétate de cuivre	255
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937 gènes <i>pelA,B,C,D,E</i> .	L47.1	Halo opaque sur PGA + Acétate de cuivre 0,7%	130
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> EC16	pHC79 (40 kb)	Halo de clarification sur PGA + CaCl ₂ 1 M	124
Pectate lyases d' <i>E. chrysanthemi</i> CUCPB1237	pBR322 (9,8 kb) réduit à 2,5 kb	Dépression sur gel de pectate de calcium 0,2%	43
Exopectate lyase d' <i>E. chrysanthemi</i> EC16 (mutant UM1005)	pUC19 réduit à 3,3 kb ORF de 2247 pb	Dépression sur gel de pectate de calcium 0,4%	27
Pectate lyases d' <i>E. carotovora</i> gènes <i>pelD,E</i> .	pJB8 (40 kb) réduit à 7,0 kb	Anticorps 0,02%	135
Pectate lyases d' <i>E. carotovora</i> EC14	pBR322 (3,4 kb) réduit à 2,0 kb	Halo de clarification sur PGA + HCl 2N 0,5%	198
EndoPL et exoPL d' <i>E. carotovora</i> Ecc71	pHC79 (30 kb)	Halo de clarification sur PGA + HCl 6N 0,6%	285
Pectate lyases d' <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> SCRI193	pUC8 (2,2 kb)	Halo opaque sur PGA + acétate de cuivre	185

Tableau 4a. Clonage de gènes codant pour les activités pectate lyases de *Erwinia*. PGA = polygalacturonate.

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Pectine lyase d' <i>E. carotovora</i> Er	pUC19 (8,2 kb) réduit à 2,1 kb	Sonde oligo- nucléotidique 0,4%	173
Pectine lyase d' <i>E. carotovora</i> 71	pSF6 (40 kb) réduit à 3,4 kb	Halo foncé sur pectine + rouge de ruthénium 1,0%	157
Pectinases d' <i>E. carotovora</i> SCRI193	pUC8 (5,7 kb)	Halo opaque sur PGA + Acétate de cuivre	16
EndoPG d' <i>E.</i> <i>carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> Ecc71	pHC79 (30 kb)	Halo de clarification sur PGA + HCl 6N 2,4%	285
Pectine méthyl- estérase d' <i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> B374	pUC8 (3,3 kb) réduit à 1,7 kb ORF de 1098 pb	Halo jaune sur pectine + BBT	186
Oligogalacturo- nate lyase d' <i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> 3937	pULB113 (35 kb) réduit à 3,5 kb	Complémentation de la mutation Ogl ⁻	193
Exopolygalactu- ronase d' <i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> EC16	pUC19 (8,5 kb) réduit à 2,3 kb ORF de 1815 pb	Anticorps 0,4%	92

Tableau 4b. Clonage de gènes impliqués dans d'autres activités de dégradation des pectines chez *Erwinia*. BBT : Bleu de bromothymol.

2 - Le niveau d'expression des gènes clonés est élevé lorsque le gène est placé à proximité d'un promoteur puissant du type *lacZ* (vecteurs de la série pUC) ou *tac* (vecteur de type pKK). Dans ce cas, l'expression devient dépendante du sens d'orientation de l'insert sur le vecteur (125). L'activité PNL de *Erwinia carotovora* est 50 fois supérieure chez *E. coli* lorsque le gène est placé sous le contrôle du promoteur *tac* du pKK223-3 (173). On observe le même phénomène, concernant le gène *pelE* d'*E. chrysanthemi* placé à proximité du promoteur *lacZ* (282).

Dans certains cas, on observe des niveaux d'activités supérieurs chez *E. coli*, bien que le gène soit sous le contrôle de son propre promoteur (92,135,190).

3 - Dans la plupart des cas, la synthèse des enzymes clonées chez *E. coli* devient constitutive avec perte de l'inductibilité (43,124,125,157). Les gènes clonés chez *E. coli* ne sont plus soumis au système de régulation existant chez *Erwinia*, ce qui s'explique par l'absence chez *E. coli*, des gènes impliqués dans cette régulation. C'est le cas des gènes *pelB* et *pelE* qui sont soumis à la répression par le catabolite (glucose) et qui perdent leur inductibilité par le polygalacturonate chez *E. coli* (198).

4 - La localisation des pectinases qui est extracellulaire chez *Erwinia* devient périplasmique chez *E. coli* (12,43,124,125,135,185,190,255,285). L'accumulation des PLs au niveau du périplasme chez les mutants *Out*⁻ d'*E. chrysanthemi* et des clones recombinants pectinolytiques d'*E. coli*, incite à penser que la sécrétion des pectinases chez *Erwinia* est un processus se déroulant en deux étapes. Une première étape, au cours de laquelle la pré-protéine est transférée du cytoplasme vers l'espace périplasmique, se déroulant durant la traduction de l'ARNm, ici c'est la séquence peptide signal qui intervient dans le transfert. Une deuxième étape de transport, faisant appel à des protéines spécifiques - codées par les gènes *out* dans le cas des pectinases et des cellulases de *Erwinia* - et permettant le transfert de la protéine mature à travers la membrane externe (44). Cette localisation différente chez *E. coli*, tout comme celle observée chez les mutants *Out*⁻ d'*E. chrysanthemi*, s'explique par l'absence des gènes codant pour les protéines impliquées dans la sécrétion de ces enzymes.

La séquence signal amino-terminale des pectinases d'*Erwinia* est donc correctement interprétée par *E. coli*, de même que les signaux de transcription et de traduction.

5 - Les produits des gènes synthétisés par *E. coli* possèdent des caractéristiques semblables à ceux d'*Erwinia* concernant notamment :

- * les points isoélectriques (12,43,124,285);
- * les poids moléculaires (125,135,173);
- * les modes d'actions (125,186,285).

De plus, des souches d'*E. coli* synthétisant des quantités importantes de PLe (produit du gène *peLE*), deviennent capables de macérer les tissus végétaux (124,125,135).

10.1.5.2 - Séquençage.

Certains gènes codant pour des pectinases d' *Erwinia* ont été séquencés (Tableau 5), il s'agit :

- du gène codant pour la pectine méthylestérase d' *E. chrysanthemi* B374, le gène de structure correspond à un cadre de lecture ouvert (ORF) de 1098 pb codant pour un polypeptide de 366 acides aminés (acides aminés) ayant un poids moléculaire (PM) de 39318 Da. Ce gène est porté sur un fragment *NruI-EcoRV* de 1,74 kb (186) et se trouve placé à environ 2 kb du gène *peLD*.

- du gène *peLA* d' *E. chrysanthemi* EC16, correspondant à un ORF de 1179 pb codant pour une pré-protéine de 393 acides aminés d'un PM évalué à 42077 Da. La protéine mature est constituée de 361 acides aminés (38756 Da) (246). Ce gène est distant de 900 pb du gène *peLE*.

- du gène *peLA* d' *E. carotovora* EC, un ORF de 1122 pb codant pour un polypeptide de 374 acides aminés a été mis en évidence, son PM a été estimé à 44 kDa par SDS-PAGE. Ici, la séquence peptide signal a une longueur de 22 acides aminés (137).

- du gène *peLB* d' *E. chrysanthemi* EC16, correspondant à un ORF de 1125 pb codant pour une pré-protéine de 375 acides aminés d'un PM estimé à 40213 Da et à 38756 Da pour la protéine mature. Les gènes *peLB* et *peLC* sont séparés par 500 paires de bases seulement (125).

- du gène *peLB* d' *E. carotovora* EC qui possède des caractéristiques strictement identiques à celles du gène *peLA* (136). Ces deux gènes et leurs produits ont été comparés et il ressort que les séquences nucléotidiques sont homologues à 82% et que les séquences en acides aminés le sont à 88% (104).

- du gène *peLC* d' *E. chrysanthemi* EC16; ce gène est inclus dans un ORF de 1125 pb codant pour une pré-protéine de 375 acides aminés et d'un PM évalué à 39923 Da et à 37676 Da pour la protéine mature (246).

- du gène *peLE* d' *E. chrysanthemi* EC16 d'une longueur de 1155 pb, codant pour une pré-protéine de 385 acides aminés (41115 Da). La protéine mature est constituée de 355 acides aminés (38037 Da) (125).

- du gène *peLE* d' *E. chrysanthemi* 3937; le gène de structure correspond à un ORF de 1212 pb codant pour un polypeptide de 404 acides aminés ayant un PM de 43095 Da. Ce gène a été isolé sur un fragment *DraI-DraI* de 1,7 kb (194). Une séquence peptide signal potentielle codant pour un peptide de 41 acides aminés a été mise en évidence.

Gène (produit)	Souche	ORF (pb)	Séquence signal (aa)	Réf.
<i>pelA</i> (PLa)	<i>E. carotovora</i> EC	1122	22	137
<i>pelB</i> (PLb)	<i>E. carotovora</i> EC	1122	22	136
<i>pnlA</i> (PnlA)	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71	870	-	36
<i>pelA</i> (PLa)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16	1179	32	246
<i>pelB</i> (PLb)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16	1125	22	125
<i>pelC</i> (PLc)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16	1125	22	246
<i>pelE</i> (PLE)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16	1155	30	125
<i>pelE</i> (PLE)	<i>E. chrysanthemi</i> 3937	1212	41	194
<i>pelX</i> (ExoPL)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16 (UM1005)	2247	26	27
<i>pme</i> (PME)	<i>E. chrysanthemi</i> B374	1098	24	186
<i>pme</i> (PME)	<i>P. solanacearum</i>	1188		241
<i>pehX</i> (ExoPG)	<i>E. chrysanthemi</i> EC16	1812	27	92
<i>ogl</i> (OGL)	<i>E. chrysanthemi</i> 3937	1164	-	194
<i>pely</i> (PL)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> ICPB3821	1623	23	148

Tableau 5. Récapitulatif concernant les différents gènes codant pour des pectinases, clonés chez *E. coli* et séquencés. Abréviations : aa = acide aminé; OGL = oligogalacturonate lyase; ORF = open reading frame ou cadre ouvert de lecture; pb = paire de base; PG = polygalacturonase; PL = pectate lyase; PME = pectine méthylestérase.

- du gène *pelX* d' *E. chrysanthemi* EC16 codant pour une exo-polygalacturonate lyase. Ce gène a été isolé sur un fragment *EcoRV-EcoRV* de 3,3 kb, la partie structurale du gène étant située sur un ORF de 2247 pb codant pour un polypeptide de 749 acides aminés ayant un PM de 82200 Da. La forme secrétée ayant un PM de 79500 Da et étant constituée de 743 acides aminés (27).

- du gène *ogl* d' *E. chrysanthemi* 3937, le gène de structure correspond à un ORF de 1164 pb codant pour un polypeptide de 388 acides aminés ayant un PM de 44124 Da. Ce gène est porté sur un fragment *NsiI-PstI* de 2,3 kb. La caractérisation du produit du gène *ogl* a révélé la présence de deux polypeptides de 44 et 41 kDa. Le polypeptide de 41 kDa correspond à la forme mature de l'enzyme obtenue après clivage du précurseur. Ce qui indique que l'OGL peut être périplasmique (194).

Des études comparatives, concernant les régions de régulation des gènes *ogl*, *kdgT* et *pelE*, ont révélé l'existence d'une séquence d'ADN hautement conservée qui pourrait correspondre au site de fixation du répresseur (produit du gène *kdgR*). Une séquence du même type a pu également être mise en évidence dans le cas du gène *pelX*, ce qui incite à penser que l'expression de ce dernier est également sous le contrôle du répresseur *kdgR* (27). De plus, des signaux de début de transcription partageant de fortes homologies avec la région des promoteurs "consensus" d'*E. coli* ont été mis en évidence au niveau des deux gènes (194).

Des comparaisons de séquences en acides aminés entre l'OGL et la PLe n'ont révélé aucune région homologue, bien que ces deux enzymes aient des modes d'action comparables (194). D'autre part, des expériences d'hybridation ADN/ADN ont permis de mettre en évidence des homologies importantes entre les gènes *pelB* et *pelC* d'*E. chrysanthemi*, suggérant de ce fait, une duplication d'un des deux gènes. Par contre, aucune homologie n'a pu être mise en évidence entre le gène *pelC* et les autres gènes *pel* chez *E. chrysanthemi* (219).

Mis à part le gène *pelX*, les gènes *pel* d'*Erwinia* ont des tailles comparables comprises entre 1100 et 1200 pb, il est fort probable qu'ils dérivent d'un même gène ancestral qui se serait dupliqué, les copies subissant au cours de l'évolution des modifications entraînant la formation de 5 isoenzymes rendant les souches plus compétitives.

10.2 - CLONAGE DES PECTINASES APPARTENANT A D'AUTRES GENRES BACTERIENS (Tableau 4c).

10.2.1 - Pectate lyase de *Cellvibrio mixtus*.

Il s'agit d'une bactérie Gram-négative, aérobie, qui vit dans le sol en tant que saprophyte et qui est capable de dégrader rapidement un grand nombre de polysaccharides tels que la cellulose, la chitine, le xylane, l'amidon et la pectine.

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Pectate lyase de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (<i>pely</i>)	pUC19 (20 kb) réduit à 3,6 kb ORF de 1623 pb	Halo de clarification sur PGA + CaCl ₂ 1 M 0,06%	148
Pectate lyase de <i>Klebsiella oxytoca</i> JMP4505	pHC79 (37,8 kb) réduit à 6,6 kb	Dépression sur milieu cristal violet/pectate 0,4%	260
Pectinase de <i>Cell- vibrio mixtus</i>	pHC79 réduit à 14,5 kb	Dépression sur milieu cristal violet/pectate 0,03%	278
Polygalacturonase de <i>Pseudomonas solanacearum</i> (<i>pgIA</i>)	pLAFR3 (23,8 kb) réduit à 1,9 kb ORF de 1635 pb	Halo de clarification sur PGA + CTAB 0,2%	101, 214
Polygalacturonase d' <i>Aspergillus niger</i> RH5344	pUC9 (1,3 kb) ORF de 1089 pb	Sonde oligo- nucléotidique 0,06%	202

Tableau 4c. Clonage de gènes impliqués dans des activités de dégradation des pectines chez d'autres genres bactériens. CTAB : Cetyl triméthylammonium bromide.

L'ensemble des gènes, dont les produits sont impliqués dans ces dégradations, a été cloné chez *E. coli* en utilisant un cosmide (pHC79) (260,278). Ces gènes sont regroupés sur un fragment d'ADN de 94 kb dans l'ordre suivant : amylase - esculinase - cellobiase (1,4- β -glucosidase) - chitinase - carboxyméthylcellulase - pectate lyase (278).

Le gène codant pour la pectate lyase a été isolé par sous-clonage dans le pBR325 sur un fragment d'ADN de 6,6 kb et son expression a été testée chez d'autres genres bactériens à Gram-négatif, en plaçant l'insert sur un plasmide à large spectre d'hôtes du type pR751. Le gène s'exprime parfaitement chez plusieurs souches d'*E. coli*, ainsi que chez *Aeromonas hydrophila*, *Azotomonas insolita*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* et *Alcaligenes eutrophus* (260).

10.2.2 - Pectate lyase de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Il s'agit d'une entérobactérie, Gram-négative, aérobie, chez laquelle l'activité pectate lyase est d'un niveau faible (l'activité spécifique est 100 fois inférieure à celle observée chez *E. chrysanthemi*) et est intracellulaire (cytoplasmique et périplasmique) (34,243).

Le gène *peLY* responsable de la synthèse de la pectate lyase a été cloné chez *E. coli* dans un vecteur d'expression du type pUC (148), en voici les principales caractéristiques :

- le gène s'exprime chez *E. coli* quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur, avec cependant un niveau d'expression plus élevé (multiplié par 9) lorsque la région codante est placée en aval du promoteur *lac* du vecteur.

- accumulation de l'activité pectate lyase au niveau de l'espace périplasmique chez *E. coli*.
- propriétés biochimiques identiques à celles observées chez *Y. pseudotuberculosis* concernant le point isoélectrique (pI) (4,5), le poids moléculaire (PM) (55 kDa) et l'influence des ions Ca^{++} et de l'EDTA sur l'activité.

Le séquençage a permis de mettre en évidence un cadre de lecture ouvert de 1623 pb correspondant au gène de structure, ainsi qu'une séquence peptide signal codant pour un peptide de 23 acides aminés. Aucune homologie n'a pu être mise en évidence entre la séquence en acides aminés de la pectate lyase de *Y. pseudotuberculosis* et celles de *Erwinia*.

10.2.3 - Pectate lyase de *Pseudomonas fluorescens*.

Chez *P. fluorescens*, la synthèse de pectate lyase est régulée par les ions Ca^{++} . En présence d'ions Ca^{++} , la bactérie synthétise la pectate lyase de façon constitutive dans un milieu contenant du glucose, du glycérol ou du PGA et excrète près de 90% de l'activité PL totale dans le milieu extérieur. En l'absence d'ions Ca^{++} , la bactérie n'utilise plus le PGA comme source de carbone, produit de très faibles quantités de PL et l'activité PL est

intracellulaire.

Une banque d'ADN génomique a été réalisée en ligaturant des fragments d'ADN de 12 à 18 kb, au niveau du site *Bam*HI du pBR322. Deux clones d'*E. coli* présentant un phénotype pectinolytique ont été mis en évidence sur 2000 testés. Le sous-clonage d'un fragment *Eco*RI de 7,1 kb au niveau du pBR325, a permis de montrer que le gène était sous le contrôle de son propre promoteur puisque quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur, une activité PL est mise en évidence. Le gène responsable de cette activité a été isolé sur un fragment *Sal*I-*Xho*I de 1,7 kb. Dans ce cas, l'expression du gène *pel* devient dépendante de son orientation par rapport au promoteur du vecteur, ce qui a permis de déterminer le sens de transcription de ce gène (139).

Chez *E. coli*, l'activité PL est essentiellement associée à l'espace périplasmique (78 à 88% de l'activité totale) et les ions Ca^{++} n'ont plus d'effet sur la production et la localisation de cette activité. Cependant, les pI et PM de la PL synthétisée par *E. coli* sont identiques à ceux déterminés chez *P. fluorescens* (139).

10.2.4 - Pectinestérase de *Pseudomonas solanacearum*.

Il s'agit d'une bactérie phytopathogène du sol à Gram-négatif, aérobie stricte, capable de dégrader les tissus végétaux et qui est à l'origine de dégâts importants sur les récoltes. Cette pathogénicité est due à la production de polysaccharides extracellulaires, à la synthèse d'enzymes impliquées dans la dégradation des parois cellulaires de végétaux (cellulases et pectinases) et de composés tels que l'acide indolacétique (AIA) et l'éthylène responsables de la croissance des végétaux.

Deux clones d'*E. coli* positifs pour l'activité pectinestérase ont été isolés à partir d'une banque d'ADN génomique réalisée dans le pBR322. L'analyse de restriction des inserts et le sous-clonage de fragments d'ADN obtenus par délétion à l'exonucléase BAL31, ont permis de montrer que le gène codant pour la pectine méthylestérase est localisé sur un fragment d'ADN de 1,34 kb et que le niveau d'expression du gène (x14) est fonction de son orientation par rapport au promoteur P2 du pBR322. La séquence nucléotidique du fragment *Sau*3AI-*Cla*I de 1,7 kb contenant le gène de la pectinestérase, a révélée l'existence d'un cadre de lecture ouvert de 1188 pb codant pour un polypeptide de 41 kDa. D'autre part, la séquence peptidique de la pectinestérase de *P. solanacearum* présente certaines homologues avec celles d' *E. chrysanthemi* et de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Enfin, l'activité clonée est essentiellement cytoplasmique chez *E. coli* (70%) contre 30% au niveau du surnageant de culture (241).

10.2.5 - Endopolygalacturonase de *P. solanacearum*.

Le gène *pglA* codant pour la polygalacturonase a été cloné chez *E. coli* à l'aide d'un cosmide (199) et un fragment de 1,8 kb portant le gène *pglA* a été sous-cloné dans le pUC9 (214).

- Le gène s'exprime chez *E. coli* à partir de son propre promoteur.
- Le produit du gène *pglA* possède des caractéristiques identiques à celles de la polygalacturonase de *P. solanacearum* concernant le pI (9,0) et le PM (52 kDa).
- La polygalacturonase qui est extracellulaire chez *P. solanacearum* devient périplasmique chez *E. coli*.

L'équipe de C. Allen a également cloné le gène responsable de la synthèse de l'endopolygalacturonase de *P. solanacearum*. Ce gène partage d'importantes homologues avec le gène *pglA* et les produits des deux gènes ont des caractéristiques biochimiques similaires concernant notamment les pI et PM (3).

10.3 - CONCLUSION.

De nombreux gènes codant pour des pectinases s'expriment donc parfaitement chez *E. coli*, bien que dans la plupart des cas, ils soient sous le contrôle de leur propre promoteur. Les gènes qui s'expriment chez *E. coli* perdent leur inductibilité, puisqu'ils ne sont plus soumis aux mêmes systèmes de régulation et les produits de ces gènes occupent une localisation différente chez la souche recombinante.

11 - GENES DE BACTEROIDES CLONES CHEZ E COLI.

De nombreux gènes provenant de *Bacteroides* ont été clonés chez *E. coli*. Il s'agit essentiellement de gènes dont les produits sont impliqués dans la dégradation de polysaccharides complexes (xylane, dextran, pullulane, cellulose et chondroïtine sulfate), mais également occupant des fonctions très diverses, tels que des gènes d'antibio-résistances, de virulence, d'assimilation de l'azote et impliqués dans des mécanismes de réparation de l'ADN. Les gènes clonés proviennent essentiellement d'espèces de *Bacteroides* appartenant au groupe *fragilis*.

11.1 - CLONAGE DE GENES DE BACTEROIDES IMPLIQUES DANS CERTAINES FONCTIONS METABOLIQUES ET PATHOLOGIQUES.

11.1.1 - Sous-unités de pilines de *Bacteroides* (Tableau 6a).

11.1.1.1 - Sous-unité de la piline de *D. nodosus*.

La piline de *D. nodosus*, qui est l'agent causal de la pourriture du pied du mouton, constitue l'antigène vaccinant le plus protecteur ce qui explique l'intérêt porté sur ce modèle par l'équipe de T. Elleman (60,61,62,63,64,65).

L'expression chez *E.coli* des gènes codant pour la sous-unité de la piline devient constitutive et est correcte, les gènes s'exprimant dans la plupart des cas, à partir de leur propre promoteur (4,20); le niveau d'expression chez *E.coli* devient comparable à celui obtenu chez *Dichelobacter* lorsque le gène est placé sous le contrôle du promoteur *trp* du pDR720 (62). Les pilines synthétisées par *E.coli* représentent alors 5% des protéines cellulaires totales.

La protéine synthétisée par *E.coli* possède des caractéristiques assez différentes de celle produite par *Dichelobacter*, puisqu'elle ne confère pas de pouvoir vaccinant - bien que les épitopes nécessaires à la production d'anticorps agglutinant soient présents (62) et que son PM soit identique (4) - contrairement à celle produite par *Pseudomonas aeruginosa* (64). Elle est localisée au niveau de la membrane interne contrairement à celle synthétisée par *Dichelobacter* ou *Pseudomonas* qui est externe.

Très récemment, Billington *et al.* ont montré que les gènes dont les produits sont impliqués dans l'assemblage des sous-unités des pilines sont localisés sur différentes régions du chromosome de *D. nodosus* (14).

Des comparaisons de séquences en acides aminés, entre les pilines des différentes souches de *D. nodosus*, ont permis de préciser leur classement dans les différents sérogroupes (68,100). D'autres comparaisons de séquences en acides aminés, entre les pilines propres à *D.*

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Piline de <i>D. nodosus</i> 198	pBR322 (6,5 kb) ORF de 753 pb	Anticorps 0,8%	60,61
Piline de <i>D. nodosus</i> AC16	pUC19 (6,7 kb) réduit à 2,5 kb	Anticorps	20
Piline de <i>D. nodosus</i> 351	pBR322 (3,1 kb) ORF de 480 pb	Sonde ADN marquée de <i>D. nodosus</i> 265	100
Piline de <i>D. nodosus</i> 340	pBR322 (3,0 kb) ORF de 471 pb	Sonde ADN marquée de <i>D. nodosus</i> 198 + Anticorps	68
Piline de <i>D. nodosus</i> 265	pUN121 (3,2 kb) ORF de 468 pb	Sonde ADN marquée de <i>D. nodosus</i> 198	63
Piline de <i>D. nodosus</i> VCS1001	pTR262 (5,5 kb) réduit à 3,4 kb	Anticorps 0,4%	4

Tableau 6a. Stratégies employées pour cloner les gènes codant pour les sous unités des pilines de *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*.

nodosus et à *P. aeruginosa*, ont révélé l'existence d'importantes homologies entre ces pilines (63,64), ce qui explique que *P. aeruginosa* soit la bactérie hôte de choix pour la production des pilines de *D. nodosus* (65,114).

11.1.1.2 - **Sous-unité de la piline de *P. gingivalis*.**

Le gène codant pour la sous-unité de la piline de *P. gingivalis* 381 a été cloné dans le pUC13 et séquencé par l'équipe de D.P. Dickinson (54). Son expression chez *E. coli* n'a pas été testée puisque les clones recombinants ont été identifiés à l'aide d'une sonde oligonucléotidique marquée fabriquée à partir de la séquence peptidique de la région amino-terminale de la sous-unité de la piline. La taille de la protéine mature a été déduite d'après la séquence nucléotidique et estimée à 35924 Da, la forme sécrétoire ayant une séquence peptide leader hydrophile de 10 acides aminés s'apparentant à celle des autres pilines.

D'autres gènes impliqués dans certaines fonctions métaboliques et pathologiques de diverses espèces appartenant au genre *Bacteroides* ont été clonés chez *E coli* (Tableau 6b).

11.1.2 - **Protéine membranaire de *P. gingivalis*.**

Une banque d'ADN génomique de la souche *P. gingivalis* 381 a été réalisée dans le vecteur phagique lambda L47-1. Un clone d'*E. coli* synthétisant une protéine recombinante identifiée comme appartenant à la membrane externe de *P. gingivalis* 381 a été mis en évidence par l'intermédiaire d'anticorps. L'insert a été sous cloné dans le pACYC184 et confère à *E. coli* la capacité de synthétiser une protéine de 40 kDa. Cette protéine a été purifiée et séquencée; les anticorps préparés à partir de cette protéine recombinante réagissent de façon croisée avec une protéine de la membrane externe de *P. gingivalis* 381 ayant une taille similaire.

11.1.3 - **Protéase de *D. nodosus*.**

Moses *et al.* ont cloné le gène *prvA* codant pour l'une des protéases de *D. nodosus*; ces protéases sont capables de dégrader un certain nombre de composants intercellulaires tels que collagène, kératine, élastine et fibrinogène, jouant de ce fait un rôle important dans la pathogénicité de l'espèce.

Un clone recombinant (sur 1000) synthétisant un polypeptide de 50 kDa réagissant avec les anticorps anti-sérine protéase, a pu être mis en évidence à partir d'une banque génomique réalisée dans le pBR322, bien que ce dernier ne présente pas d'activité protéasique. Le gène responsable de la synthèse de ce polypeptide a été localisé sur un fragment d'ADN de 1,4 kb et a permis, par hybridation de Southern, d'identifier d'autres gènes codant pour des protéases,

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Invertase de <i>B. fragilis</i> BF-1	pEcoR251 (6,0 kb)	Dégradation du saccharose	219a
Protéase de <i>D. nodosus</i> (prvA) VCS1001	pBR322 (2,8 kb) ORF de 1341 pb	Anticorps 0,2%	164
β -lactamase de <i>B. fragilis</i> TAL3636 (<i>ccrA</i>)	pCCL2203 (6,5 kb) réduit à 2,4 kb ORF de 747 pb	Résistance à l'ampicilline 0,65%	188
β -lactamase de <i>B. fragilis</i> TAL2480	pJST61 (3,6 kb) ORF de 747 pb	Résistance à l'imipé- nem et la céfoxitine 0,014%	251
Gènes de résistance à Tc et Em de <i>B.</i> <i>thetaitaomicron</i> DOT	pNJR1 (30 kb) Tc ^r : 1,1 kb Em ^r : 1,5 kb	Souches de <i>B. uniformis</i> Em ^r et/ou Tc ^r 0,4%	233
Glutamine-synthétase de <i>B. fragilis</i> Bf-1 (<i>glnA</i>)	pEcoR251 (8,0 kb) réduit à 4,0 kb	<i>E. coli</i> GlnA ⁻	238
Chondroïtine-lyase II de <i>B. thetaiotaomicron</i> 5482	pHC79 réduit à 4,8 kb	Disaccharides insaturés 1,2%	87
Neuraminidase de <i>B. fragilis</i> Bf-1 (gène <i>nanH</i>)	pJST61 (4,5 kb) réduit à 2,2 kb	Complémentation de mutation	201
Gène <i>recA</i> -like* de <i>B. fragilis</i>	pEcoR251 (5,2 kb)	<i>E. coli</i> RecA ⁻	81

Tableau 6b. Clonage de gènes de *Bacteroides* impliqués dans certaines fonctions métaboliques et pathologiques. Abréviations : Em^r = résistance vis-à-vis de l'érythromycine; *recA*-like* : gène analogue à celui d'*E. coli* et dont le produit est impliqué dans la recombinaison autorisant l'échange de brins entre molécules d'ADN; Tc^r = résistance vis-à-vis de la tétracycline.

suggérant de ce fait, l'existence chez *D. nodosus* d'une famille de protéases.

Le séquençage du gène *prvA* incomplet, a permis de mettre en évidence l'existence d'une séquence peptide signal de 20 acides aminés, précédée d'un site de fixation du ribosome et suivie d'un ORF (164).

11.1.4 - Glutamine synthétase de *B. fragilis*.

Le gène *glnA* de *B. fragilis* codant pour la glutamine synthétase (GS) a été cloné à l'aide du plasmide pJS139 chez une souche d'*E. coli* GlnA⁻ incapable d'utiliser le sulfate d'ammonium comme seule source d'azote pour sa croissance (238).

Chez *E. coli*, le gène s'exprime à partir de son propre promoteur et reste sujet à la répression par l'azote. Il est de plus, sensible à l'inhibition de retour par les acides aminés et par l'AMP et son produit est inactivé par la phosphodiesterase (239). D'autre part, l'expression du gène *glnA* de *B. fragilis* cloné est réprimée en présence de glutamate contrairement à celle du gène *glnA* appartenant à *E. coli*.

La protéine recombinante synthétisée par *E. coli* possède un PM identique à celui de la sous-unité de la GS produite par *B. fragilis* (75 kDa). Une réaction croisée très faible a été observée entre les anticorps anti-GS de *B. fragilis* et la sous-unité GS de la souche sauvage d'*E. coli*, ce qui s'explique par le fait qu'aucune homologie n'a pu être mise en évidence entre les gènes *glnA* d'*E. coli* et de *B. fragilis*.

11.1.5 - Gène *recA*-like de *B. fragilis*.

Goodman *et al.* ont étudié l'expression du gène *recA*-like (impliqué dans le processus de recombinaison homologue) de *B. fragilis* par clonage en utilisant une souche d'*E. coli* RecA⁻ (81).

Le gène situé sur un insert de 5,2 kb sur le vecteur pEcoR251, confère au mutant RecA⁻ la capacité de croître sur un milieu contenant certains agents mutagènes tels que le méthyl méthane-sulfonate ou le 4-nitroquinoline-1-oxyde à des concentrations 10 fois supérieures à celles tolérées par la souche mutante. Cependant, la souche d'*E. coli* recombinante possède une faible capacité de réparation de l'ADN endommagé par les rayons UV, ce qui s'explique d'ailleurs par le fait, que l'on n'observe aucune induction de l'expression du gène cloné par les UV. Les auteurs suggèrent donc que ce gène n'aurait pas la même fonction chez *Bacteroides*.

Le fragment d'ADN cloné de 5,2 kb code pour deux polypeptides majeurs de 37 et 39 kDa; ces polypeptides présentent une réaction croisée avec les anticorps anti-RecA produits à partir du produit du gène *recA* d'*E. coli*.

11.1.6 - β -lactamase de *B. fragilis*.

La β -lactamase qui a été clonée chez *E. coli*, est une enzyme à large spectre d'action appartenant à la classe B, capable d'inactiver l'imipénem, le carbapénem et la céfoxitine.

Les équipes de B.A. Rasmussen (gène *ccrA* de *B. fragilis* TAL3636) et de J.S. Thompson (gène *cfiA* de *B. fragilis* TAL2480) ont rapporté à 3 mois d'intervalle, le clonage d'un gène codant pour une β -lactamase de *B. fragilis* chez *E. coli*. Ces deux équipes ont utilisé un vecteur navette capable de se répliquer chez *E. coli* et chez *Bacteroides* respectivement pCCL2203 et pJST61, ce qui leur a permis de tester l'expression du gène cloné chez deux genres bactériens différents.

Le gène s'exprime parfaitement chez *E. coli*, puisqu'il confère la résistance vis-à-vis des antibiotiques cités précédemment. Le produit du gène est localisé au niveau de l'espace périplasmique chez *E. coli* comme chez *B. fragilis*.

Le séquençage des gènes *cfiA* (251) et *ccrA* (188) a dans les deux cas mis en évidence l'existence d'un ORF codant pour un précurseur de 249 acides aminés et une séquence peptide signal d'une longueur de 18 acides aminés. Ces gènes sont donc fortement apparentés sinon identiques, la comparaison de leurs séquences respectives permettra de trancher. Ces gènes présentent d'ailleurs des homologies remarquables avec certaines régions de la β -lactamase de *Bacillus cereus* (188,251).

11.1.7 - Eléments conjugatifs impliqués dans le transfert des gènes de résistance à l'érythromycine et à la tétracycline de *B. thetaiotaomicron*.

Shoemaker *et al.* ont cloné ces deux gènes dans le cosmide navette pNJR1. Ces deux déterminants sont proches l'un de l'autre puisque dans la plupart des cas, les résistances vis-à-vis de l'érythromycine et de la tétracycline sont cotransférées. Les gènes ont été clonés séparément et ensemble sur des fragments d'ADN de 30 kb chez une souche de *B. uniformis* Tc^S et Em^S. La plupart des clones devenus résistants à la tétracycline contiennent des gènes de transfert qui permettent l'autotransfert du cosmide vers des souches réceptrices d'*E. coli* ou de *B. uniformis*.

Ces cosmides recombinants ont été isolés et introduits chez *E. coli*. Dans tous les cas, aucune expression des gènes de résistance à l'érythromycine et à la tétracycline n'a pu être mise en évidence chez *E. coli* (233).

11.1.8 - Invertase de *Bacteroides fragilis*.

B. fragilis est capable d'utiliser le saccharose grâce à la présence d'un système de transport actif du saccharose et d'une activité invertase présente au niveau intracellulaire et extracellulaire. Cette capacité de dégradation, associée à la présence d'un système de transport actif, permet à *B. fragilis* d'utiliser rapidement le substrat disponible.

R.R. Scholle et son équipe ont étudié l'expression et la régulation du système impliqué dans l'utilisation du saccharose de *B. fragilis* par clonage des gènes responsables chez *E. coli*.

Ces gènes ont été localisés sur un fragment d'ADN de 6 kb présent sur le plasmide pEcoR251 et rendent *E. coli* capable d'utiliser le saccharose comme seule source de carbone. L'activité invertase, de même que le système de transport du saccharose qui sont inductibles par le saccharose chez *B. fragilis*, deviennent constitutifs chez *E. coli*. La localisation de l'activité invertase clonée est essentiellement périplasmique (55%) contre 30% au niveau du cytoplasme et 15% au niveau extracellulaire, s'expliquant par des fuites membranaires (219a).

11.2 - CLONAGE DE GENES CODANT POUR DES POLYSACCHARIDASES DE BACTEROIDES CHEZ *E. COLI* (Tableau 6c).

11.2.1 - Cellulases de *F. succinogenes* et de *P. ruminicola*.

11.2.1.1 - Cellulases de *F. succinogenes*.

F. succinogenes est une des bactéries cellulolytiques du rumen les plus actives dans la dégradation de la cellulose cristalline. Cette dégradation dépend de la présence d'une multiplicité d'enzymes formant des complexes. Le clonage des gènes responsables de cette dégradation a permis d'étudier plus précisément les modes d'action de chaque enzyme et de connaître leur substrat spécifique.

Certains gènes provenant de *F. succinogenes* et codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose ont été clonés chez *E. coli*. Il s'agit des gènes codant pour des endoglucanases (49,248, E. Forano *et al.* 1991), β -glucanase (109) et cellodextrinase (80).

Une banque de gènes réalisée à partir de l'ADN génomique de *F. succinogenes* a été réalisée dans le pUC8. Elle a permis d'isoler sur 7000 recombinants testés, 16 clones capables d'utiliser la carboxyméthylcellulose (CMC). Des hybridations de Southern ont confirmé l'existence de 6 gènes codant pour des activités β -1,4-glucanase. Certains clones possèdent des niveaux d'activité élevés. Le gène cloné est sensible à la répression exercée par le glucose tout comme chez *F. succinogenes*. La localisation est intracellulaire chez *E. coli* et extracellulaire

Type d'activité/ Souche (gène)	Vecteur utilisé/ Taille du gène	Type de détection/ % de recombinants	Réf.
Endoglucanase de <i>F. succinogenes</i> S85 (gène <i>cel</i>)	pUC8 (6,6 kb) réduit à 1,85 kb	Zone de clarification sur CMC/rouge Congo 2,3%	49
Endoglucanase de <i>P. ruminicola</i> subsp. <i>brevis</i>	gtWES. B (6,4 kb) réduit à 2,2 kb	Halo incolore sur xylan/rouge Congo 0,14%	277
Endoglucanase de <i>P. ruminicola</i> B14	2001 (6,0 kb) réduit à 3,1 kb ORF de 1089 pb	Halo incolore sur CMC/rouge Congo 0,04%	152
β -glucanase de <i>F. succinogenes</i> S85	pUC8 (5,2 kb) réduit à 1,35 kb	Halo incolore sur lichénane/rouge Congo 0,95%	109
Cellodextrinase de <i>F. succinogenes</i> S85	pBR322 (7,7 kb) 360	Halo fluorescent à nm par hydrolyse du MUC 0,02%	80
Xylanase, xylosidase et arabinosidase de <i>B. ovatus</i> V975	pUC18 (3,9 kb) réduit à 3,2 kb	Halo incolore sur RBB-xylan 0,15%	269
Xylanase de <i>P. ruminicola</i> 23	pUC18 (5,7 kb) réduit à 2,7 kb	Halo incolore sur RBB-xylan 0,125%	267
Xylanase de <i>F. succinogenes</i> S85	pBR322 (9,4 kb) réduit à 3,0 kb	Halo incolore sur RBB-xylan 0,03%	234
Pullulanase de <i>B. thetaiotaomicron</i> 5482A	pHC79 réduit à 4,1 kb	Sucres réducteurs sur pullulane 1,2%	235
Dextranase de <i>B. thetaiotaomicron</i> 489	pBR322 réduit à 0,7 kb	Halo incolore sur bleu-dextran 0,06%	121a

Tableau 6c. Clonage des gènes de *Bacteroides* impliqués dans la dégradation de certains polysaccharides. Abréviations : CMC = Carboxyméthylcellulose, MUC = 4-méthylumbelliferyl- β -D-cellobioside, RBB-xylan = Bleu brillant rémazol-xylane.

chez *F. succinogenes* (49).

Le gène *cel* codant pour une des endoglucanases de *F. succinogenes* a été isolé à partir de cette banque. Chez *E. coli*, on observe une expression du gène cloné quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur et le gène est également sensible à la répression par le catabolite. Le produit du gène est localisé au niveau du périplasme et ses caractéristiques (pH optimum, poids moléculaire et influence des ions divalents sur l'activité) sont très proches de l'endoglucanase synthétisée par *F. succinogenes*, l'enzyme clonée étant cependant plus sensible à la température et à certains détergents ou métaux lourds (248).

Un autre gène codant pour une β -1,4-endoglucanase a été isolé sur un fragment d'ADN de 2,2 kb porté par le pUC18 et confère à la souche d'*E. coli* recombinante la capacité de dégradation de la carboxyméthylcellulose et du xylane. L'expression de l'activité CMCase n'est plus sensible à la répression catabolitique par le glucose. Son pH optimum est de 6,2 et sa température optimale de 37°C, l'activité diminuant rapidement pour des températures plus élevées. Le gène responsable de cette activité code pour une protéine de 55 kDa (E. Forano *et al.* 1991, non publié).

Une autre banque de gènes, réalisée dans le pBR322, a permis de mettre en évidence des recombinants positifs pour l'activité cellodextrinase (2 clones positifs sur 100000 testés portant un fragment d'ADN commun de 7,7 kb). La taille de l'insert portant le gène de la cellodextrinase a été réduite à 2,5 kb par sous-clonage. Cette activité qui est périplasmique chez *F. succinogenes* devient cytoplasmique chez *E. coli*. D'autre part, l'expression du gène de la cellodextrinase est sensible à la répression par le catabolite et n'est pas induite par le cellobiose. Le gène de la cellodextrinase qui s'exprime chez *E. coli*, est parfaitement fonctionnel et code pour une enzyme ayant des caractéristiques identiques à celles de *F. succinogenes* (K_m et PM) (80).

Le gène codant pour la β -glucanase (1,3-1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase) a été mis en évidence sur un fragment d'ADN commun de 5,2 kb inséré sur le pUC8 et réduit à 1,35 kb par sous-clonage dans les pUC18 et pUC19. Il s'agit d'une enzyme agissant uniquement sur les β -glucanes contenant des liaisons β -(1,3)(1,4) qui n'avait pas été mise en évidence chez *F. succinogenes* puisque les cellulases sont sous forme de complexes. Chez *E. coli*, le gène s'exprime à partir de son propre promoteur et l'expression de ce dernier est sensible à la répression par le glucose. La localisation du produit du gène est essentiellement cytoplasmique chez *E. coli* (109). Le séquençage du fragment d'ADN responsable de l'activité β -glucanase, a permis de mettre en évidence l'existence d'un cadre ouvert de lecteur de 1047 pb codant pour un polypeptide de 349 acides aminés possédant une séquence signal de 27 acides aminés. De plus, la région des promoteurs consensus située en amont du gène de structure est étroitement apparentée à celle d'*E. coli* et de *Bacillus subtilis*. Enfin, le gène de structure codant pour la β -glucanase de *F. succinogenes* partage d'importantes homologues (57%) avec le gène codant

pour la β -1,3-1,4-endoglucanase de *B. subtilis* (249).

11.2.1.2 - Endoglucanases de *P. ruminicola*.

Le clonage a été réalisé à l'aide du vecteur phagique lambda 2001 et a permis de mettre en évidence 8 clones recombinants positifs pour l'activité carboxyméthylcellulase sur 20000 testés et portant un fragment d'ADN commun de 6 kb. L'analyse de restriction de l'insert et le sous-clonage a permis d'isoler le gène responsable de cette activité sur un fragment de 3,1 kb. Le niveau d'activité est élevé chez *E. coli* lorsque le gène est placé sous le contrôle du promoteur *lac* du pUC18. Le séquençage du gène a permis de mettre en évidence un cadre de lecture ouvert de 1089 pb codant pour un polypeptide de 40481 Da. La séquence de ce gène présente de nombreuses homologies avec celles des gènes codant pour les endoglucanases de *Ruminococcus albus* et *Clostridium thermocellum* (152).

Le gène codant pour l'endoglucanase de *P. ruminicola* sp. *brevis* a également été cloné chez *E. coli*. Le sous-clonage réalisé dans les pUC18 et pUC19 a permis de localiser le gène sur un fragment d'ADN de 2,2 kb et de confirmer que le promoteur du gène de *Prevotella* n'est pas fonctionnel chez *E. coli* (277).

11.2.2 - Xylanases de *B. ovatus*, *F. succinogenes* et *P. ruminicola*.

11.2.2.1 - Xylanases de *B. ovatus*.

Les gènes codant pour les activités xylanases, xylosidases et arabinosidases, ont été clonés à l'aide du pUC18 sur un fragment d'ADN génomique de 3,9 kb provenant de *B. ovatus* réduit ensuite à la taille de 2 kb.

Les 3 activités s'expriment chez *E. coli* et sont associées à la bactérie. L'expression chez *E. coli* du gène de la xylanase est indépendante de celle des deux autres enzymes alors que celles des xylosidases et arabinosidases paraissent coordonnées. Chez *B. ovatus*, les 3 activités enzymatiques sont soumises à un contrôle de régulation par le xylane, en effet, en présence de glucose, les activités xylanase, xylosidase et arabinosidase sont respectivement 50 fois, 6 fois et 100 fois inférieures (269).

11.2.2.2 - Xylanase de *P. ruminicola* 23.

Six clones positifs pour l'activité xylanase ont été isolés sur milieu xylane-R bleu brillant rémazol. Ces clones portent un insert commun de 5,7 kb sur le pUC18 et l'activité xylanase est encore présente sur un fragment de 2,7 kb.

Le niveau d'activité xylanase, qui devient constitutive chez *E. coli*, est comparable à celui obtenu chez *Prevotella*. Chez *E. coli*, le gène est sous le contrôle de son propre promoteur puisqu'une activité xylanase est présente quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur et que la souche soit cultivée en présence ou non d'IPTG. Des expériences d'hybridations de Southern entre l'insert de 2,7 kb utilisé comme sonde et l'ADN génomique des souches de *P. ruminicola* D31d et H15a ont permis de mettre en évidence une bande d'hybridation dans les deux cas (267).

Le gène codant pour l'activité xylanase de *P. ruminicola* 23 a été transféré chez des souches de *Bacteroides* appartenant à des espèces différentes (*B. uniformis* et *B. fragilis*) par l'intermédiaire du vecteur navette pVAL-1, de façon à tester l'expression hétérologue de ce gène. Le niveau d'activité obtenu chez les tranconjuguants *B. uniformis* et *B. fragilis* est très élevé puisque respectivement 1500 et 50 fois supérieur au niveau d'activité présent chez *P. ruminicola* cultivé sur glucose et sur xylane. Cette activité reste constitutive chez les transconjuguants (268).

11.2.2.3 - Xylanase de *P. ruminicola* D31d.

Le gène codant pour la xylanase de *P. ruminicola* D31d a été cloné à l'aide du pUC18 et s'exprime correctement chez *E. coli* (269a). L'activité xylanase est associée à la cellule et dégrade le xylane d'avoine et le RBB-xylane. Chez *E. coli*, le gène codant pour la xylanase fonctionne sous le contrôle de son propre promoteur puisqu'une activité xylanase est présente quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur. Enfin, ce gène ne présente pas d'hybridation croisée avec les gènes codant pour les xylanases de *P. ruminicola* 23 et *B. ovatus*, ce qui indique que ces gènes ne partagent pas d'homologies importantes.

11.2.2.4 - Xylanase de *F. succinogenes*.

Une banque d'ADN génomique a été réalisée dans le pBR322. Quatre clones, portant le même insert de 9,4 kb et présentant une activité xylanase, ont été mis en évidence sur 14000 criblés. Le sous-clonage, effectué dans les pUC18 et pUC19, a permis de réduire la taille de l'insert à 3 kb. L'activité xylanase est présente quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur, ce qui permet de penser que le gène fonctionne sous le contrôle de son propre promoteur chez *E. coli*. De plus, elle devient constitutive chez *E. coli* avec perte de la répression par le catabolite et absence d'induction par le xylane ou le xylose. Cette activité est périplasmique chez *E. coli* et extracellulaire chez *F. succinogenes*. En outre, la xylanase synthétisée par *E. coli* présente des caractéristiques similaires à celle de *F. succinogenes* (234).

11.2.3 - Pullulanase de *B. thetaiotaomicron*.

Le clonage d'un des gènes responsables de cette activité a été réalisé dans le pH79. Deux clones, portant un fragment d'ADN commun de 4,1 kb et capables de dégrader le pullulane, ont été mis en évidence sur 167 testés.

L'enzyme synthétisée par *E. coli* possède des caractéristiques proches de celle de *Bacteroides* en ce qui concerne le PM (72 kDa contre 77 kDa chez *Bacteroides*), le pH optimum (6,3 contre 6,5 chez *Bacteroides*) et la localisation (cytoplasmique chez *E. coli* comme chez *Bacteroides*).

Une partie du gène cloné a été placé sur un "vecteur suicide" (pVAL-7) et transféré chez *B. thetaiotaomicron* de façon à obtenir des mutants insertionnels et à étudier l'importance de cette activité dans l'utilisation du pullulane. Les mutants obtenus, présentent des taux de croissance sur pullulane similaires à ceux de la souche sauvage, le niveau d'activité spécifique étant cependant de moitié chez les mutants. Ce qui prouve qu'il existe une autre activité pullulanase chez *B. thetaiotaomicron* (235).

11.2.4 - Dextranase de *B. thetaiotaomicron*.

Des gènes impliqués dans la dégradation du dextran ont été clonés chez *E. coli* en utilisant le pBR322. Dix clones stables présentant des halos de clarification sur milieu riche contenant du bleu dextran ont été mis en évidence sur les 16000 transformants analysés. Dans tous les cas, le niveau d'activité dextranasique est faible chez *E. coli*. Le sous-clonage réalisé dans le vecteur d'expression pDR720 a permis de réduire la taille d'un insert à 0,7 kb. Les clones portant cet insert présentent des halos de dégradation de taille importante, ce qui laisse à penser que le niveau d'expression des gènes a été augmenté, mais la dégradation du dextran - mise en évidence par libération du chromophore bleu - s'effectue lentement. L'enzyme est donc localisée au niveau intracellulaire chez *E. coli* tout comme chez *Bacteroides* et n'est libérée qu'après la lyse des bactéries (121a).

11.3 - CLONAGE DE GENES CODANT POUR DES MUCOPOLYSACCHARIDASES DE *BACTEROIDES* CHEZ *E. COLI* (Tableau 6b).

11.3.1 - Chondroïtine lyase II de *B. thetaiotaomicron*.

Lorsque *B. thetaiotaomicron* est cultivé sur chondroïtine sulfate, il synthétise un certain nombre d'enzymes de dégradation parmi lesquelles on trouve les chondroïtine lyases I et II.

Le clonage de l'une des deux chondroïtine lyases a été réalisé dans le pH79. Deux clones, parmi les 167 testés, présentent une activité chondroïtine lyase mise en évidence par dosage des sucres réducteurs à partir des extraits cellulaires provenant des clones recombinants. Ces deux clones portent un fragment d'ADN commun de 4,8 kb qui a été sous-cloné dans le pBR328.

Le gène cloné s'apparente au gène de la chondroïtine lyase II de *B. thetaiotaomicron* puisque des anticorps préparés à partir du produit du gène cloné présentent une réaction croisée avec la chondroïtine lyase II. La chondroïtine lyase II synthétisée par *E. coli*, possède des caractéristiques semblables à celle de *Bacteroides* concernant le pH optimum, le mode d'action et les produits de réaction. Cependant, elle possède un PM plus faible compris entre 95 et 100 kDa contre 104 à 108 kDa pour celle de *Bacteroides*. De plus, l'enzyme est membranaire chez *E. coli* et périplasmique chez *Bacteroides* (87).

Des souches de *B. thetaiotaomicron*, mutées pour le gène de la chondroïtine lyase II, ont été obtenues par mutagenèse insertionnelle réalisée à l'aide du "vecteur suicide" pE3-1. De tels mutants sont encore capables d'utiliser le chondroïtine sulfate, ce qui prouve que cette activité n'est pas essentielle à la survie de *B. thetaiotaomicron* lorsqu'il est cultivé sur milieu minimum contenant comme seule source de carbone le chondroïtine sulfate (88). D'autre part, une insertion réalisée à 1 kb en amont du gène de la chondroïtine lyase II entraîne chez *Bacteroides* un arrêt de synthèse de chondroïtine lyase II mais également de sulfatase (activité complémentaire de la lyase), ce qui sous-entend que les deux gènes font partie d'un même opéron (89).

11.3.2 - Neuraminidase de *B. fragilis*.

Le gène *nanH* codant pour la neuraminidase de *B. fragilis* a été cloné par complémententation, en réalisant une banque génomique dans un vecteur navette *E. coli*/*Bacteroides* (pJST61) et en transformant dans un premier temps une souche de *B. fragilis* mutée pour ce gène. Chez *B. fragilis*, l'activité neuraminidase clonée est inductible par l'acide N-acétylneuraminique ou l'acide sialique.

Les auteurs ont ensuite transféré les vecteurs navettes portant le gène *nanH* chez *E. coli*, de façon à étudier son expression. Chez *E. coli*, le niveau d'activité observé est très faible et le gène perd son inductibilité. Lorsque ce dernier est placé sous le contrôle du promoteur lambda p_R du pJST61, le niveau d'activité neuraminidase détecté chez *E. coli* devient comparable à celui observé chez *B. fragilis*.

Des expériences de mutagenèse réalisées avec le Tn1000 ont permis de mettre en évidence une région de 2,2 kb contenant le gène de structure *nanH*.

11.4 - CONCLUSION.

La plupart des gènes de *Bacteroides*, qui ont été clonés chez *E. coli*, s'expriment donc correctement puisque les produits des gènes présentent des caractéristiques analogues sinon identiques à ceux synthétisés par *Bacteroides*. Dans la plupart des cas, les gènes clonés fonctionnent chez *E. coli* à partir de leur propre promoteur mais ne sont plus soumis aux mêmes mécanismes de régulation (perte de l'inductibilité et/ou de la répression par le catabolite), se soldant par une activité constitutive et par des niveaux d'activités différents. De plus, les produits des gènes occupent en général une localisation différente chez *E. coli*.

Toutes ces observations permettent donc de conclure que les signaux de transcription et de traduction, de même que les séquences signal amino-terminale des gènes de *Bacteroides*, sont correctement interprétés par *E. coli*.

Le genre *Bacteroides*, de par ses capacités de dégradation de polysaccharides complexes, constitue donc un modèle de travail intéressant pour l'étude de l'expression chez *E. coli* des gènes dont les produits sont impliqués dans ces dégradations. Le clonage et le séquençage de tels gènes devraient permettre de mieux comprendre la façon dont ils sont régulés et organisés sur le chromosome.

Notre laboratoire a donc entrepris de cloner les gènes de *B. thetaiotaomicron* impliqués dans la dégradation des pectines. Pour le moment, deux gènes dont les produits ont des actions complémentaires sur la dégradation des pectines ont été clonés; il s'agit des gènes codant pour les activités pectine méthylestérase et pectate lyase.

MATERIELS ET METHODES

1 - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.

1.1 - *ESCHERICHIA COLI.*

1.1.1 - Souche HB101 (21).

Utilisée comme souche réceptrice pour les expériences de transformation par les vecteurs pBR322, pBR325 et pHC79. Elle présente les caractères suivants : F⁻, *hsdS20* [*hsdM hsdR*], *ara-14*, *lacY1*, *galK12*, *xyl-5*, *proA2*, *leuB6*, *thi-1*, *supE44*, *endol*, *recA13*, *rpsL20* (Sm^r), lambda⁻.

1.1.2 - Souche C600 GalK⁻ (200).

Il s'agit de la souche réceptrice du pDR720. Son génotype est le suivant : F⁻, *galK*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*.

1.1.3 - Souche LE392 (165).

Elle est employée comme souche hôte pour le vecteur phagique lambda EMBL3. Elle présente les caractères suivants : F⁻, *hsdR514* [*r_k⁻, m_k⁻*], *lacY1* ou delta(*lacIZY*)6 *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, *supE44*, *supF58*, lambda⁻.

1.2 - *BACTEROIDES.*

Les 56 souches de *Bacteroides* (151) testées pour leur faculté d'utilisation de la pectine et du polygalacturonate appartiennent aux espèces suivantes :

* *fragilis* : 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 et 653.

* *thetaiotaomicron* : 107, 146, 217, 489 et 519.

* *distasonis* : 419, 462 et 524.

* *ruminicola*: NCFB 2202 (69).

2 - VECTEURS DE CLONAGE ET DE SOUS CLONAGE EMPLOYES.

2.1 - VECTEURS UTILISES POUR LA MISE EN PLACE DES BANQUES D'ADN GENOMIQUES.

2.1.1 - pBR322 (18).

Il s'agit d'un plasmide de 4361 pb construit à partir du pMB1 (homologue à ColE1) comprenant deux marqueurs de résistance aux antibiotiques permettant de ce fait une contre-sélection des clones transformants recombinants, et possédant une origine de réplication autorisant l'autoréplication du vecteur dans la souche hôte. Le gène de résistance à la tétracycline provient du pSC101, le gène de résistance à l'ampicilline du Tn3, et l'origine de réplication du pMB1. Plusieurs sites uniques de restriction existent au niveau de ces gènes de résistance et constituent donc des sites de clonage potentiels (Figure 6).

2.1.2 - pHC79 (96).

Le cosmide pHC79 est un vecteur de 6430 pb dérivant du pBR322. Il contient les gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampicilline ainsi que les extrémités Cos du bactériophage Lambda qui permettent l'encapsidation *in vitro* du vecteur dans la tête d'un phage (Figure 6).

2.1.3 - Lambda EMBL3 (72).

Le lambda EMBL3 dérive du lambda 1059 sur lequel on a substitué une partie de la séquence pBR322 par le fragment *trpE* (lambda EMBL1), éliminé les sites *EcoRI* (lambda EMBL2) et inséré deux lieux multisite (*SalI-EcoRI-BamHI*), orientés en sens inverse, au niveau des sites *BamHI* délimitant la région moyenne (lambda EMBL3) (Figure 7 A et B). Il s'agit d'un vecteur de remplacement de 42,4 kb, utilisé pour cloner des fragments d'ADN de taille importante (comprise entre 10 et 20 kb). La région moyenne qui contient notamment les gènes *gam*, *red* et *exo*, et impliquée dans des fonctions d'intégration, d'excision et de recombinaison, n'est pas essentielle à la réplication du phage. Elle peut donc être remplacée par un fragment d'ADN exogène dont la taille est comprise entre 9 et 23 kb. A l'issue de la transfection, les bactériophages recombinants peuvent être sélectionnés sur le phénotype spi c'est à dire sensibles à l'inhibition par le bactériophage P2. En effet, à partir du moment où la région moyenne est éliminée et remplacée par un fragment d'ADN exogène, il y a perte des gènes impliqués dans l'inhibition et le bactériophage peut alors suivre un cycle lytique ce qui se traduit par la formation de plages de lyse sur milieu gélosé. Enfin, la digestion par *SalI* du

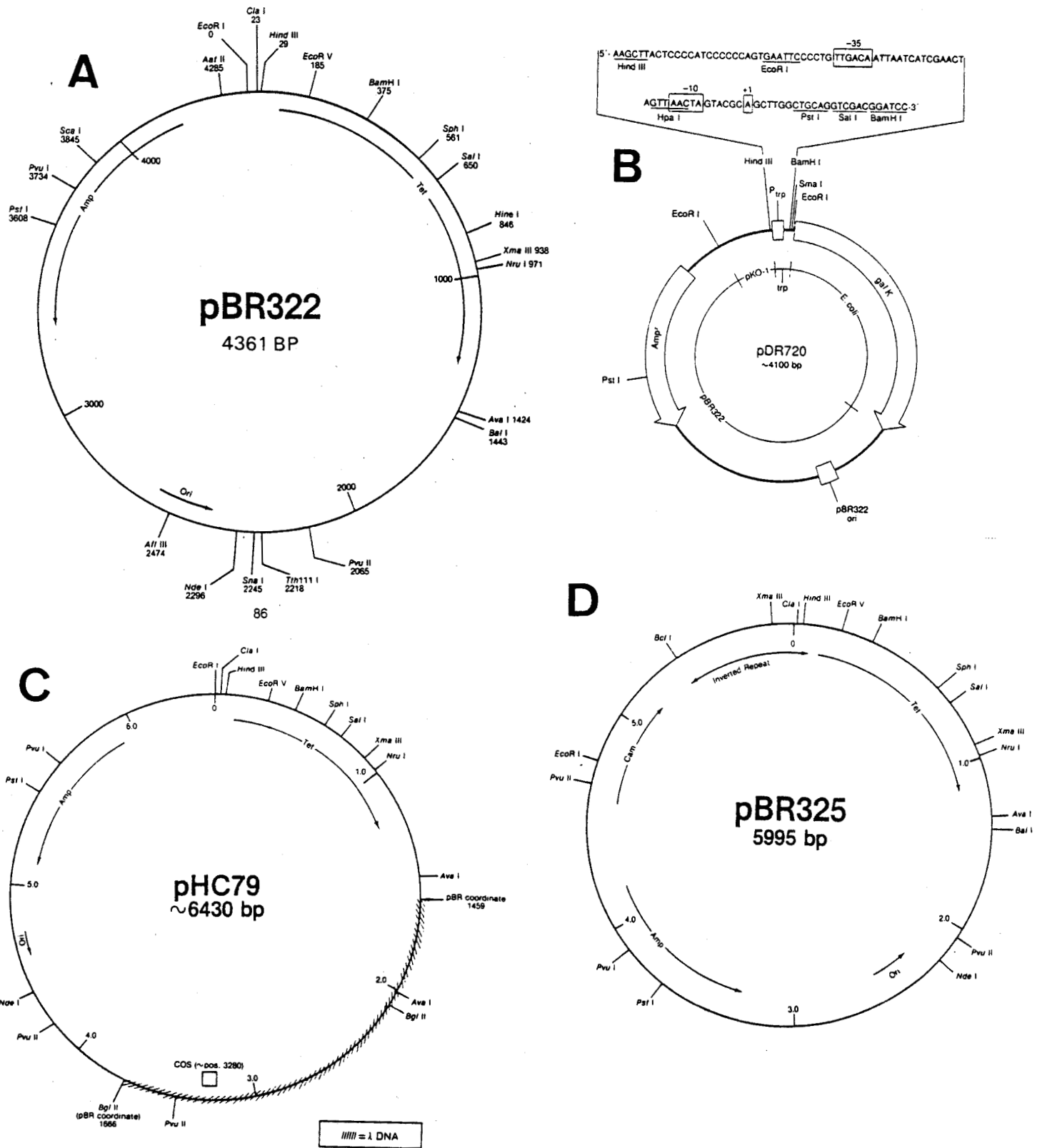


Figure 6. Cartes de restriction des vecteurs utilisés lors des expériences de clonage ou de sous-clonage réalisées chez *E. coli*.

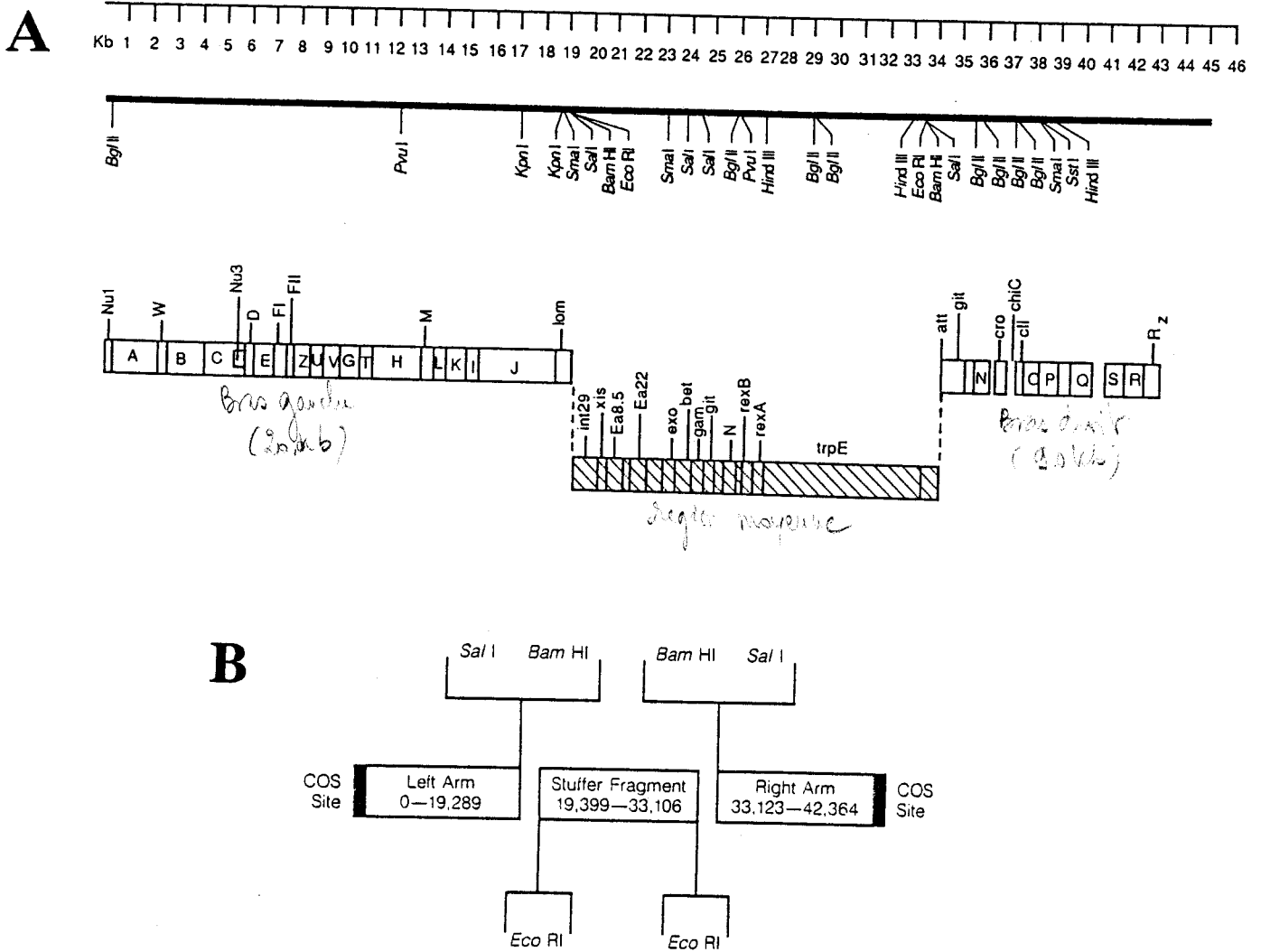


Figure 7. A: Carte de restriction du vecteur phagique lambda EMBL3; B: Schéma mettant en évidence les deux lieux multisite (polylinkers) présents aux extrémités des deux bras du vecteur et orientés en sens inverse.

vecteur permet de récupérer l'insert intact (sans fragments d'ADN provenant du vecteur).

2.2 - VECTEURS UTILISES EN SOUS-CLONAGE.

2.2.1 - pBR322 (18).

Pour la description du vecteur voir § 2.1.1.

2.2.2 - pBR325 (19).

Il s'agit d'un plasmide de 5995 pb dérivant du pBR322. Il contient en plus un gène conférant la résistance au chloramphénicol, isolé du transposon Tn9 et au niveau duquel se trouvent les sites uniques de restriction *EcoRI* et *PvuII* (Figure 6).

2.2.3 - pDR720 (200).

Il s'agit d'un vecteur d'expression d'environ 4100 pb, portant un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de signaler la présence du vecteur dans la souche hôte ainsi que le gène codant pour la galactokinase. L'insertion des fragments d'ADN exogènes s'effectue au niveau d'un site multiple de clonage situé en aval du promoteur fort *trp*. Ce plasmide est amplifiable au chloramphénicol (Figure 6).

3 - MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURES.

3.1 - PREPARATION DES SUBSTRATS.

3.1.1 - Polygalacturonate (Sigma).

Il est préparé à 2,5% ou à 5% dans l'eau distillée, puis centrifugé à 26000 g pendant 30 mn à 20°C de façon à éliminer toutes les particules non dissoutes, le pH étant alors ajusté à 7,0 par la soude 0,2 N. La stérilisation s'effectue par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm.

3.1.2 - Pectine (Sigma).

La pectine est préparée à 2,5% dans l'eau distillée, centrifugée à 26000 g pendant 30 mn

à 20°C et stérilisée à pH acide par autoclavage à 105°C pendant 20 mn. Le pH est ajusté juste avant l'utilisation de la pectine par une solution de soude 0,2 N stérile.

3.2 - CULTURE D'*E. COLI*.

3.2.1 - Milieu LB (146).

Il s'agit d'un milieu riche, sa composition pour 1 litre est la suivante :

- Tryptone	10 g
- Extrait de levure	5 g
- NaCl	5 à 10 g

Après dissolution de ces composants, le pH est ajusté à 7,2 par la soude. Le milieu peut être préparé gélosé, on ajoute alors 15 g d'agar par litre.

Ce milieu a également été utilisé pour mettre en évidence des activités de dégradation des pectines pour les clones recombinants d'*E. coli*. Dans ce cas, on le complète par de la pectine ou du PGA à 0,5% en concentration finale. La révélation des activités s'effectuant par recouvrement des boîtes après culture, de bromure de cétyl triméthylammonium à 1%, d'acétate de cuivre en solution saturée à 10% ou de rouge de ruthénium à 0,05%.

3.2.2 - Milieu de Lennox (138).

C'est un milieu minimum synthétique constitué pour 1 litre de :

- NH ₄ Cl	5 g
- NH ₄ NO ₃	1 g
- Na ₂ SO ₄	2 g
- K ₂ HPO ₄	9 g
- KH ₂ PO ₄	3 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
- Source de carbone	0,5 à 1% (p/v)

Le pH est ajusté à 7,2 et le milieu est stérilisé à 105°C pendant 30 mn. Ce milieu peut être complété par certains acides aminés et vitamines selon les exigences trophiques de la souche utilisée (proline à 20 µg/ml, leucine à 20 µg/ml et vitamine B12 à 2 µg/ml pour la souche d'*E. coli* HB101). De plus, il peut être employé sous forme gélosée à 1,5%.

3.2.3 - Milieu YC gélosé (Yeast extract/Casamino acids) (124).

Utilisé pour la mise en évidence de souches d'*E. coli* produisant des enzymes pectinolytiques.

La composition de ce milieu pour 1 litre est la suivante :

- (NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
- Casamino acids	3 g
- Extrait de levure	2 g
- Polygalacturonate	5 g
- Agar	15 g

Le pH est ajusté à 7,0 par la soude.

3.2.4 - Milieu de polygalacturonate de magnésium.

Il s'agit d'un milieu de détection directe des activités dépolymérisantes du polygalacturonate, utilisé pour les phages. Il est composé de :

- Tryptone	10 g
- Extrait de levure	5 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 g
- Maltose	2 g
- Polygalacturonate	20 g
- Agar	4 g
qsp 1 litre	

Le pH est ajusté à 7,0 par la soude.

Nota : Tous ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 mn. Le polygalacturonate et le maltose sont quant à eux stérilisés par filtration et ajoutés dans les milieux après autoclavage.

3.2.5 - Gélose molle ou "top agar".

Utilisée comme support d'infection pour la multiplication des phages en milieu solide. La concentration en agar varie de 0,4 à 0,7% et constitue le facteur limitant pour la diffusion des phages dans cette gélose. Cette gélose molle est coulée sur une gélose nutritive de même composition que le milieu LB gélosé et servant de substrat de croissance pour *E. coli*.

La composition de la gélose molle pour 1 litre est la suivante :

- Tryptone 10 g
- Extrait de levure 5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) 2,2 g
- Maltose 2 g
- Agar 4 à 7 g

Le pH est ajusté à 7,0 par la soude et le maltose ainsi que le MgSO_4 sont ajoutés après autoclavage du milieu à 120°C/20 mn.

3.2.6 - Conditions de culture d'*E. coli*.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en aérobiose, à 30°C en milieu liquide et à 37°C sur milieu gélosé.

3.3 - CULTURE DE BACTEROIDES.

3.3.1 - Bouillon cerveau-coeur (BHI ou Brain Heart Infusion).

Il s'agit d'un milieu de culture riche qui est préparé de la manière suivante :

- 37 g de BHI prêt à l'emploi (Institut Pasteur Production) sont solubilisés dans 1 l d'eau distillée.

- On ajoute 0,5 ml d'une solution de résazurine à 1 mg/ml qui est le témoin de potentiel d'oxydoréduction du milieu.

- Le milieu est porté à ébullition durant 15 mn de manière à éliminer la plus grande partie de l'oxygène dissous.

- Il est alors refroidi sous azote jusqu'à 45°C, puis complété en hémine (10 ml à 0,5 mg/ml) et vitamine B₁₂ (0,1 ml à 0,1 mg/ml).

- Le milieu est alors refroidi sous atmosphère N₂/CO₂ (85/15, v/v) jusqu'à 35°C et réduit par la cystéine (0,5 g).

- Le pH est ajusté à 7,2 par le KHCO₃.

Le milieu est alors conditionné en flacons pénicilline sous atmosphère N₂/CO₂ et stérilisé par autoclavage à 120°C/20 mn. On ajoute 15 g d'agar par litre, dans le cas où le milieu est utilisé sous forme gélosée.

3.3.2 - Milieu de Caspari et Macy (32).

Il s'agit d'un milieu minimum synthétique se préparant de la même façon que le BHI et ayant la composition suivante pour 1 l :

- KH ₂ PO ₄	0,45 g
- K ₂ HPO ₄	0,45 g
- NaCl	0,9 g
- (NH ₄) ₂ SO ₄	0,9 g
- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025 g
- MgCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
- MnCl ₂ .4H ₂ O	0,01 g
- CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
- Résazurine	0,001 g
- Hémine	10 ml à 0,5 mg/ml
- Vitamine B ₁₂	0,1 ml à 0,1 mg/ml
- Cystéine	0,5 g
- KHCO ₃ pour ajuster le pH à 7,2	

Ce milieu est également conditionné en flacons pénicilline sous atmosphère N₂/CO₂, gélosé par 15 g d'agar par litre et stérilisé par autoclavage à 120°C/20 mn. La source de carbone est ajoutée après autoclavage du milieu à la concentration de 0,5%.

3.3.3 - Milieu YC gélosé adapté pour *Bacteroides*.

Utilisé comme contrôle pour la mise en évidence des activités de dépolymérisation du polygalacturonate, sa composition pour 1 l est la suivante :

- (NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
- Casamino acids	3 g
- Extrait de levure	2 g
- Polygalacturonate de sodium	5 g
- Résazurine	0,001 g
- Hémine	10 ml à 0,5 mg/ml
- Vitamine B ₁₂	0,1 ml à 0,1 mg/ml
- Cystéine	0,5 g
- KHCO ₃ pour ajuster le pH à 7,2	
- Agar	15 g

3.3.4 - Conditions de culture de *Bacteroides*.

Les souches ne peuvent se développer que dans un environnement anaérobie strict. Lorsqu'elles sont cultivées sur milieu gélosé, les ensemencements et les incubations se font en station anaérobie c'est-à-dire sous atmosphère $N_2/CO_2/H_2$ (75/15/10, v/v/v) ou en jarre anaérobie sous atmosphère de CO_2 et à 35°C. La présence d'un catalyseur au palladium dans la station permet d'éliminer les molécules d'oxygène en les combinant à l'hydrogène présent dans le mélange gazeux.

3.3 - ANTIBIOTIQUES INCORPORES DANS LES MILIEUX SELECTIFS.

Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

- Ampicilline, sel de sodium (Ap; Sigma).....50 à 100 $\mu g/ml$
- Chloramphénicol (Cm; Boehringer Mannheim).....100 $\mu g/ml$
- Streptomycine sulfate (Sm; Boehringer Mannheim).....50 $\mu g/ml$
- Tétracycline, HCl (Tc; Sigma).....20 à 30 $\mu g/ml$

Les solutions d'antibiotiques sont préparées sous forme concentrée (x 100) dans l'eau distillée à l'exception du chloramphénicol qui est préparé dans l'éthanol à 25%. Les solutions sont alors stérilisées par filtration sur membrane de porosité 0,2 μm .

4 - TECHNIQUES D'EXTRACTION D'ADN.

4.1 - EXTRACTION D'ADN TOTAL DE *BACTEROIDES*.

La méthode utilisée s'inspire de celle mise au point par Dhaese *et al.* (53) :

- 10 ml de culture bactérienne parvenue en phase stationnaire de croissance sont centrifugés pendant 10 mn à 6000 g.

- Le culot est resuspendu dans 3 ml de $T_{50} E_{20}$ pH 8,0 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM) et agité fortement pour avoir une suspension homogène.

- On ajoute ensuite 1 ml de sarkosyl à 5% (p/v) ainsi que 1 ml de pronase à 2,5 mg/ml, préparés dans le $T_{50} E_{20}$ pH 8,0 et on laisse incuber 60 mn au bain-marie à 37°C.

- Le lysat obtenu est rendu plus homogène par passage à travers une seringue sans aiguille.

- Ce lysat est alors déprotéinisé par 1 volume de phénol saturé en Tris-HCl 100 mM pH 8,0. L'émulsion réalisée est alors centrifugée 10 mn à 5000 g et on récupère la phase supérieure

aqueuse en prenant soin de ne pas prélever l'interphase.

- L'opération est renouvelée puis la phase aqueuse est extraite deux fois par un volume du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v).

- La solution est centrifugée 5 mn à 5000 g et la phase supérieure est récupérée.

- L'ADN présent dans cette phase est alors précipité par 3/7 de volume de NaCl 1 M et 2 volumes d'éthanol glacé à 95%.

- Après plusieurs heures de précipitation à -20°C, la solution contenant l'ADN est centrifugée à 10000 g pendant 30 mn, le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide.

- Ce culot est remis en solution dans 1,5 ml de T₅ E_{0,5} S₅ pH 8,0 (Tris 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 5 mM).

- Après vérification du pH, la solution est traitée à la RNase à la concentration de 50 µg/ml pendant 2 h au bain-marie à 37°C.

- La concentration en NaCl est ensuite ajustée à 300 mM, puis l'échantillon est mis en présence de protéinase K (50 µg/ml en concentration finale) durant 5 h à 37°C.

- Une nouvelle déprotéinisation est réalisée par un volume de mélange phénol/chloroforme, puis par deux fois par un volume de chloroforme/alcool isoamylique. La phase supérieure est alors récupérée et l'ADN précipité par deux volumes d'éthanol glacé à 95% pendant plusieurs heures.

- La solution est alors centrifugée à 10000 g pendant 30 mn, le culot obtenu est séché sous vide puis mis en solution dans un certain volume d'eau distillée. L'ADN obtenu est alors prêt à l'emploi.

4.2 - EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE.

4.2.1 - Méthode de Ish-Horowicz et Burke (110).

Cette méthode est employée pour l'extraction d'ADN plasmidique provenant d'*E. coli* et donne d'excellents rendements. Le protocole d'extraction est le suivant et se divise en deux parties :

* Préparation de l'ADN plasmidique.

- Une préculture de la souche portant le plasmide intéressant est réalisée la veille sur 10 ml de milieu LB contenant les antibiotiques de sélection de ce plasmide. La souche parvenue en fin de phase exponentielle de croissance est alors relancée dans un plus grand volume (200 ml ou plus).

- Il est possible dans certains cas d'effectuer une amplification du nombre de copies du plasmide par le chloramphénicol. Dans ce cas lorsque la densité optique de la culture, lue à 600 nm, est comprise entre 0,7 et 0,9, on ajoute du chloramphénicol à la concentration finale de 150 µg/ml. Le chloramphénicol va bloquer toutes les synthèses protéiques, tout en permettant au plasmide de continuer sa réplication. Cette étape d'amplification est facultative, puisque certains plasmides donnent d'excellents rendements d'extraction sans amplification (pUC18 ou 19) ou ne sont pas amplifiables par cette technique (pBR325).

- La culture est alors remise en agitation à 30°C pendant 16 h.

- Cette culture (correspondant à un volume de 200 ml) est centrifugée à 5000 g pendant 15 mn à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension et homogénéisé dans 9 ml de T₂₅ E₁₀ Glucose₅₀ pH 8,0.

- La suspension bactérienne est alors traitée au lysozyme (1 ml à 10 mg/ml pour 9 ml de suspension) pendant 10 mn à température ambiante.

- On ajoute alors 20 ml du mélange NaOH 0,2 N/SDS 1% (p/v) qui va réaliser la lyse alcaline, on homogénéise et on place le mélange dans la glace durant 5 mn.

- L'ADN de haut poids moléculaire ainsi que la plupart des protéines sont alors précipitées par ajout de 10 ml d'acétate de potassium 5 M pH 4,8 glacé. Le mélange est alors agité pendant 15 mn à 4°C, puis additionné de 2,5 ml d'eau distillée et centrifugé 10 mn à 6000 g et 4°C.

- Le surnageant obtenu après centrifugation est filtré sur fibre de verre afin d'éliminer tous les agrégats, l'ADN plasmidique est alors précipité par 0,6 volume d'isopropanol glacé et placé à -20°C pendant au moins 2 h.

- La solution contenant l'ADN plasmidique précipité est alors centrifugée à 10000 g pendant 30 mn à -5°C. Le culot obtenu est alors séché sous vide et repris dans 2,5 ml de T₁₀ E₁₀ pH 8,0. Le pH de la solution est ajusté à 7,0 par environ 100 µl de Tris base 2 M. L'ARN présent dans la solution d'ADN plasmidique est digéré par 100 µl de RNase préparée à 65 U/ml pendant 1 h à 37°C. (RNase préalablement chauffée à 100°C pendant 10 mn de façon à éliminer les éventuelles traces de DNase).

* Purification de l'ADN plasmidique.

La solution d'ADN plasmidique obtenue va pouvoir être purifiée par ultracentrifugation en gradient isopycnique de chlorure de césium à deux couches préformées (74).

- 4,2 g de CsCl sont ajoutés à la solution d'ADN plasmidique et dissous lentement par agitation douce, après complète dissolution du CsCl on ajoute 0,4 ml de solution de bromure d'éthidium à 2 mg/ml préparée dans le T₁₀ E₁₀ pH 8,0. Ce mélange est alors versé dans un tube d'ultracentrifugation en polyallomère de 13 ml (Beckman ou Kontron), puis le tube est complété à 11,5 ml par une solution de CsCl préparée dans le T₁₀ E₁₀ pH 8,0 et possédant un

indice de réfraction de 1,378 (mesuré à 25°C) correspondant à une masse volumique de 1,47 g/ml. On obtient alors un gradient préformé constitué de deux couches de CsCl de densités différentes.

- La préparation d'ADN est alors centrifugée durant 18 h à 50000 tours/mn et à 20°C dans un rotor du type 70.1 Ti, ce qui correspond à une accélération de 170000 g. Après la centrifugation, les tubes sont observés sous éclairage UV à 302 nm et on prélève à l'aide d'une seringue la bande inférieure correspondant à la forme superhélicoïdale de l'ADN.

- Le bromure d'éthidium lié à l'ADN doit alors être éliminé, ce qui nécessite plusieurs extractions (environ 5) par un volume d'isopropanol saturé en T₁₀ E₁₀ et CsCl à pH 8,0. Extractions réalisées par inversion, centrifugation brève des tubes et élimination de la phase supérieure enrichie en bromure d'éthidium.

- Les traces d'isopropanol présentes dans la phase aqueuse sont éliminées par un volume d'éther éthylique saturé en eau. Après complète disparition de l'éther, le chlorure de césium présent dans la phase aqueuse est dilué par 3 volumes d'eau et l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol à 95% glacé. Après 2 h au minimum à -20°C, les tubes sont centrifugés pendant 30 mn à 10000 g et le culot d'ADN obtenu est séché sous vide et repris dans un certain volume d'eau distillée.

4.2.2 - Extraction rapide d'ADN plasmidique selon la technique de Grosveld *et al.* (85).

L'extraction se réalise sur un faible volume de culture bactérienne et n'est pas suivie d'une ultracentrifugation. On obtient donc de faibles quantités d'ADN de pureté médiocre mais dans la plupart des cas suffisante pour en faire l'analyse.

- 10 ml de culture bactérienne sont centrifugés pendant 15 mn à 6000 g et à 4°C. Le culot obtenu est alors homogénéisé dans 0,4 ml de T₂₅ E₁₀ Glucose₅₀ pH 8,0.

- On ajoute ensuite 50 µl de lysozyme à 10 mg/ml préparé dans le T₂₅ E₁₀ Glucose₅₀ pH 8,0 et on incube à température ambiante durant 10 mn.

- La lyse alcaline est alors réalisée en ajoutant 0,8 ml de NaOH 0,2 N/SDS 1% (p/v) et en agitant les tubes dans la glace pendant 10 mn.

- L'ADN de haut poids moléculaire ainsi que la plupart des protéines sont précipitées par 0,4 ml d'acétate de potassium 5 M pH 4,8. La solution est homogénéisée par retournement du tube durant 10 mn dans la glace, puis centrifugée pendant 10 mn à 10000 g et à 4°C.

- Le surnageant obtenu est alors déprotéinisé par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) saturé en T₂₅ E₁₀ Glucose₅₀ pH 8,0. On réalise une émulsion par retournements successifs du tube pendant 10 mn, puis les deux phases sont séparées par centrifugation à 10000 g pendant 5 mn et à température ambiante. La phase

aqueuse supérieure est alors prélevée délicatement et traitée deux fois par un volume de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1).

- Après avoir ajusté la salinité de cette phase aqueuse par 3/7 de volume de NaCl 1 M, l'ADN plasmidique est précipité par deux volumes d'éthanol à 95% glacé et placé à -20°C pendant 2 h minimum. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation à 10000 g pendant 30 mn et à 0°C, est séché sous vide, remis en solution dans un certain volume d'eau distillée stérile et traité à la RNase (2 μ l à 1 mg/ml pour 100 μ l d'échantillon) pendant 1 h à 37°C. La solution d'ADN obtenue peut alors être utilisée.

5 - METHODES ELECTROPHORETIQUES.

Les électrophorèses permettant de caractériser et d'analyser l'ADN extrait des souches intéressantes sont réalisées en gel d'agarose et sont essentiellement de deux types :

5.1 - ELECTROPHORESE HORIZONTALE.

Cette technique permet de contrôler la pureté du matériel extrait, d'estimer les concentrations en ADN par rapport à un témoin de concentration connu (ADN lambda) et de déterminer la taille de fragments d'ADN provenant d'une digestion par une ou des enzymes de restriction, par rapport à des témoins de poids moléculaire connu (ADN lambda digéré par *Hind*III et/ou *Eco*RI et ADN ϕ X174 digéré par *Hae*III).

Le gel d'agarose est préparé dans le tampon Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM, acide orthoborique 89 mM pH 8,3 (Tampon TBE) à des concentrations variant entre 0,6 et 1,4%. La solution d'agarose est portée à ébullition puis refroidi aux alentours de 60°C avant d'être versée dans un support muni d'un peigne de 8, 10 ou 15 dents. Après gélification, le peigne est retiré, laissant place aux alvéoles ou "slots" au niveau desquels seront effectués les dépôts. Le gel est alors placé dans la cuve à électrophorèse et immergé dans le tampon TBE.

Le dépôt des échantillons d'ADN à analyser s'effectue en immersion, ce qui implique que la solution d'ADN soit plus dense que le tampon d'électrophorèse. On prendra donc soin d'ajouter à l'échantillon, 1/3 v de tampon d'arrêt pH 7,0 constitué de saccharose 50% (p/v), EDTA 50 mM, urée 4 M et bleu de bromophénol 0,1%.

Après avoir déposé les échantillons dans les alvéoles, on expose le gel à une différence de potentiel comprise entre 80 et 120 volts, l'ADN étant chargé négativement va migrer vers l'anode tout comme le bleu de bromophénol qui constituera le témoin de migration.

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est coloré dans un bain de bromure d'éthidium (0,25 ml de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dans 500 ml d'eau distillée) pendant 30 mn à l'obscurité. Le temps de coloration dépendant de l'épaisseur et de la concentration en agarose du gel. Le gel est ensuite décoloré dans l'eau distillée pendant un certain temps (30 mn à 4 h), ce qui permet d'éliminer le bruit de fond et d'obtenir des bandes bien contrastées.

Le gel est alors déposé sur un transilluminateur qui permet de visualiser les bandes d'ADN sous un éclairage UV à 302 nm.



5.2 - ELECTROPHORESE VERTICALE.

Ce type d'électrophorèse permet de réaliser des lyses directes c'est-à-dire d'analyser le contenu plasmidique de souches d'*E. coli*. Dans cette technique mise au point par Eckhardt (58) et modifiée par Pühler *et al.* (187), les bactéries sont soumises à l'action du lysozyme directement dans les alvéoles d'un gel d'agarose, puis à celle du SDS (Sodium dodecylsulphate) sous une tension de 20 volts. L'ADN libéré entre alors dans le gel après application d'un voltage plus élevé (130 Volts).

L'électrophorèse se réalise dans un gel d'agarose à 0,8% préparé dans le tampon TBE pH 8,3. Le gel (à 60°C) est coulé entre deux plaques de verre dépoli, séparées par des espaceurs de 1,5 mm. Les alvéoles sont réalisées grâce à un peigne en Téflon à 15 ou 20 dents, que l'on introduit lorsque le gel est encore en surfusion.

Entre temps, on prépare l'échantillon de la manière suivante : on ajoute un volume de $T_{50} E_{20}$ pH 8,0 à l'équivalent de 0,5 ml de culture bactérienne parvenue à D.O : 0,3 (lue à 600 nm). Après agitation, les bactéries sont centrifugées pendant 5 mn à 6000 g et à 4°C. Le culot est placé dans la glace et resuspendu dans 60 μ l de tampon de lyse constitué de TBE contenant 25% de saccharose, 12% de Ficoll 400, 5 U/ml de RNaseA et 1 mg/ml de lysozyme, puis le mélange est déposé dans une alvéole du gel. Lorsque tous les échantillons ont été déposés, ils sont recouverts de 90 μ l de TBE gélosé contenant 1% de SDS, 0,05% de bleu de bromophénol et 0,4% d'agarose. Les espaces vides restant au niveau des alvéoles sont finalement comblés par la solution d'agarose résiduelle.

Les plaques de verre sont alors transférées dans une cuve à électrophorèse verticale. La migration s'effectue en deux temps :

- Une première période de 1 h 15 mn à 20 volts qui permet au SDS de migrer et de lyser les bactéries.

- Une deuxième période de 2 h 30 mn à 130 volts dans laquelle l'ADN libéré va pouvoir migrer.

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel d'agarose est coloré et décoloré comme précédemment (§ 5.1).

5.3 - ELECTROELUTION.

C'est une technique d'électrophorèse qui permet d'isoler des fragments d'ADN de taille déterminée et qui est utilisée pour la préparation de banques d'ADN ou pour le sous-clonage. En voici le protocole :

On dépose 30 à 45 μ l de solution d'ADN digéré contenant 1/3 de volume de tampon d'arrêt. Le premier puits est constitué d'un témoin de poids moléculaire (ADN de lambda digéré par *EcoRI* et/ou *HindIII*), qui permettra de localiser avec précision la ou les bandes d'ADN intéressantes. Les autres puits étant utilisés pour la séparation des fragments d'ADN des échantillons. La migration de l'ADN dure 4 h 30 mn à 110 volts (témoin de migration à 8,0 cm des puits), le gel est alors découpé au niveau des deux premières alvéoles sur une longueur de 8,0 cm et coloré. Une fois la bande intéressante localisée, on réalise une gouttière de 3 à 4 mm de large sur 5 à 6 cm de long, en aval du fragment recherché, dans laquelle on introduit du TBE. On rétablit alors la tension à 100 volts durant 3 mn, puis on récupère le tampon et on remplit de nouveau la gouttière avec du TBE et on rétablit la tension... et ainsi de suite durant 5 à 6 h pour récupérer un ensemble de fragments et durant 1 ou 2 h pour récupérer une bande. Après avoir ajouté 3/7 de volume de NaCl 1 M à la solution de TBE contenant l'ADN piégé, ce dernier est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol à 95% glacé. On laisse précipiter l'ADN pendant 2 h au minimum à -20°C, puis la solution est centrifugée à 10000 g pendant 30 mn et à 0°C. Le culot obtenu est resuspendu dans un volume réduit d'eau distillée stérile et les fractions correspondant à différents temps de prélèvement sont soumises à une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%, de façon à déterminer la taille des fragments récupérés et le rendement d'extraction.

6 - TECHNIQUES DE TRANSFERT D'ADN.

6.1 - TRANSFORMATION.

Elle permet l'introduction d'ADN dans des bactéries rendues compétentes par traitements thermique et au chlorure de calcium. La transformation s'effectue sur différentes souches d'*E. coli* selon la méthode décrite par Cohen *et al.* (37) et modifiée par Dillon *et al.* (55). Les transformants sont mis en évidence sur milieu sélectif gélosé. Le protocole utilisé pour *E. coli* est le suivant :

La souche d'*E. coli* à transformer est remise en culture la veille. Cette préculture (1 ml) est relancée dans 100 ml de milieu LB et mise en agitation à 30°C jusqu'à obtention d'une D.O de 0,6 (lue à 600 nm). La culture est alors placée dans la glace pendant 15 mn, puis centrifugée à 7000 g durant 10 mn à 4°C. Le culot obtenu est alors remis doucement en suspension dans 50 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé, opération réalisée pendant 30 mn dans la glace. La suspension est de nouveau centrifugée à 7000 g pendant 5 mn et à 4°C et le culot obtenu est resuspendu dans 5 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé. La suspension obtenue est alors transférée dans un tube 16/160 en verre et placée 3 h à 4°C.

Les bactéries sont alors mises en contact avec l'ADN transformant dans le rapport 1 volume de solution d'ADN pour 2 volumes de cellules. Ce contact dure 30 mn à 4°C puis les bactéries subissent un choc thermique à 42°C pendant 2 mn suivi d'une incubation de 10 mn à 4°C. La suspension bactérienne est alors diluée au 1/10 par du milieu LB préchauffé à 37°C et incubée à 37°C pendant 2 h sans agitation. Cette culture est alors étalée sur milieu sélectif gélosé à raison de 100 µl par boîte de Pétri et incubée à 37°C pendant 24 h.

6.2 - TRANSDUCTION.

Il s'agit d'une technique permettant l'introduction de plasmides recombinants de grande taille (30 à 40 kb) par l'intermédiaire d'un phage. Les vecteurs utilisés à cette fin sont des cosmides qui possèdent les extrémités cohésives Cos du bactériophage lambda qui constituent un signal d'encapsidation permettant l'encapsidation du cosmide dans la tête d'un phage. L'empaquetage *in vitro* sélectionnera des cosmides recombinants de grande taille (jusqu'à 45 kb). Le kit d'empaquetage se compose d'un extrait ultrasoniqué contenant les pré-têtes de phages et provenant de la souche d'*E. coli* BHB2690:N205 *recA* (Lambda,*imm434, clts b2, red3, dam15, sam7*)/lambda et d'un extrait complémentaire contenant les produits des gènes *D* ou *A* ainsi que les queues de phages et provenant de la souche d'*E. coli* BHB2688:N205 *recA* (Lambda,*imm434, clts b2, red3, dam4, sam7*)/lambda. Le cosmide utilisé est le pHCT9 qui dérive du pBR322.

Le protocole utilisé est le suivant :

L'ADN exogène ligaturé au vecteur est concentré, repris dans un volume réduit d'eau distillée (0,1 à 0,5 µg d'ADN dans un volume de 2 à 3 µl) et soumis à l'empaquetage de la façon suivante : 25 µl du mélange d'empaquetage + 6 µl d'ADN ligaturé à homogénéiser doucement. Le mélange est incubé 1 h à température ambiante, puis dilué au 1/40 par le tampon Tris 10 mM MgSO₄ 10 mM Gélatine 0,01% pH 7,4. 0,1 ml de particules phagiques contenant l'ADN recombinant empaqueté est mélangé à 1 ml de culture d'*E. coli* parvenue en phase stationnaire de croissance (D.O:1,2 lue à 600 nm). On incube le mélange 45 mn à 37°C, puis la culture est centrifugée à 6000 g pendant 15 mn et le culot est repris par 1,4 ml de milieu LB. La

suspension obtenue après agitation douce est incubée 45 mn à 37°C, puis étalée sur milieu sélectif gélosé à raison de 0,1 ml par boîte de Pétri.

6.3 - TRANSFECTION.

Le vecteur phagique utilisé pour la transfection est le lambda EMBL3 dont les caractéristiques sont présentées dans le § 2.1.3. Ici, tout comme pour les cosmides, on a recours à la technique d'empaquetage *in vitro* de l'ADN recombinant. Le principe de cet empaquetage *in vitro*, est de mélanger l'ADN recombinant avec des concentrations élevées de précurseurs de têtes phagiques, de queues de phages, de protéines d'empaquetage et de protéines d'assemblage. Les extraits d'empaquetage sont préparés à partir de souches d'*E. coli* lysogènes vis-à-vis de certains mutants dérivant du phage lambda. Ces extraits contiennent toutes les protéines structurales nécessaires pour l'assemblage de l'ADN lambda dans une particule phagique infectieuse et sont commercialisés sous forme de kits.

Le protocole utilisé pour réaliser la banque génomique à l'aide du vecteur phagique est le suivant :

On mélange 50 µl d'extrait d'empaquetage à 6 µl de ligature (vecteur lambda EMBL3 digéré par *EcoRI* et *BamHI*, déphosphorylé et ligaturé à des fragments d'ADN provenant de la digestion partielle par *Sau3AI* de l'ADN génomique de la souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* 217). Ce mélange est incubé pendant 2 h à 20°C, puis dilué au 1/10 par 0,5 ml de tampon phage (Tris-HCl 20 mM, MgSO₄ 10 mM et NaCl 100 mM pH 7,4). On y ajoute 25 µl de chloroforme qu'on mélange, on centrifuge à 7000 g pendant 10 mn à 20°C et on effectue une série de dilutions au 1/10 par le tampon phage sur un prélèvement de 50 µl. On mélange alors 0,1 ml de solution phagique provenant des différentes dilutions à 0,1 ml de culture bactérienne parvenue à D.O:0,6 (lue à 600 nm). Le mélange phages/bactéries est incubé 30 mn à 37°C au bain-marie sans agitation, puis est transféré dans un tube à hémolyse contenant 3 ml de gélose molle à 47°C, agité brièvement et coulé sur gélose nutritive. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées en position retournée à 37°C pendant 16 h.

7 - TECHNIQUE D'HYBRIDATION ADN/ADN SELON LA METHODE DE SOUTHERN (237).

7.1 - PRINCIPE.

L'ADN à analyser est dans un premier temps digéré par une enzyme de restriction, les

fragments obtenus sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'agarose puis transférés par "effet buvard" (blotting) sur membrane de nitrocellulose ou nylon. L'ADN transféré sur membrane est alors mis en contact avec la sonde d'ADN marquée radioactivement dans des conditions rendant l'hybridation possible. La sonde marquée forme alors avec les séquences complémentaires d'ADN des hybrides stables qui ne sont pas détruits par les lavages à "stringence" élevée (haute température et faible salinité), qui permettent d'éliminer le bruit de fond dû aux hybridations non spécifiques, de sorte que seuls les fragments d'ADN qui s'hybrident à la sonde restent marqués par radioactivité. L'autoradiographie de la membrane donne alors les profils spécifiques des bandes correspondant aux fragments de restriction qui sont complémentaires de la sonde d'ADN.

7.2 - TRANSFERT DE L'ADN SUR MEMBRANE D'HYBRIDATION.

L'ADN digéré est soumis à une électrophorèse à 100 volts sur gel d'agarose à 0,8 % pendant environ 7 h (témoin de migration à 9 cm des puits). On dépose l'équivalent de 3 μ g d'ADN génomique digéré totalement par une enzyme de restriction et 0,2 μ g pour le témoin positif digéré par la même enzyme (Lambda EMBL3 recombinant). Après la migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium, décoloré puis photographié.

Les fragments d'ADN sont alors dépurinés par traitement du gel 2 fois 15 mn par une solution d'HCl 0,25 N, le gel est ensuite rincé à l'eau déminéralisée (eau milli-Q stérile) puis l'ADN est dénaturé par 2 traitements de 15 mn par une solution de NaOH 0,4 N /NaCl 0,6 N. Le gel est de nouveau rincé à l'eau, neutralisé par 2 traitements de 30 mn dans une solution de Tris 0,5 M /NaCl 1,5 M pH 7,4 et enfin rincé à l'eau.

Pendant ce temps, une membrane Gene Screen *Plus* (NEN Research Products, Dupont de Nemours) est découpée aux dimensions du gel et immergée pendant 30 mn dans l'eau déminéralisée. La membrane est ensuite rincée pendant 30 mn dans le tampon 20 SSC (NaCl 3 M, Citrate trisodique 0,3 M pH 7,0). L'ADN peut alors être transféré sur membrane; pour le transfert, on utilise le montage suivant :

- 2 feuilles de papier Whatman 3MM dont les extrémités plongent dans deux bacs remplis de tampon 20 SSC sont installées sur une plaque de verre horizontale;
- le gel est alors déposé au centre des deux feuilles et est recouvert par la membrane d'hybridation (face concave de la membrane en contact avec le gel);
- la membrane est recouverte progressivement par 5 feuilles de papier Whatman 3MM découpées aux dimensions du gel puis par un empilement de papier absorbant de 10 cm de hauteur;
- la pile de papier absorbant est tassée par un poids d'environ 0,5 kg posé sur une plaque de verre.

L'ADN est transféré du gel vers la membrane par l'intermédiaire du tampon 20 SSC qui monte par capillarité. Le transfert dure 20 h, ensuite la membrane est rincée soigneusement à l'eau déminéralisée de façon à éliminer les débris d'agarose. La membrane est alors séchée durant 30 mn à température ambiante. L'efficacité du transfert est déterminée après coloration du gel et observation sous UV (302 nm).

7.3 - HYBRIDATION A L'AIDE DE LA SONDE RADIOMARQUEE.

7.3.1 - Préhybridation.

La membrane est mise en préhybridation à 65°C pendant 6 à 24 h dans le tampon suivant :

- 1 mg d'ADN non homologue* (ADN de sperme de saumon) est solubilisé dans une solution contenant 250 µl de SDS 10% (p/v) et 20 µl d'EDTA 0,25 M pH 8,0;
- on ajoute de l'eau déminéralisée stérile pour qsp 3750 µl;
- le mélange est porté à ébullition pendant 5 mn puis refroidi brusquement à 75°C;
- on ajoute alors 250 µl de 20 Denhardt (SAB 0,4% (p/v), Ficoll 400 0,4% (p/v), Polyvinylpyrrolidone 0,4% (p/v)), ainsi que 1,5 ml de 20 SSC;
- le mélange est placé 30 s dans la glace puis quelques minutes au bain-marie à 37°C pour redissoudre le SDS;
- la membrane est à ce moment-là placée dans un sac d'hybridation (BRL) en présence du tampon de préhybridation, les bulles d'air sont éliminées et le sac est alors soudé et incubé au bain-marie à 65°C pendant 6 à 24 h.

* L'ADN non homologue est préparé de la façon suivante :

10 mg d'ADN de sperme de saumon sont mis en solution dans 1 ml d'eau déminéralisée, homogénéisés longuement, puis placés au bain-marie à 60°C pendant 30 mn. La solution d'ADN qui a la consistance d'un gel est alors passée plusieurs fois à travers une aiguille de seringue, puis portée à ébullition pendant 10 mn. La solution est stockée à -20°C.

7.3.2 - Préparation de la sonde radiomarquée.

Pendant la préhybridation, la sonde marquée est préparée de la manière suivante :

- 1 µg d'ADN à marquer (4 µl) est mélangé à 5 µl de tampon T₁₀ E_{0,1} S₁₂₀ pH 7,5 (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM et NaCl 120 mM);
- on ajoute alors 5 µl du mélange dCTP, dGTP, dTTP (20 mM de chaque) et qsp 45 µl par l'eau déminéralisée;

- on ajoute enfin 5 μ l de ^{35}S dATP (activité de 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) puis 5 μ l du mélange DNA-polymérase I (0,4 U/ μl)/DNase I (40 pg/ μl).

Le tout est incubé pendant 3 h à 15°C puis la réaction est stoppée par ajout de 5 μ l de solution d'arrêt (Na_2EDTA 0,3 M pH 8,0) et de 400 μ l de tampon "low salt" (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,2M pH 7,4).

Les oligonucléotides non incorporés sont alors éliminés par passage du mélange réactionnel sur colonne d'Elutip (Schleicher et Schüll). La colonne est préalablement activée par passage de 5 ml de tampon "high salt" (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M pH 7,4), puis rincée par 5 ml de tampon "low salt". Les 450 μ l de sonde sont alors passés sur colonne, la colonne est rincée par 10 ml de tampon "low salt" afin d'éliminer les oligonucléotides non incorporés et enfin la sonde est éluée par 400 μ l de tampon "high salt".

L'activité de la sonde est estimée sur 1 μ l d'échantillon en ajoutant 1 ml d'ADN non homologue à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ADN de sperme de hareng) et 1,1 ml d'ATCA à 20% (p/v). Le mélange est incubé pendant 1 h dans la glace et filtré sur disque Whatman GF/C en fibre de verre. Le filtre est alors rincé à l'ATCA à 5% (p/v), puis à l'éthanol à 95° et enfin à l'éther éthylique avant d'être séché 5 mn sous infra-rouge. Le filtre est alors placé dans un pot à scintillation Beckman dans lequel on ajoute 0,4 ml de KOH 0,01 N de façon à détacher l'ADN du filtre. Après 30 mn de contact, on ajoute 20 ml de liquide scintillant Beckman "ready gel" (pseudocumène/xylène) puis la radioactivité est évaluée au compteur à scintillation.

7.3.3 - Hybridation proprement dite.

Le tampon d'hybridation a la composition suivante :

- A 1 mg d'ADN non homologue (ADN de sperme de saumon) soit 0,1 ml d'ADN à 10 mg/ml, on ajoute la sonde marquée (environ $4,5 \times 10^6$ cpm au total) et le mélange est porté à ébullition à 100°C pendant 10 mn puis refroidi brutalement dans la glace pendant 10 mn;

- on ajoute alors de l'eau déminéralisée pour qsp 3480 μ l, puis 250 μ l de SDS 10% , 20 μ l d'EDTA 0,25 M pH 8,0, 250 μ l de 20 Denhardt et enfin 1,5 ml de 20 SSC.

Le tampon de préhybridation est alors remplacé par le tampon d'hybridation et la membrane est incubée pendant 36 h à 65°C.

Après l'hybridation la membrane subit plusieurs lavages :

- 2 lavages de 5 mn à 20°C par le tampon 2 SSC (NaCl 0,3 M, Citrate trisodique 0,03 M) + SDS 0,1% (p/v);

- 4 lavages de 15 mn à 65°C dans le tampon 2 SSC;

- 2 lavages de 30 mn à 48°C dans le tampon 0,2 SSC (NaCl 0,03 M, Citrate trisodique 0,003 M) + SDS 0,1% (p/v);

- un rinçage à l'eau déminéralisée de 5 mn.

La membrane est alors séchée à température ambiante pendant environ 40 mn.

La révélation des bandes d'hybridation s'effectue à l'obscurité totale en plaçant la membrane au contact d'un film photographique à 15°C pendant une durée variable dépendant de l'activité de la sonde, de la quantité d'ADN transférée sur membrane et du type de marqueur utilisé. A titre indicatif, avec le ^{35}S et pour une activité de 10^4 cpm/ μl de sonde ($4,5 \times 10^6$ cpm au total), un temps d'exposition de 3 jours a été suffisant pour observer les bandes.

Le film photographique est révélé à l'obscurité en le plongeant :

- 5 mn dans une solution de révélateur;
- 30 s dans un bain d'arrêt (eau distillée);
- 3 mn dans une solution de fixateur; le film est alors rincé abondamment à l'eau distillé pendant 30 mn, puis séché à l'air libre.

8 - TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DU BACTERIOPHAGE LAMBDA EMBL3.

8.1 - PREPARATION D'UN STOCK DE PHAGES.

8.1.1 - Lyse sur milieu solide (213).

Il s'agit d'une technique permettant de purifier (par isolement), d'amplifier et de titrer les phages et qui précède la lyse en milieu liquide. Ici, on procède à la lyse d'un tapis bactérien par les bactériophages, le critère de lyse étant l'apparition de zones claires se détachant sur fond opaque qu'on appelle plages de lyse ou plaques de lyse. Une plage de lyse correspond théoriquement à l'infection d'une bactérie par un bactériophage ayant suivi un cycle d'infection lytique.

* Protocole à suivre :

On réalise une préculture de la souche d'*E. coli* à infecter (*E. coli* HB101), cette souche est relancée jusqu'à obtention d'une D.O comprise entre 0,4 et 0,6 (lue à 600 nm). Une fois cette D.O atteinte, la culture est incubée à 37°C sans agitation pendant 30 mn. Les bactéries sont alors mises en contact avec les phages (0,1 ml de culture + 0,1 ml de phages à différentes dilutions) pendant 30 à 45 mn sans agitation et à 37°C. Le mélange phages/bactéries est alors transféré dans un tube à hémolyse contenant 3 ml de gélose molle à 47°C, homogénéisé et coulé sur gélose nutritive. Après solidification de la gélose molle, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C en position retournée pendant 16 h.

Les boîtes présentant des plages de lyse à confluence sont recouvertes par 5 ml de tampon phage (T₂₀ Mg₁₀ S₁₀₀ pH 7,4) et agitées doucement à l'aide d'un agitateur planétaire pendant 5 h à température ambiante, ce qui permet de remettre progressivement les phages en solution. La solution obtenue est alors centrifugée à 10000 g pendant 30 mn et à 4°C, ce qui permet d'éliminer les débris bactériens, puis stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm. Le stock de phages obtenu peut être conservé à 4°C, on prendra soin de rajouter une goutte de chloroforme par tube ou à -20°C sous forme glycérolée à 20%.

8.1.2 - Lyse en milieu liquide (134).

Il s'agit d'une étape permettant d'obtenir un stock de phage concentré en vue d'une extraction d'ADN phagique. La manipulation est très délicate car il est nécessaire de déterminer la bonne multiplicité d'infection (rapport phages/bactéries) de façon à obtenir une lyse optimale.

En conséquence, on réalise une série de dilutions au 1/10 du stock initial de phages et on incube 2 ml du stock dilué par le tampon phage avec 8 ml d'une culture d'*E. coli* HB101 parvenue à D.O:0,4 et incubée pendant 30 mn sans agitation. Le mélange phages/bactéries est incubé durant 30 mn à 37°C sans agitation (temps nécessaire à l'adsorption du phage sur la bactérie), puis est incubé à 30°C pendant plusieurs heures sous agitation forte. L'efficacité de la lyse est évaluée en fonction de la clarification de la culture et par dosage de l'activité clonée libérée lors de la lyse des bactéries.

Lorsque le bon rapport phages/bactéries est déterminé, on procède à la lyse de 500 ml de culture bactérienne.

8.2 - EXTRACTION D'ADN PHAGIQUE.

Elle s'effectue selon la méthode décrite par Yamamoto *et al.*(281), et a été utilisée pour l'extraction du vecteur phagique recombinant lambda EMBL3.

- Les cultures de bactéries lysées sont traitées à la RNase (2 µg/ml) et à la DNase (1 µg/ml) préparées dans le T₁₀ Mg₁₀ pH 7,5 pendant 30 mn à 20°C après avoir ajouté du MgSO₄ en concentration finale à 10 mM (2 ml de MgSO₄ 1 M pour 200 ml de culture).

- On ajoute alors du NaCl en poudre 1 M en concentration finale (29,2 g/500 ml de culture), qu'on dissout par agitation douce et on incube 1 h dans la glace. L'addition de NaCl facilite la dissociation des particules phagiques des débris bactériens et est requise pour avoir une précipitation optimale des particules phagiques par le polyéthylène-glycol (PEG).

- Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation à 11000 g pendant 10 mn à 4°C.
- On ajoute du PEG 6000 en poudre à une concentration finale de 10% (p/v) dans le surnageant de lyse. Ce PEG est dissous très lentement à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique. Lorsque tout le PEG est dissous, on laisse reposer la solution au minimum 1 h dans la glace sans agitation pour permettre aux particules phagiques de précipiter.
- Les bactériophages sont récupérés par centrifugation à 11000 g pendant 20 mn et à 4°C, le culot est séché et les bactériophages sont repris dans un certain volume de tampon phage (8 ml de tampon pour 500 ml de culture).
- Le PEG, de même que les débris cellulaires sont extraits par un volume de chloroforme par agitation forte (vortex) pendant 30 secondes. Les deux phases sont séparées par centrifugation à 3000 g pendant 15 mn et à 4°C et la phase aqueuse supérieure contenant les particules phagiques est récupérée.
- On mesure le volume de la phase aqueuse et on y ajoute 0,5 g de CsCl par ml de suspension phagique. On mélange le tout jusqu'à complète dissolution du CsCl.
- La solution obtenue est alors délicatement déposée sur un gradient préformé de CsCl composé de trois couches de CsCl de densités différentes, respectivement 1,7 g/ml, 1,5 g/ml et 1,45 g/ml de bas en haut. On inscrit un repère au niveau de l'interphase 1,5/1,45 qui correspond à la zone d'équilibre de densité des particules phagiques. Les solutions de CsCl de densité différentes sont préparées dans le tampon phage de la manière suivante :

Densité (g/ml)	CsCl (g)	Tp phage (ml)	Indice de réfraction
1,45	60	85	1,3768
1,50	67	82	1,3815
1,70	95	75	1,3990

- Les tubes sont centrifugés pendant 2 h 30 mn à 4°C et à 32500 tr/mn dans un rotor du type Beckman SW50.1.
- Les particules phagiques sont alors concentrées sous forme d'une bande opaque située à l'interphase 1,45/1,5 et sont récupérées par ponction à l'aide d'une seringue.
- Le CsCl présent dans la préparation de phage est éliminé par dialyse pendant 3 h et sous agitation contre le T₅₀ Mg₁₀ S₁₀ pH 8,0, opération réalisée à température ambiante.
- Après la dialyse, on ajoute de l'EDTA 0,5 M pour obtenir une concentration finale de 20 mM, puis de la protéinase K à 50 µg/ml en concentration finale et enfin du SDS 5% préparé dans l'eau distillée pour obtenir 0,5% en concentration finale. Le tout est mélangé par de multiples inversions du tube et incubé pendant 4 h à 37°C.

- La déprotéinisation s'effectue par ajout d'un volume de phénol saturé en T₅₀-HCl pH 8,0 en réalisant une émulsion. Les deux phases sont séparées par centrifugation à 3000 g pendant 5 mn et à 20°C.

- La phase aqueuse est alors traitée une fois par un volume du mélange phénol/chloroforme (50/50, v/v) saturé en T₅₀-HCl pH 8,0 et une fois par un volume de chloroforme.

- La salinité de la solution d'ADN phagique est alors ajustée par 3/7 de volume de NaCl 1 M et est précipitée par deux volumes d'éthanol glacé. Après quelques heures de précipitation à -20°C, l'ADN phagique est récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 30 mn, le culot obtenu est séché sous vide et repris dans un volume approprié d'eau distillée stérile. L'ADN phagique est alors prêt à l'emploi.

9 - ENZYMES UTILISEES POUR L'ANALYSE ET LA PREPARATION DE L'ADN.

9.1 - ENZYMES DE RESTRICTION.

Il s'agit d'endonucléases reconnaissant une séquence particulière de 4 ou 6 paires de nucléotides ou davantage dans l'ADN. Les digestions s'opèrent dans un volume de tampon permettant à l'enzyme d'avoir une activité optimale. Lorsqu'on veut obtenir des digestions partielles, pour la mise en place d'une banque d'ADN par exemple, on modifie le temps de digestion et/ou la concentration en enzyme.

9.2 - LIGATURE.

Réalisée en présence d'ADN ligase de phage T₄, qui permet de lier les molécules d'ADN coupées par les enzymes de restriction et d'obtenir des molécules d'ADN recombinantes. La ligase est utilisée à 15°C, à raison de une unité par µg d'ADN, conformément aux indications de King *et al.* (127).

9.3 - DEPHOSPHORYLATION.

Cette technique permet d'empêcher la recircularisation du vecteur après sa digestion par une enzyme de restriction. Après digestion, l'ADN plasmidique (1 µg) est précipité puis resuspendu dans 0,1 ml de T₅₀ E_{0,1} pH 8,0. La solution d'ADN est alors incubée pendant 4 h à

37°C en présence d'une unité de phosphatase alcaline. La réaction enzymatique est ensuite bloquée par 10 µl d'EGTA 50 mM pH 8,0 et par chauffage à 65°C pendant 10 mn. L'ADN déphosphorylé est alors déprotéinisé par un volume de phénol/chloroforme (1/1, v/v) saturé en T₅₀-HCl pH 8,0, et par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v). La solution d'ADN est ajustée par 3/7 de volume de NaCl 1 M avant d'être précipitée par 2 volumes d'éthanol glacé.

10 - EXTRACTION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES.

10.1 - *CHEZ BACTEROIDES.*

10.1.1 - Presse de French.

* Préparation des cellules.

La souche de *Bacteroides* pectinolytique est remise en culture en milieu liquide riche (BHI), puis en milieu minimum glucosé à 1% (CM) et enfin en milieu minimum contenant du polygalacturonate ou de la pectine comme seules source de carbone, en concentrations finales à 0,5%. La souche est alors cultivée en grands volumes (2 fois 200 ml) jusqu'en phase stationnaire. Les cultures sont centrifugées à 8000 g pendant 20 mn et à 4°C. Le surnageant de culture est récupéré pour des mesures d'activités ultérieures, le culot obtenu étant resuspendu dans un volume réduit de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 (10 ml de tampon pour un volume de culture de 200 ml) et homogénéisé au mixeur.

* Lyse des cellules.

Les bactéries sont alors lysées par deux passages en presse de French à $7,6 \times 10^6$ Pa. Les débris cellulaires et les bactéries non lysées sont éliminées par centrifugation à 13000 g pendant 15 mn et à 4°C. Le surnageant correspondant à l'extrait brut cellulaire est alors centrifugé à 200000 g pendant 2 h 30 mn et à 4°C de façon à séparer la fraction membranaire (culot), de la fraction cyto-périplasmique (surnageant). Le culot est repris dans 5 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 et homogénéisé au mixeur. Les différentes fractions sont réparties à raison de 0,5 à 1 ml en tubes Eppendorf et conservées à -20°C.

10.2 - CHEZ *ESCHERICHIA COLI*.

10.2.1 - Presse de French.

Le protocole suivi est identique à celui utilisé pour *Bacteroides* (voir § 10.1.1).

10.2.2 - Sphéroplastes.

Cette technique permet de séparer les activités enzymatiques liées aux membranes externes et à l'espace périplasmique de celles présentes au niveau du cytoplasme et des membranes internes. Il s'agit donc d'une technique complémentaire de la presse de French et qui permet de préciser la localisation des activités enzymatiques.

Cette technique se déroule en trois étapes : (1) destruction de la membrane externe par l'EDTA et de la paroi par le lysozyme en milieu hypertonique de façon à éviter que les sphéroplastes n'éclatent; (2) centrifugation et récupération du surnageant qui correspond à la fraction I (membranes externes et espace périplasmique) et (3) lyse des sphéroplastes par choc osmotique (remise en suspension du culot dans un tampon hypotonique).

Le protocole suivi d'après la technique décrite par Neu *et al.* (171,172) est le suivant :

10 ml d'une culture d'*E. coli* parvenue en phase stationnaire est centrifugée à 4000 g pendant 10 mn et à 4°C. Le culot est resuspendu dans 0,5 ml de Tris 50 mM Saccharose 25% (p/v) pH 7,3 et homogénéisé au vortex. On ajoute alors du lysozyme à 75 µg/ml en concentration finale, on mélange et on incube 30 mn à 4°C en agitant de temps à autre. Puis on ajoute de l'EDTA à 1 mM en concentration finale et on laisse reposer 10 mn à 4°C. La solution obtenue est alors centrifugée à 4000 g pendant 10 mn et à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction I est récupéré, et on ajoute du MgSO₄ à 5 mM en concentration finale de façon à restaurer l'activité pectate lyase. Cette fraction peut éventuellement être soumise à une dialyse contre le tampon Tris 30 mM, MgSO₄ 5 mM pH 7,3 de façon à éliminer le saccharose. Le culot obtenu est alors vigoureusement remis en suspension dans 0,5 ml de Tris 30 mM pH 7,3 jusqu'à ce que la suspension soit parfaitement homogène. La solution qui devient alors visqueuse, ce qui est dû à la libération d'ADN de haut poids moléculaire consécutif à la lyse des bactéries par choc osmotique, est traitée à la DNase à 150 µg/ml en concentration finale puis est centrifugée à 4000 g pendant 10 mn et à 4°C de façon à éliminer les sphéroplastes non lysés. Le surnageant obtenu correspond à la fraction II.

10.2.3 - Lyse par le mélange lysozyme/SDS.

Cette technique permet d'éviter le recours à la presse de French, dans le cas où l'on désire analyser un nombre important de clones recombinants pour les activités pectine méthylestérase et pectate lyase. Ces dernières étant insensibles au SDS à faible concentration. Le protocole de lyse utilisé est le suivant :

1 ml d'une culture d'*E. coli* parvenue en phase stationnaire est centrifugée à 4000 g pendant 10 mn et à 4°C. Le culot est repris dans 50 µl de T₃₀ E₁ pH 7,3 et homogénéisé au vortex. La suspension bactérienne est alors incubée pendant 15 mn à 20°C en présence de lysozyme préparé dans le T₃₀ E₁ pH 7,3 à 4 mg/ml en concentration finale (6,5 µl à 30 mg/ml), et est agitée de temps en temps. On ajoute ensuite du SDS à 0,2% en concentration finale (14 µl à 1%), on mélange et 10 mn d'incubation à 20°C. A ce stade, la solution obtenue est visqueuse, ceci étant dû à la libération d'ADN de haut poids moléculaire consécutif à la lyse bactérienne et de ce fait est difficilement utilisable. L'addition de MgSO₄ à 10 mM en concentration finale (4 µl à 0,2 M) va permettre de lever l'action inhibitrice de l'EDTA sur l'activité de la pectate lyase et de la DNase. L'ajout de DNase à 150 µg/ml en concentration finale (3 µl à 5 mg/ml) va permettre d'obtenir une solution parfaitement fluide; l'incubation en présence de DNase dure 10 mn à 37°C. La solution obtenue est centrifugée pendant 15 mn à 10000 g et 4°C. Les mesures d'activités peuvent alors être effectuées sur le surnageant de lyse obtenu.

10.2.4 - Lyse par les vapeurs de chloroforme.

Il s'agit d'une technique utilisée pour lyser des colonies bactériennes sur boîte de Pétri et permettant une libération massive et rapide des enzymes à localisation intracellulaire. Son principe en est simple :

Les boîtes de Pétri en verre sont ouvertes et placées en position retournée dans un dessiccateur, après avoir versé du chloroforme dans le fond de ce dernier. Le dessiccateur est placé dans un bain-marie à 65°C (température de vaporisation du chloroforme) et les colonies sont exposées aux vapeurs de chloroforme pendant 10 mn. Les boîtes de Pétri sont alors remises à l'étuve à 37°C pendant quelques heures, ce qui permet aux enzymes libérées de dégrader le substrat.

Cette technique est utilisée en vue de la révélation d'une activité clonée à localisation intracellulaire.

11 - MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTS TYPES D'ACTIVITES PECTINOLYTIQUES.

11.1 - ACTIVITE PECTINE METHYLESTERASE.

Il s'agit d'une activité de déméthylation de la pectine qui entraîne l'apparition de groupements carboxyliques libres au niveau des résidus galacturoniques. En conséquence, on utilise des pectines présentant des degrés d'estérification élevés pour réaliser le test.

Le test est réalisé sur boîte de Pétri ("cup plate"), selon la technique de Zimmermann (284), en gel d'agarose faiblement tamponné (Tris 20 mM) à pH 7,0 contenant le substrat (pectine) ainsi qu'un indicateur de pH (bleu de bromothymol). On dépose sur le gel 5 à 20 μ l de solution enzymatique dont le pH est préalablement vérifié. Le témoin blanc est constitué par la même fraction chauffée à 100°C pendant 10 mn. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à 37°C pendant plusieurs heures. Le critère de présence de l'enzyme étant le virage de l'indicateur coloré du vert au jaune dû à l'acidification du milieu consécutif à la formation de groupements carboxyliques par dé-estérification du substrat.

La composition du tampon gélosé est la suivante pour 1 litre :

- Tris base	2,4 g
- Pectine	5 g
- Bleu de bromothymol	0,4 g
- Agarose	15 g

Le pH est ajusté à 7,0 par HCl et le bleu de bromothymol est préparé dans la soude 0,2 N. Le tampon gélosé est stérilisé par autoclavage à 105°C pendant 30 mn.

Nota : Il est possible d'utiliser le rouge de ruthénium comme indicateur de l'activité pectine méthylestérase. Dans ce cas, il est ajouté après action de l'enzyme à la concentration de 0,05% en solution aqueuse. Le principe étant que ce colorant se fixe sur les groupements carboxyliques libres. Autrement dit, les zones où la pectine méthylestérase aura agi seront rouge foncé sur fond rouge clair (50).

11.2 - ACTIVITE PECTATE LYASE.

Il s'agit d'une activité de dépolymérisation du polygalacturonate (PGA) qui s'opère par mécanisme de β -élimination se traduisant par la formation de composés insaturés présentant un maximum d'absorption situé autour de 235 nm.

11.2.1 - Dosage direct en milieu tamponné liquide (162).

Cette méthode permet de mettre en évidence et de quantifier l'activité pectate lyase présente dans une solution sans avoir recours à l'utilisation d'un réactif particulier. On mesure directement l'absorption à 235 nm, des composés insaturés libérés lors de la réaction enzymatique.

Le tampon utilisé pour le dosage est le suivant (composition donnée pour 1 litre) :

- Tris base (20 mM)	2,4 g
- CaCl ₂ .2H ₂ O (0,2 mM)	0,03 g
ou MgSO ₄ .7H ₂ O (2 mM)	0,5 g
- Polygalacturonate	1 g

Le pH du tampon est ajusté à 8,4 par HCl et le polygalacturonate est ajouté après autoclavage du tampon (30 mn à 105°C).

Le dosage se déroule de la manière suivante :

	Témoin blanc	Echantillon
T ₂₀ Ca _{0,2} ou Mg ₂ pH 8,4	2 ml	2 ml
PGA à 2,5%	80 µl	80 µl
Echantillon	-	x µl
.....Incubation x mn à 37°C.....		
EDTA 0,2 M	20 µl	20 µl
Echantillon	x µl	-

On procède alors à la mesure de la variation de D.O existant entre le témoin blanc et l'échantillon.

L'addition d'EDTA à 2 mM en concentration finale, permet de bloquer la réaction enzymatique et d'ajouter les x µl d'échantillon dans le témoin de façon à ce que les deux solutions aient une composition identique et que la différence d'absorption mesurée entre le témoin et l'échantillon ne puisse être due qu'à l'action de l'enzyme éventuellement présente dans cet échantillon.

Lorsqu'on réalise des cinétiques enzymatiques, il n'est pas question d'utiliser l'EDTA pour bloquer l'action de l'enzyme au niveau du témoin blanc puisque ce dernier a tendance à absorber à 235 nm. En conséquence, on inactive l'enzyme par chauffage à 100°C pendant 5 mn.

En ce qui concerne la quantification de l'activité enzymatique en terme d'unités d'activité, on considère qu'une variation de D.O de 1,0 unité d'absorbance en 1 mn à pH 8,4, à 37°C, à 235 nm et mesurée dans 2 ml de volume réactionnel représente 1 unité d'activité pectate lyase.

11.2.2 - Mise en évidence de l'activité sur tampon gélosé.

Il s'agit d'un test utilisé pour mettre en évidence une activité pectate lyase présente dans une solution (fraction cellulaire ou surnageant de culture par exemple). Cette technique est moins intéressante que la première puisque essentiellement qualitative et plus lourde à mettre en oeuvre. Le principe de cette technique est le suivant :

L'enzyme contenue dans un échantillon est déposée sur un gel d'agarose tamponné contenant le substrat. Après un certain temps d'incubation à 37°C, la révélation de l'activité s'effectue en recouvrant le gel pendant 20 mn par une solution de bromure de cetyl triméthylammonium (CTAB) préparée à 1% dans l'eau distillée ou par une solution d'acétate de cuivre à 10% ou encore par une solution de rouge de ruthénium à 0,05%.

* Le CTAB précipite les polysaccharides (le PGA et la pectine) mais pas les oligosaccharides résultant de l'action de la pectate lyase. En conséquence, la zone de dégradation apparaîtra sous forme d'un halo translucide sur fond opaque (113).

* L'acétate de cuivre agit d'une manière quelque peu différente puisque la dégradation du PGA se traduira par l'apparition d'un halo opaque sur fond clair (124).

* Le rouge de ruthénium se fixe sur les groupements carboxyliques des molécules de PGA; lorsque ces molécules sont dégradées, le colorant ne peut plus se fixer. L'action des dépolymérase se traduira donc par la formation de zones roses sur fond rouge (50).

La composition du tampon gélosé est la suivante :

- Tris base (20 mM)	2,4 g
- CaCl ₂ .2H ₂ O (0,2 mM)	0,03 g
ou MgSO ₄ .7H ₂ O (2 mM)	0,5 g
- Polygalacturonate ou pectine	5 g
- Agarose	15 g

Le pH est ajusté à 8,4 par HCl 0,2 N.

11.2.3 - Mise en évidence sur milieu riche gélosé.

Ce test révèle la présence d'une activité de dépolymérisation du polygalacturonate (pectate lyase ou polygalacturonase) à partir de colonies bactériennes. On utilise un milieu riche gélosé (LB ou YC) contenant du polygalacturonate ou de la pectine à la concentration de 0,5% et complétement en ions magnésium (5 mM) ou calcium (1 mM). La mise en évidence de l'activité de dépolymérisation s'effectue comme précédemment en utilisant le CTAB à 1% (113), l'acétate de cuivre à 10% (124) ou le rouge de ruthénium à 0,05% (50).

11.3 - ACTIVITE POLYGALACTURONASE.

Tout comme les pectate lyases, l'action des polygalacturonases sur le polygalacturonate provoque l'apparition de quantités croissantes de groupements réducteurs et une baisse progressive de la viscosité du milieu réactionnel, la diminution de viscosité dépendant du type d'activité (endo : chute rapide de la viscosité accompagnée par la libération d'une quantité importante de sucres réducteurs ou exo : phénomène inverse).

11.3.1 - Dosage des sucres réducteurs en milieu tamponné liquide (45).

La plupart des polygalacturonases et en particulier celle de *Bacteroides* sont insensibles à l'EDTA et travaillent à pH acide (optimum situé à pH 5,0). Le milieu réactionnel utilisé pour mettre en évidence l'activité polygalacturonase a donc la composition suivante pour 1 litre :

- Acide citrique (50 mM)	9,6 g
- EDTA (10 mM)	2,9 g
- Polygalacturonate	1 g

Le pH du tampon est ajusté à la valeur de 5,0 par NaOH et ce milieu est stérilisé par autoclavage à 105°C/30 mn.

Le protocole du dosage, dans son principe, est le même que celui utilisé pour l'activité pectate lyase (Cf. § 11.2.1), sauf que la réaction est bloquée par 2 ml de réactif de Nelson-Somogyi A+B (50 ml de A + 2 ml de B) (Cf. § 12.2).

La quantification de l'activité polygalacturonase s'effectue par rapport à une gamme étalon qui s'étend de 0 à 80 µg d'acide galacturonique. L'activité spécifique polygalacturonase étant exprimée dans ce cas, en terme de nmoles de sucres réducteurs formés par mn et par mg de protéines ou en nanokatal sachant dans ce cas, qu'un katal représente 1 mole de sucres réducteurs formés par seconde. La mesure d'activité s'effectuant dans 2 ml de volume réactionnel comme pour l'activité pectate lyase.

11.3.2 - Mise en évidence de l'activité sur tampon gélosé (196).

Tout comme pour l'activité pectate lyase, l'activité polygalacturonase peut être mise en évidence sur gel d'agarose tamponné. La composition de ce gel est la suivante :

- Acide citrique (50 mM)	9,6 g
- EDTA (10 mM)	2,9 g
- Polygalacturonate	5 g
- Agarose	15 g

Le pH est ajusté à 5,0 par NaOH et la stérilisation s'effectue à 105°C/30 mn.

Les extraits enzymatiques sont déposés sur ce tampon gélosé et sont incubés pendant plusieurs heures, temps nécessaire à la diffusion de l'enzyme dans le gel et à son action sur le substrat. L'activité polygalacturonase est révélée tout comme pour l'activité pectate lyase par le CTAB ou l'acétate de cuivre (Cf. § 11.2.2).

11.3.3 - Mise en évidence de l'activité sur milieu de culture gélosé (113). (Voir § 11.2.3).

12 - QUANTIFICATION DE CES ACTIVITES ET EXPRESSION EN TERME D'ACTIVITE SPECIFIQUE.

12.1 - DOSAGE DES COMPOSES INSATURES A 235 nm.

Il s'agit d'une méthode permettant de quantifier précisément l'activité pectate lyase présente dans un extrait cellulaire. Le principe de cette technique ainsi que le protocole de dosage sont décrits dans le § 11.2.1.

12.2 - DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE DE NELSON-SOMOGYI (170).

Principe : Les oses sont réducteurs par leur fonction pseudo-aldéhydique ou pseudo-cétonique. Cette propriété est mise en évidence au moyen de solutions alcalines de combinaisons de métaux lourds (cuivre, mercure, argent, molybdène...); à chaud, ces sels sont réduits et on obtient un précipité de métal libre ou d'un oxyde inférieur. Dans la méthode de Nelson-Somogyi, le réactif cupro-alcalin forme un précipité d'oxyde cuivreux qui réduit le

réactif arsénio-molybdique en donnant naissance à un complexe bleu intense. Cette réaction est utilisée pour le dosage des sucres réducteurs. Les réactifs utilisés pour mettre en oeuvre le dosage sont les suivants :

* Réactif A dont la composition pour 1 litre est la suivante :

- Na_2CO_3 anhydre 25 g
- $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 g (Tartrate double Na/K)
- NaHCO_3 20 g
- Na_2SO_4 anhydre 200 g

* Réactif B composé de CuSO_4 en solution aqueuse acide à 15%.

* Réactif arséniomolybdique constitué de :

- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 g (Molybdate d'ammonium)
- H_2SO_4 pur 21 ml
- $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g (Arséniate de sodium)

La solution d'arséniate de sodium est préparée à part dans 25 ml d'eau distillée et jointe progressivement à la solution de molybdate. Lorsque les deux solutions sont réunies, on ajoute de l'eau distillée pour qsp 500 ml. Si le réactif obtenu a une teinte verdâtre, ajouter quelques gouttes de KMnO_4 0,05 N jusqu'à obtention d'une coloration jaune d'or. Si cette solution est trouble, il est conseillé de la filtrer.

Le protocole du dosage est le suivant :

On réalise une gamme étalon glucose et/ou acide galacturonique s'échelonnant entre 0 et 80 μg par tube, en respectant un volume final de 2 ml, tout comme pour les témoins et échantillons.

- On ajoute 2 ml de réactif A + B (25 ml de A pour 1 ml de B) et on mélange au vortex. Les tubes sont alors fermés de façon non hermétique et placés dans un bain-marie bouillant pendant 20 mn. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain d'eau pendant 5 mn.

- On ajoute alors 2 ml de réactif arséniomolybdique et on mélange la solution au vortex.

- On ajoute 4 ml d'eau distillée et on homogénéise la solution.

La D.O des différents échantillons est alors lue à 700 nm.

12.3 - DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY (144).

Le dosage des protéines réalisé en parallèle avec des dosages de sucres réducteurs ou d'insaturés permet d'exprimer les activités pectate lyases ou polygalacturonases en terme d'activités spécifiques, c'est-à-dire en nombre d'unités d'enzymes/mg de protéines pour l'activité pectate lyase, et nombre de nmoles de sucres réducteurs formés/mn/mg de protéines pour l'activité polygalacturonase.

Principe : Le constituant actif du réactif de Folin est l'acide mixte phosphomolybdique.

L'effet des protéines sur cet acide est une réduction par perte d'un, de deux, ou de trois atomes d'oxygène par le molybdate. La fixation de cuivre par chélation facilitant le transfert d'électrons vers l'acide mixte. On obtient alors des composés réduits possédant une couleur bleue caractéristique et présentant une absorption maximale à 750 nm. Les groupements chromogéniques intervenant dans cette réaction étant la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et l'histidine.

Limites : La technique de dosage utilisée est sensible puisqu'elle permet de détecter de 3 à 300 μg de protéines/ml mais possède l'inconvénient de présenter des interférences avec certains détergents tels que le Triton X100 et le SDS, avec certains tampons, acides aminés, agents chélatants et acides nucléiques.

Cette méthode utilise les réactifs suivants :

* Réactif 1 constitué de :

- NaOH	8 g
- Na ₂ CO ₃	21 g
et H ₂ O pour qsp	1000 ml

* Réactif 2 composé de :

- CuSO ₄	1 g
- C ₄ H ₄ KNaO ₆ .4H ₂ O	2 g (Tartrate double Na/K)
et H ₂ O pour qsp	1000 ml

* Réactif phosphotungstique-phosphomolybdique de Folin et Denis.

La gamme étalon est constituée par une solution de sérum- albumine bovine dont la concentration est comprise entre 0 et 200 μg /tube dans un volume de 0,5 ml.

Le protocole de dosage est le suivant :

- Ajouter 1 ml de tampon 2 et mélanger.
- Ajouter 4 ml de tampon 1 et agiter.
- Ajouter 1 ml de réactif de Folin et Denis dilué au 1/3 et homogénéiser.
- Placer les tubes à l'obscurité pendant 10 mn pour permettre le développement de la coloration, puis agiter et lire la D.O des échantillons à 750 nm.

13 - CARACTERISATION DES PECTINASES PRODUITES PAR BACTEROIDES OU PAR E. COLI.

13.1 - LOCALISATION.

Les différentes fractions cellulaires (surnageant, fraction cyto-périplasmique et

membranaire) sont préparées selon les techniques décrites aux § 10.1.1, 10.2.2 ou 10.2.3. Des mesures d'activités pectine méthylestérase, pectate lyase et polygalacturonase sont alors réalisées sur les différentes fractions et exprimées en terme d'activités spécifiques apparentes pour les pectate lyase et polygalacturonase.

13.2 - pH OPTIMUM D'ACTION.

Déterminé dans le tampon T_{20} , $T_{20} Ca_{0,2}$ et $T_{20} Mg_2$ pour une gamme de pH variant de 7,5 à 9,5 pour la pectate lyase et dans le tampon Citrate de $Na_{50} EDTA_{10}$ pour une gamme de pH comprise entre 3,5 et 7,0 pour la polygalacturonase. Les mesures sont effectuées à partir de la fraction cyto-périplasmique pour l'activité pectate lyase et membranaire pour la polygalacturonase. L'incubation des fractions s'effectue à 37°C et pour des temps variant de 2 à 15 mn selon la quantité d'enzyme mise en contact avec le substrat (polygalacturonate), l'important étant que la valeur prise en compte se situe en phase linéaire de réponse (pente de la droite maximale).

Le protocole utilisé est le suivant :

* Pour l'activité pectate lyase, on a deux possibilités :

I - 2 ml de tampon T_{20} au pH x + $CaCl_2$ 0,2 mM ou $MgSO_4$ 2 mM (facultatif) + 80 μ l de PGA à 2,5% + x μ l de fraction cyto-périplasmique. Incubation x mn en présence d'un témoin blanc. Blocage de la réaction par l'EDTA et lecture de la variation de D.O à 235 nm.

II - Suivi de la variation d'absorption à 235 nm dans les mêmes conditions, en présence d'un témoin constitué par la même fraction enzymatique inactivée par chauffage à 100°C pendant 5 mn (voir § 11.2.1).

* Pour l'activité polygalacturonase : 2 ml de tampon citrate de $Na_{50} EDTA_{10}$ au pH x + 80 μ l de PGA à 2,5% + x μ l de fraction membranaire. Incubation x mn en présence d'un témoin blanc. Blocage de la réaction enzymatique par 2 ml de réactif A + B et dosage des sucres réducteurs formés, lecture de la variation de D.O à 700 nm.

Nota : Pour la représentation des activités sous forme de courbes ou d'histogrammes, l'activité dépolymérisante (pectate lyase ou polygalacturonase) est exprimée en terme de % d'activité par rapport à la D.O maximale observée, l'activité pectate lyase est mesurée directement à 235 nm, et l'activité polygalacturonase indirectement par dosage des sucres réducteurs à 700 nm.

13.3 - TEMPERATURE OPTIMALE.

Déterminée dans les tampons $T_{20} Mg_2$ pH 8,4 et $T_{20} Ca_{0,2}$ pH 8,4 pour l'activité

pectate lyase présente dans la fraction cyto-périplasmique et dans le tampon citrate de Na_5O EDTA_{10} pH 5,0 pour l'activité polygalacturonase présente dans la fraction membranaire pour une gamme de températures comprises entre 30 et 70°C.

Le tampon contenant le substrat est préchauffé à température et l'incubation varie de 2 à 10 mn selon la quantité d'enzyme présente dans les fractions pour la polygalacturonase. Pour la pectate lyase, on effectue des cinétiques pour chaque température puisqu'on peut suivre l'évolution de l'absorption à 235 nm sans avoir recours à l'utilisation de réactifs particuliers qui bloqueraient toute activité enzymatique.

Le protocole est dans son principe identique à celui utilisé pour la détermination du pH optimum. Dans le cas des cinétiques, l'enzyme est détruite par chauffage à 100°C pendant 5 mn pour le témoin blanc (Cf. § 11.2.1).

13.4 - THERMOSTABILITE.

Les enzymes contenues dans les différentes fractions sont exposées durant une période variant de 0 à 20 mn, à 50°C ou 60°C. Les enzymes sont alors mises en contact avec le substrat pendant 5 mn à 37°C. On mesure alors la variation de D.O à 235 nm pour l'activité pectate lyase et à 700 nm pour l'activité polygalacturonase. Lorsque la thermostabilité est bonne pour une température donnée, les temps de contact sont allongés : 30, 60, 90 et 120 mn.

13.5 - INFLUENCE DES IONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITE PECTATE LYASE.

Les mesures d'activité sont effectuées dans le tampon T_{20} pH 8,4 à 37°C. L'influence des ions Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} et Zn^{++} a été testée pour des concentrations s'échelonnant respectivement entre 0,1 et 0,5 mM; 0,1 et 5 mM; 0,01 et 1 mM et 0,001 et 0,5 mM. La valeur de référence étant celle obtenue dans le tampon T_{20} pH 8,4.

13.6 - DETERMINATION DU TYPE D'ACTIVITE DE DEPOLYMERISATION PAR VISCOSIMETRIE.

La technique utilisée permet de différencier les activités de type endo (clivage du polymère au hasard) et de type exo (clivage par récurrence à partir d'une extrémité du polymère).

Principe : On mesure la diminution de la viscosité d'une solution tampon au cours d'une réaction enzymatique. Cette diminution est rapide dans le cas où on a une activité endo.

Parallèlement, on effectue un dosage des sucres réducteurs pour une diminution de viscosité de 50% et de 100%. Le rapport entre la quantité de sucres réducteurs présents à 50% et à 100% de réduction de viscosité, permet de connaître le pourcentage de liaisons glycosidiques coupées. Si ce rapport est compris entre 3 et 10%, il s'agit d'une activité de type endo; s' il est supérieur à 10% d'une activité exo.

Pour l'activité pectate lyase, la réaction enzymatique s'effectue dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 et pour l'activité polygalacturonase dans le tampon Citrate de Na₅₀ EDTA₁₀ pH 5,0. Le substrat utilisé est le polygalacturonate à la concentration de 1% et le volume de tampon de 15 ml. La viscosité initiale est mesurée à 37°C avant ajout de l'enzyme (fraction cyto-périplasmique de la souche de *B. thetaiotaomicron* 217 ou *E. coli* (pBT5) pour l'activité pectate lyase et fraction membranaire pour l'activité polygalacturonase). On dépose ensuite l'équivalent d'une unité d'activité pectate lyase ou de 0,6 nanokatal d'activité polygalacturonase et on suit la diminution de viscosité.

13.7 - MISE EN EVIDENCE DES SUBSTRATS INDUCTEURS DES DIFFERENTS TYPES D'ACTIVITES.

Différents substrats de croissance tels que la pectine, le polygalacturonate, l'acide galacturonique et le glucose ont été utilisés afin d'étudier leur rôle dans l'induction de cette activité. Ces substrats ont été employés en concentration finale à 0,5% dans le milieu de Caspari et Macy. La souche a été cultivée jusqu'en phase de croissance tardive et les mesures d'activités ont été faites à partir des surnageants de culture ainsi que des fractions cyto-périplasmique et membranaire, provenant d'extraits bruts obtenus après passage des bactéries à la presse de French.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre laboratoire s'intéresse au genre *Bacteroides* depuis 1984. Au début, les études portaient sur la recherche de plasmides porteurs de marqueurs d'antibiorésistance. Ensuite, la construction de vecteurs navettes bifonctionnels, capables de se répliquer chez *E. coli* et chez *Bacteroides*, a été entreprise (184). Ces vecteurs ont servi à tester l'expression de gènes originaires de bactéries aérobies chez *Bacteroides*, ce qui a permis de mettre en évidence l'absence d'expression de ces gènes chez *Bacteroides* (184). Cette absence apparente d'expression pouvant s'expliquer par l'existence de barrières au niveau de la transcription, de la traduction, de la maturation des produits des gènes ou encore des problèmes au niveau de la régulation des gènes étrangers à *Bacteroides*. Par contre, de nombreux gènes provenant de *Bacteroides* s'expriment correctement chez *E. coli* (Tableaux 6a, b et c), les produits des gènes synthétisés par *E. coli* présentant des caractéristiques biochimiques analogues, mais les gènes clonés n'étant plus soumis aux mêmes systèmes de régulation. Par conséquent, nous avons entrepris de cloner chez *E. coli*, des gènes provenant de *Bacteroides* et impliqués dans la dégradation de polysaccharides complexes tels que les dextrans (121a). Le modèle qui a été retenu lors de cette étude, est celui des gènes impliqués dans la dégradation des pectines.

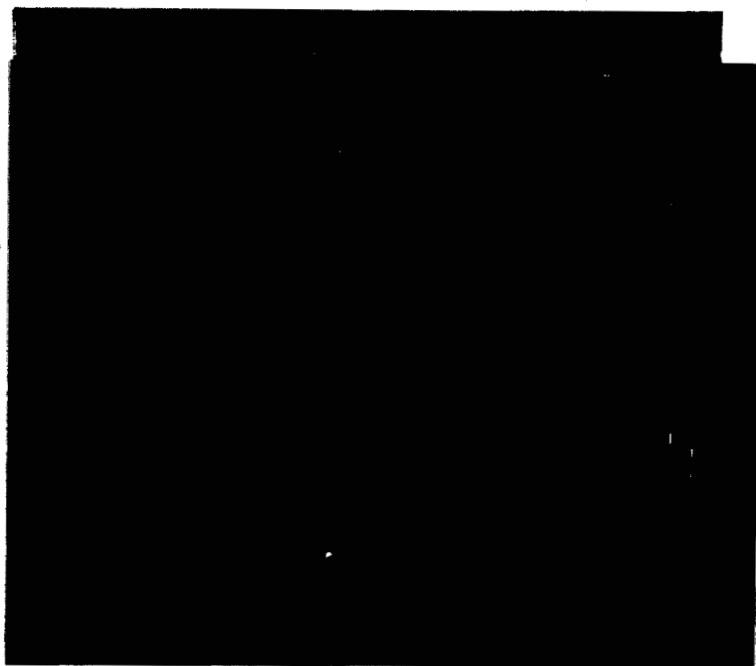
1 - CHOIX DE LA SOUCHE DE BACTEROIDES.

La souche sélectionnée devait présenter la panoplie enzymatique de dégradation des pectines la plus complète, à savoir les activités pectine méthylestérase, pectate lyase et polygalacturonase. Les activités devaient être importantes et si possible extracellulaires.

Notre laboratoire dispose d'une collection de 56 souches de *Bacteroides* appartenant à diverses espèces. Toutes ces souches ont dans un premier temps été testées pour leur rapidité de croissance en milieu minimum liquide de Caspari et Macy, contenant de la pectine ou du polygalacturonate à 0,5% comme seule source de carbone. Neuf souches ont été capables de se développer sur ces deux milieux; il s'agit des souches 146, 217, 419, 489 et 519 appartenant à l'espèce *thetaitaomicron*, 191 et 373 appartenant à l'espèce *fragilis*, *B. distasonis* 524 et *P. ruminicola* NCFB 2202. Seules les souches 146, 191, 217, 489 et 519 ont atteint les densités optiques de fin de culture les plus élevées en milieu minimum additionné de pectine.

Ces 5 souches ont ensuite été repiquées sur milieu YC gélosé contenant de la pectine ou du polygalacturonate en concentration finale à 0,5%. Après une durée d'incubation en anaérobiose de 4 jours, le niveau d'activité pectinolytique des différentes souches a été évalué d'après la taille du halo de clarification, consécutif à la dégradation du polysaccharide et observé après précipitation du polysaccharide par le bromure de cétyl triméthylammonium (CTAB) (Figure 8 A et B). Les résultats sont reportés sur l'histogramme de la figure 9.

A



B



Figure 8. Halos de clarification observés après précipitation au CTAB en milieu YC additionné de PGA à 0,5% (photo A) ou de pectine à 0,5% (photo B) pour la souche *B. thetaiotaomicron* 217.

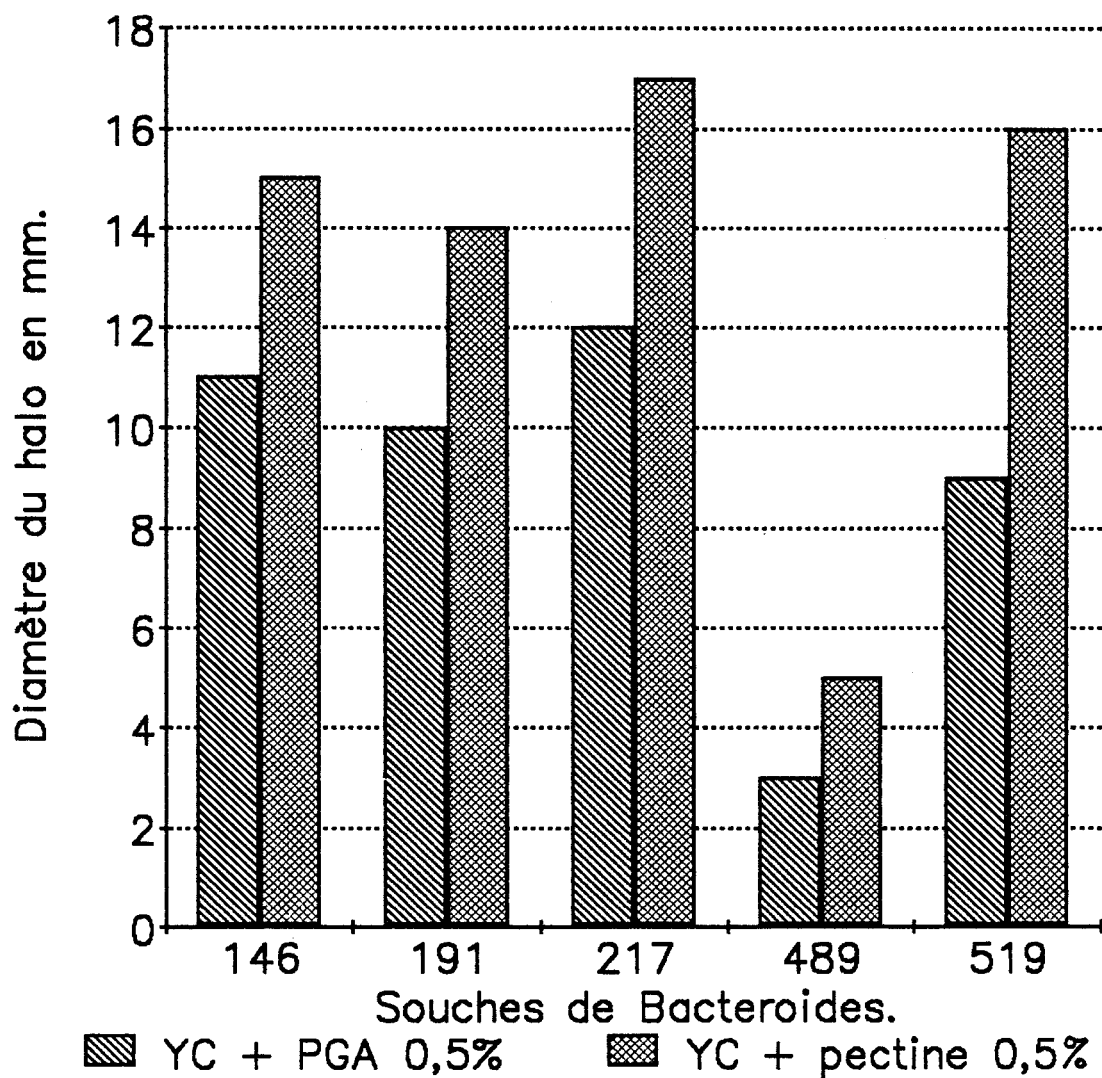


Figure 9. Activités de dépolymérisation du PGA ou de la pectine mesurées d'après la taille du halo de clarification observé après précipitation du polysaccharide au CTAB à 1%. Révélation effectuée après 4 jours d'incubation à 37°C.

De plus, des dosages d'activité spécifique apparente pectate lyase ont été réalisés au niveau des surnageants de culture (48 h) provenant des 5 souches cultivées en milieu minimum additionné de polygalacturonate ou de pectine (Figure 10). Dans les deux cas, c'est la souche de *B. thetaiotaomicron* 217 qui présente l'activité spécifique apparente la plus élevée. C'est donc cette souche qui a été sélectionnée pour la suite des travaux.

2 - CARACTERISATION DES PECTINASES PRODUITES PAR *B. THETAOTAOMICRON* 217.

L'étude des caractéristiques biochimiques propres à chaque type d'enzyme devait permettre de connaître plus précisément leurs propriétés, de mettre au point des milieux de sélection spécifiques de chaque enzyme et d'obtenir la meilleure sensibilité de détection lors des dosages d'activités.

Les caractérisations d'activité ont été réalisées à partir d'extraits bruts obtenus après culture de la souche en milieu de Caspari et Macy contenant du polygalacturonate en concentration finale à 0,5%, puis lyse des bactéries à la presse de French (Technique décrite au § 10.1.1 du chapitre Matériels et Méthodes).

2.1 - PECTINE METHYLESTERASE.

On la trouve présente au niveau des différents compartiments cellulaires; aucune quantification précise n'a pour l'instant été réalisée. La pectine méthylestérase qui a été mise en évidence par Jensen et Canale-Parola chez *B. galacturonicus* et chez *B. pectinophilus* est, quant à elle, extracellulaire (115,116). D'autre part, cette activité n'est pas inhibée par le SDS à 0,2%, constatation qui a également été faite par ces auteurs (116).

* Une première évaluation globale des activités de dépolymérisation présentes au niveau des différentes fractions des souches de *B. thetaiotaomicron* 217 et 489 a été réalisée sur tampon gélosé Tris-HCl 20 mM additionné de PGA à 0,5%. Il en résulte en ce qui concerne la souche 217 que la fraction cyto-périplasmique présente l'activité de dépolymérisation la plus importante (diamètre du halo de clarification obtenu après précipitation au CTAB, de 18 mm), suivie de la fraction membranaire (14 mm) et du surnageant de culture (8 mm) et ceci pour un même volume de fraction (20 μ l) (Figure 11). L'activité de dépolymérisation présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche 489 étant faible c'est-à-dire du même ordre que celle associée au surnageant de culture de la souche 217.

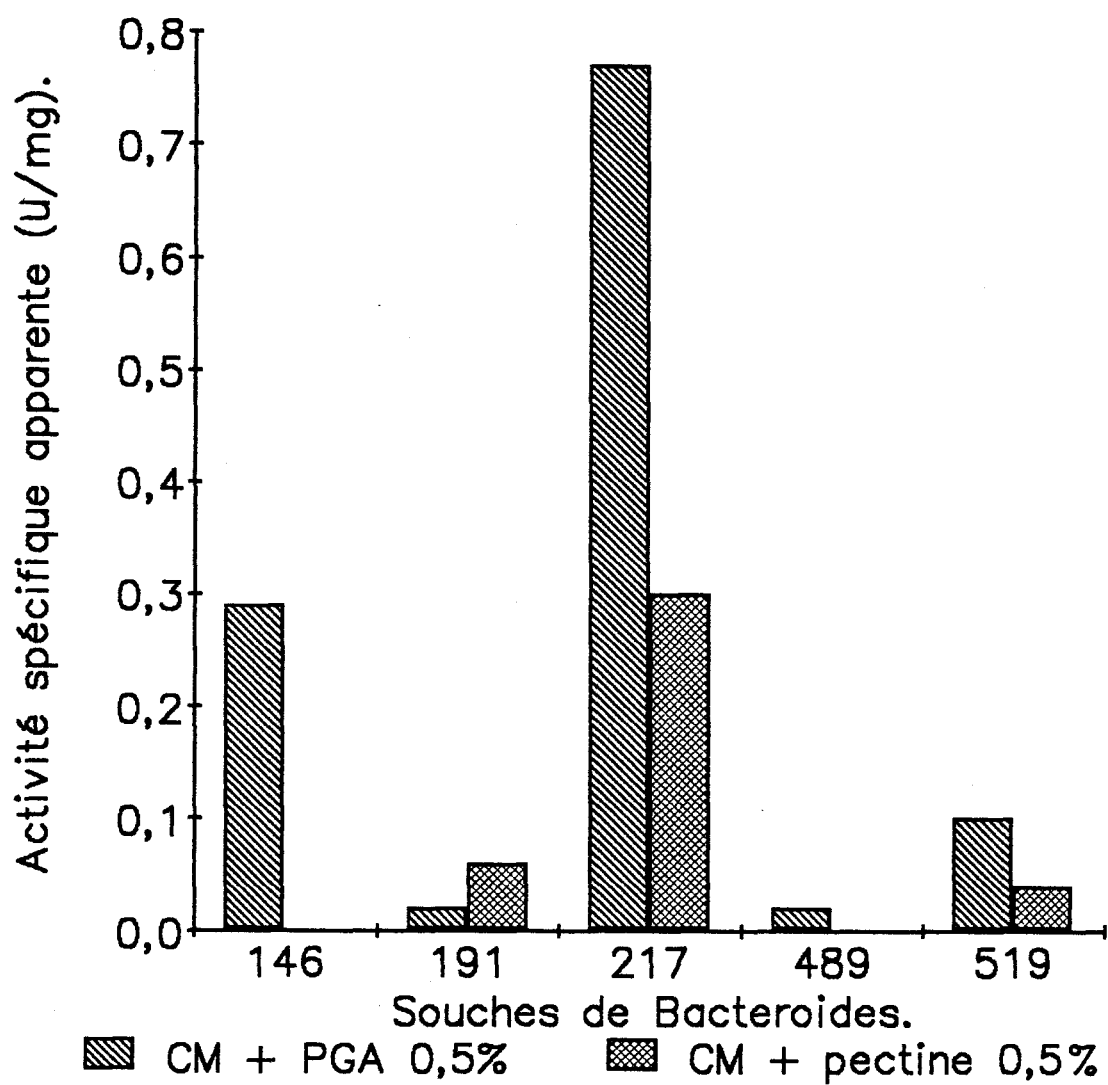


Figure 10. Activité pectate lyase présente au niveau des surnageants de culture de différentes souches de *Bacteroides* cultivées en milieu minimum additionné de pectine ou de PGA à 0,5%. Activité mesurée à 235 nm et dans le tampon T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4.

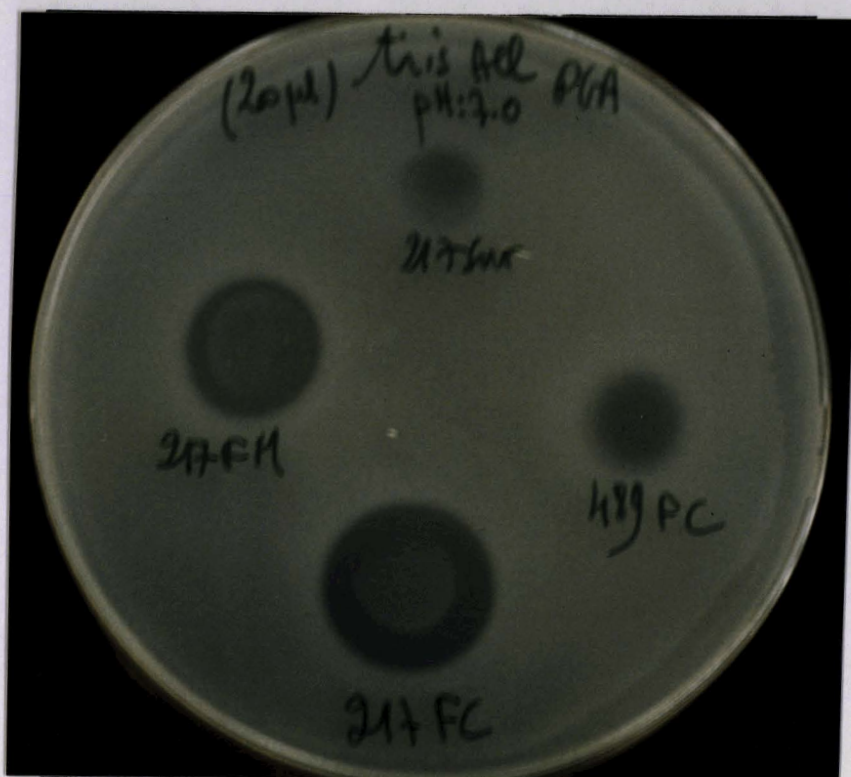


Figure 11. Halos de clarifications dus à la dépolymérisation du PGA par les pectinases présentes au niveau des surnageants de culture, fractions cyto-périplasmiques et membranaires provenant des souches de *B. thalassiosira* 217 et 489, et observés après précipitation du PGA par le CTAB à 1%.

2.2 - PECTATE LYASE.

2.2.1 - Localisation.

La localisation de cette activité a été déterminée à partir des fractions cyto-périplasmique et membranaire issues d'un extrait brut provenant d'une culture parvenue en phase de croissance stationnaire (17 h) en milieu minimum complété en polygalacturonate à 0,5% en concentration finale.

* Dans ce cas, l'activité spécifique apparente pectate lyase mesurée dans le tampon T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4 est de 1,8 U/mg de protéines au niveau de la fraction cyto-périplasmique (70%), 0,51 U/mg pour la fraction membranaire (20%) et 0,26 U/mg pour le surnageant de culture (10%).

* Dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4, on obtient les valeurs suivantes : 3,3 U/mg* (FCP) (61%), 1,75 U/mg (FM) (33%) et 0,31 U/mg (Surn.) (6%), valeurs relatives comparables à celles obtenues dans le tampon T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4.

Cette activité est donc essentiellement retrouvée au niveau de la fraction cyto-périplasmique (61 à 70% de l'activité globale) mais également au niveau de la fraction membranaire (20 à 33%) et du surnageant de culture (6 à 10%).

McCarthy *et al.* ont également déterminé la localisation de l'endopectate lyase de *B. thetaiotaomicron* à partir d'une culture parvenue à D.O:0,6 en milieu minimum additionné de polygalacturonate à 0,5%. Ils ont utilisé le même protocole d'extraction, et sont arrivés aux résultats suivants :

- aucune activité n'est mise en évidence au niveau du surnageant de culture, même après l'avoir concentré 10 fois.

- activité spécifique apparente de 0,8 U/mg associée à la fraction soluble (cyto-périplasmique) (154).

Autrement dit, l'activité pectate lyase mise en évidence au niveau du surnageant de culture est vraisemblablement due à l'autolyse des bactéries puisque nous sommes partis d'une culture en phase stationnaire.

* Rappel : 1 unité d'activité pectate lyase correspond à une quantité d'enzyme entraînant une variation de D.O de 1 unité en 1 mn mesurée à 235 nm, à 37°C et pour un volume de 2 ml de milieu réactionnel.

2.2.2 - pH optimum.

Le pH optimum de la pectate lyase présente au niveau de fraction cyto-périplasmique a été déterminé dans les tampons T₂₀ , T₂₀ Ca_{0,2} et T₂₀ Mg₂ pour une température de 37°C.

Dans tous les cas, quel que soit le tampon utilisé, on observe un pic unique à pH 8,4 (Figure 12). Cette valeur est proche de celle qui a été déterminée par McCarthy *et al.* dans le tampon T₂₀ Ca_{0,2} à partir d'un extrait brut et qui est de 8,7 (154,155).

2.2.3 - Température optimale.

Déterminée à partir de l'enzyme présente dans les fractions cyto-périplasmique et membranaire en utilisant le tampon T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4 pré-incubé à température et en mesurant la variation de D.O (lue à 235 nm) au cours des premières minutes de la réaction. Dans ce tampon, on observe un pic d'activité à 50°C quelle que soit la fraction testée, avec une chute très rapide d'activité à 60°C pour la pectate lyase présente au niveau de la fraction membranaire (Figure 13).

2.2.4 - Thermostabilité.

Elle a été testée à 50°C et 60°C pour l'enzyme présente au niveau des fractions cyto-périplasmique, membranaire et surnageant de culture, et pour des temps d'exposition variant de 5 à 120 mn. La fraction exposée a ensuite été incubée dans le tampon T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4/PGA 0,1% pendant 20 mn à 37°C.

* A 50°C, l'activité enzymatique est stable puisqu'au bout de 120 mn d'exposition, on a une perte de 5% d'activité pour l'enzyme présente dans la fraction cyto-périplasmique et de 10% pour celle présente dans le surnageant de culture. Cependant, la pectate lyase associée aux membranes est beaucoup plus sensible à cette température puisqu'on observe une chute d'activité de 30% et de 50% après respectivement 20 mn et 120 mn d'exposition (Figure 14).

* A 60°C, l'enzyme présente au niveau des 3 fractions est rapidement inactivée, en 10 mn pour l'enzyme associée aux membranes, et en 20 mn pour l'enzyme contenue dans les deux autres fractions (Figure 15).

2.2.5 - Effet du SDS.

Afin de mettre au point une méthode rapide de lyse adaptée pour *E. coli*, nous avons testé l'influence du SDS sur l'activité pectate lyase. En présence de SDS à 1%, l'enzyme présente au niveau du surnageant de culture perd peu de son activité puisqu'après respectivement 1 h et 2 h de contact, on observe une perte d'activité de 30% et de 37%. Dans la technique de lyse, le SDS étant utilisé à la concentration de 0,2%, il devenait possible d'utiliser cette technique pour tester les activités pectine méthylestérase et pectate lyase d'un grand nombre de clones recombinants sans devoir recourir à la presse de French.

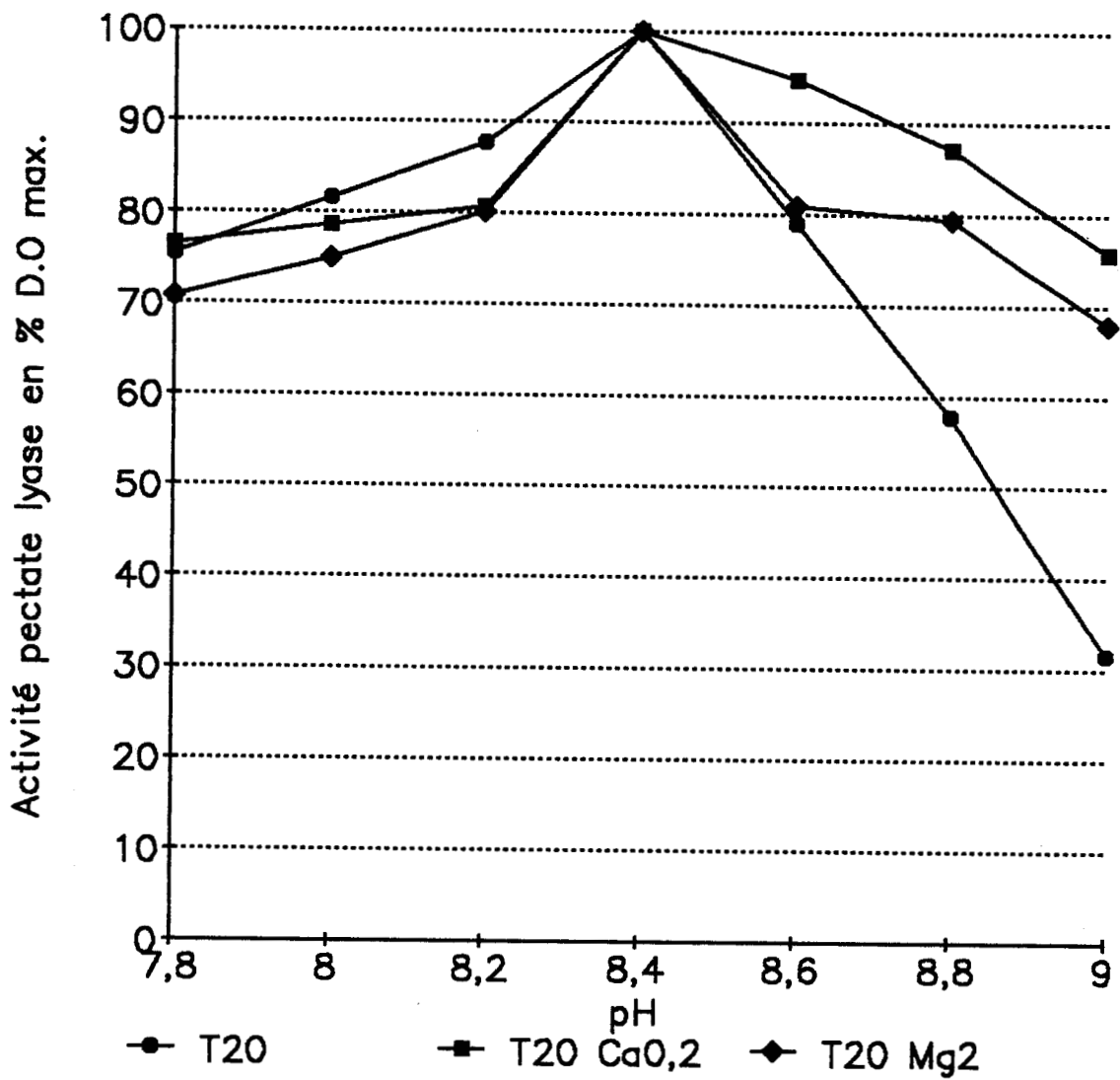


Figure 12. pH optimum de la pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 mesuré dans trois tampons différents et à une D.O de 235 nm.

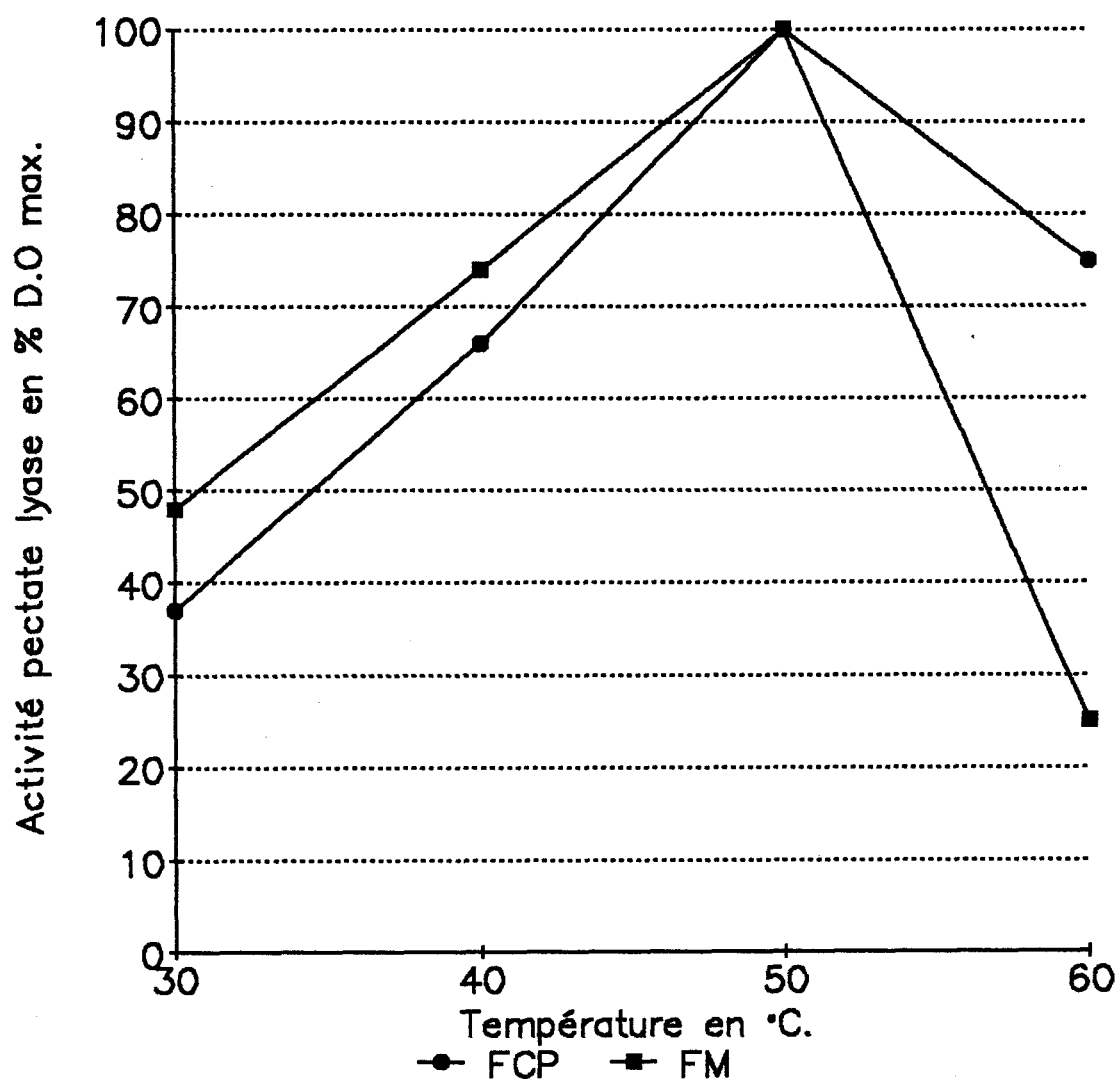


Figure 13. Température optimale de l'activité pectate lyase associée aux fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 cultivée en milieu minimum additionné de PGA à 0,5%.

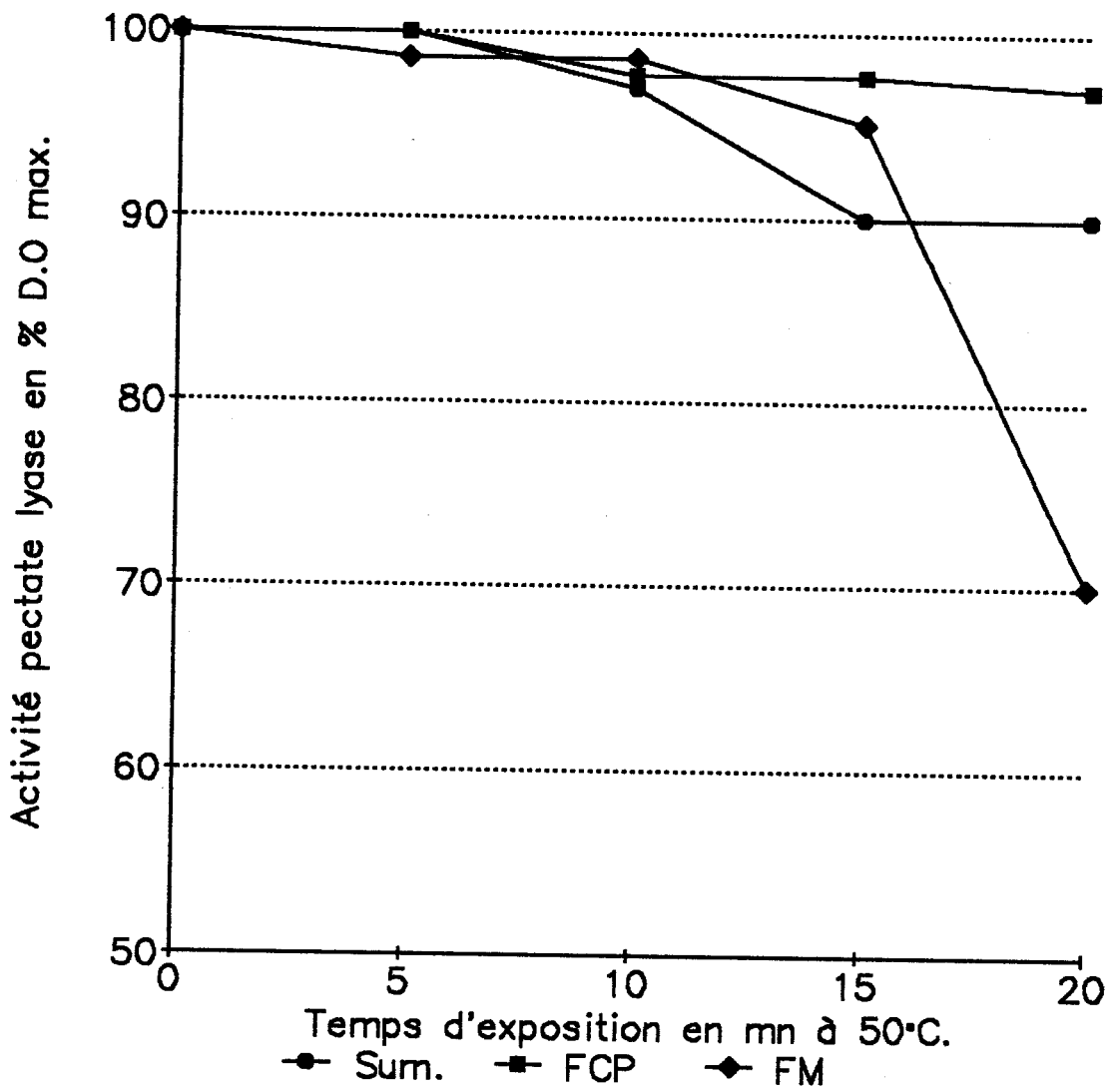


Figure 14. Etude de la thermostabilité à 50°C de l'activité pectate lyase présente au niveau des surnageant de culture, fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217.

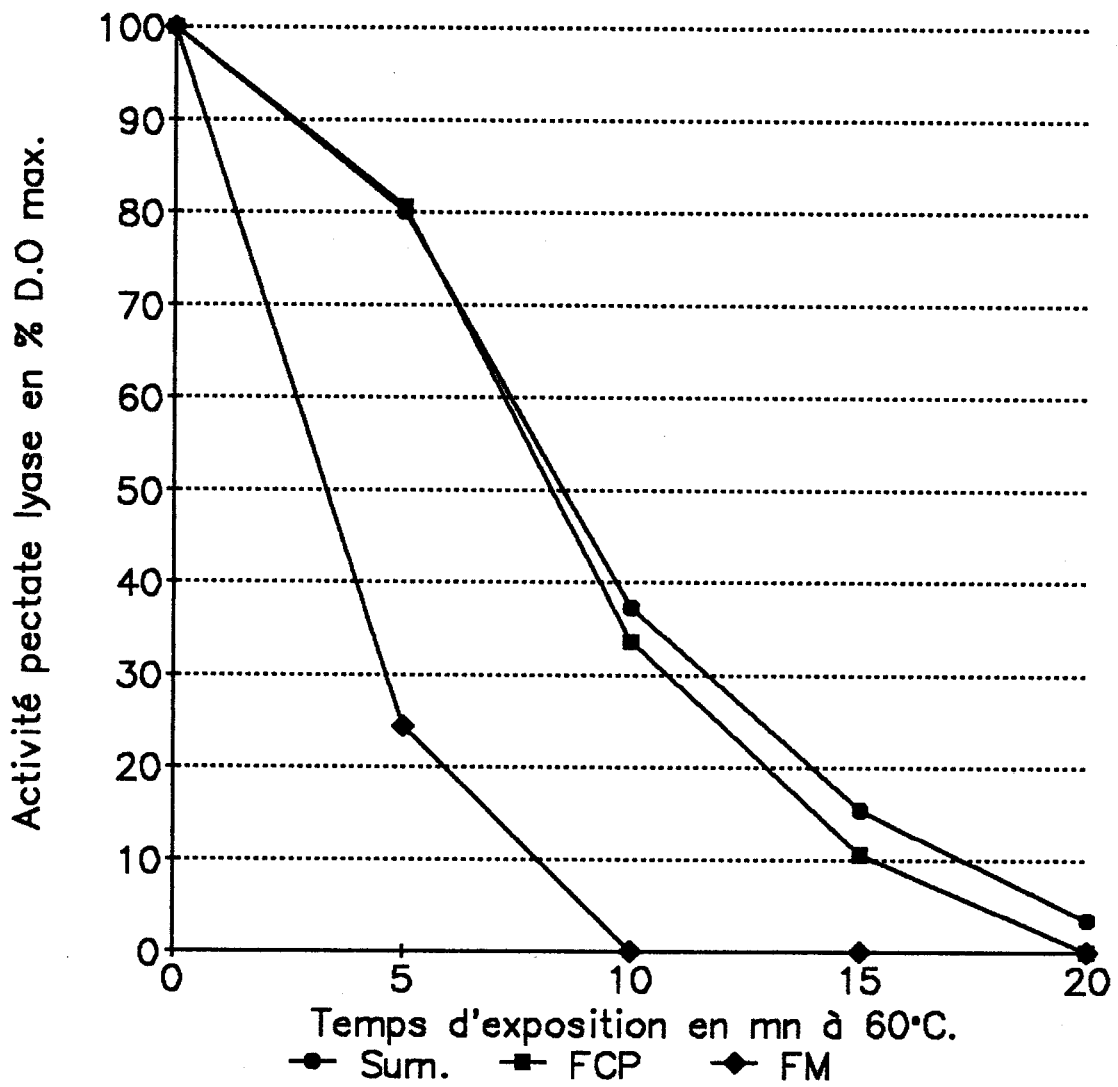


Figure 15. Etude de la thermostabilité à 60°C de l'activité pectate lyase présente au niveau des surnageant de culture, fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217.

2.2.6 - Influence des ions divalents.

Nous avons testé l'effet des ions Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} et Zn^{++} à pH 8,4 dans le tampon Tris 20 mM, sur l'activité pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique. Il en résulte que les ions Ca^{++} et Mg^{++} ont un effet activateur contrairement aux ions Mn^{++} et Zn^{++} qui sont inhibiteurs.

* Les ions Ca^{++} ont un effet activateur jusqu'à une concentration de 0,5 mM avec un optimum à 0,2 mM (Figure 16).

* Les ions Mg^{++} exercent un effet activateur jusqu'à une concentration de 5 mM et probablement plus, l'effet d'activation optimum étant obtenu pour une concentration de 2 mM (Figure 17).

* Les ions Mn^{++} sont inhibiteurs à partir d'une concentration de 0,05 mM (80% de l'activité initiale) (Figure 18).

* Les ions Zn^{++} sont fortement inhibiteurs pour une concentration de 0,1 mM (8,2% d'activité résiduelle) et le sont à partir d'une concentration de 0,01 mM (Figure 18).

McCarthy *et al.* ont également étudié l'influence des ions divalents sur l'activité pectate lyase de *B. thetaiotaomicron*. Ils sont arrivés à la conclusion que les ions Ca^{++} exercent un effet activateur, la concentration optimale étant de 0,2 mM (154,155). Par contre, selon eux, les ions Mn^{++} et Mg^{++} sont sans effet sur l'activité pectate lyase, ce qui est en désaccord avec nos observations.

L'effet activateur des ions Ca^{++} et Mg^{++} a été ensuite testé sur l'enzyme présente au niveau des 3 fractions. Dans tous les cas, pour les concentrations optimales en ions divalents, ce sont les ions Mg^{++} qui exercent l'effet activateur le plus important en particulier pour l'enzyme présente au niveau de la fraction membranaire (activité x par 2,4 et par 6 dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 par rapport respectivement au T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4 et au T₂₀ pH 8,4) (Histogramme de la figure 19).

En jouant un rôle chélateur des ions divalents, l'EDTA exerce un effet inhibiteur sur l'activité pectate lyase et ceci à partir d'une concentration de 0,1 mM dans le tampon Tris 20 mM pH 8,4. Ce qui explique qu'on l'utilise pour bloquer la réaction enzymatique.

2.2.7 - Mode d'action.

L'activité pectate lyase présente dans la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 a été incubée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 contenant du PGA à 1% en concentration finale. Le témoin négatif étant constitué par la même fraction incubée dans ce

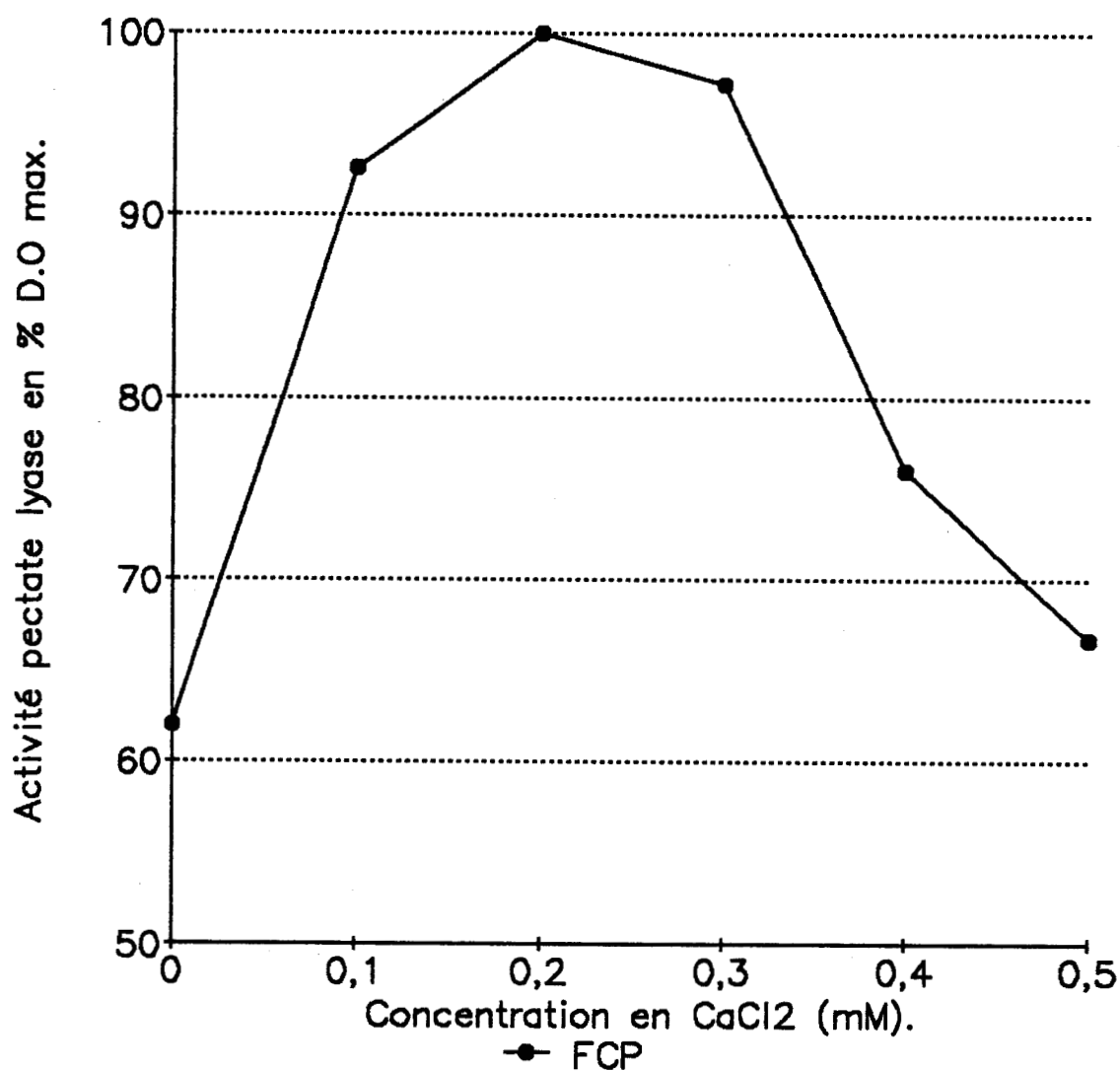


Figure 16. Influence des ions Ca^{++} sur l'activité pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 cultivée en milieu minimum additionné de PGA à 0,5%.

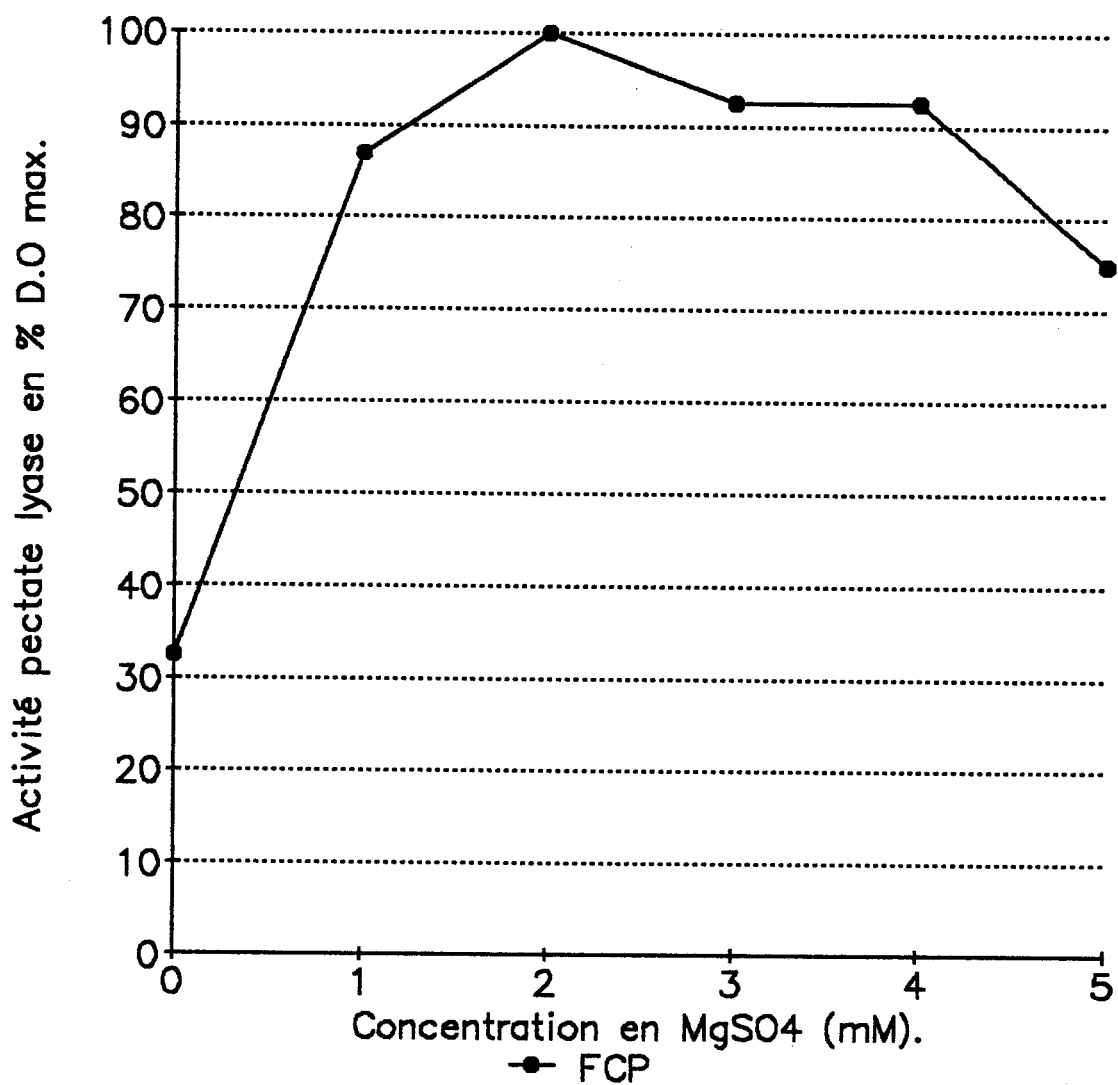


Figure 17. Influence des ions Mg^{++} sur l'activité pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 cultivée en milieu minimum additionné de PGA à 0,5%.

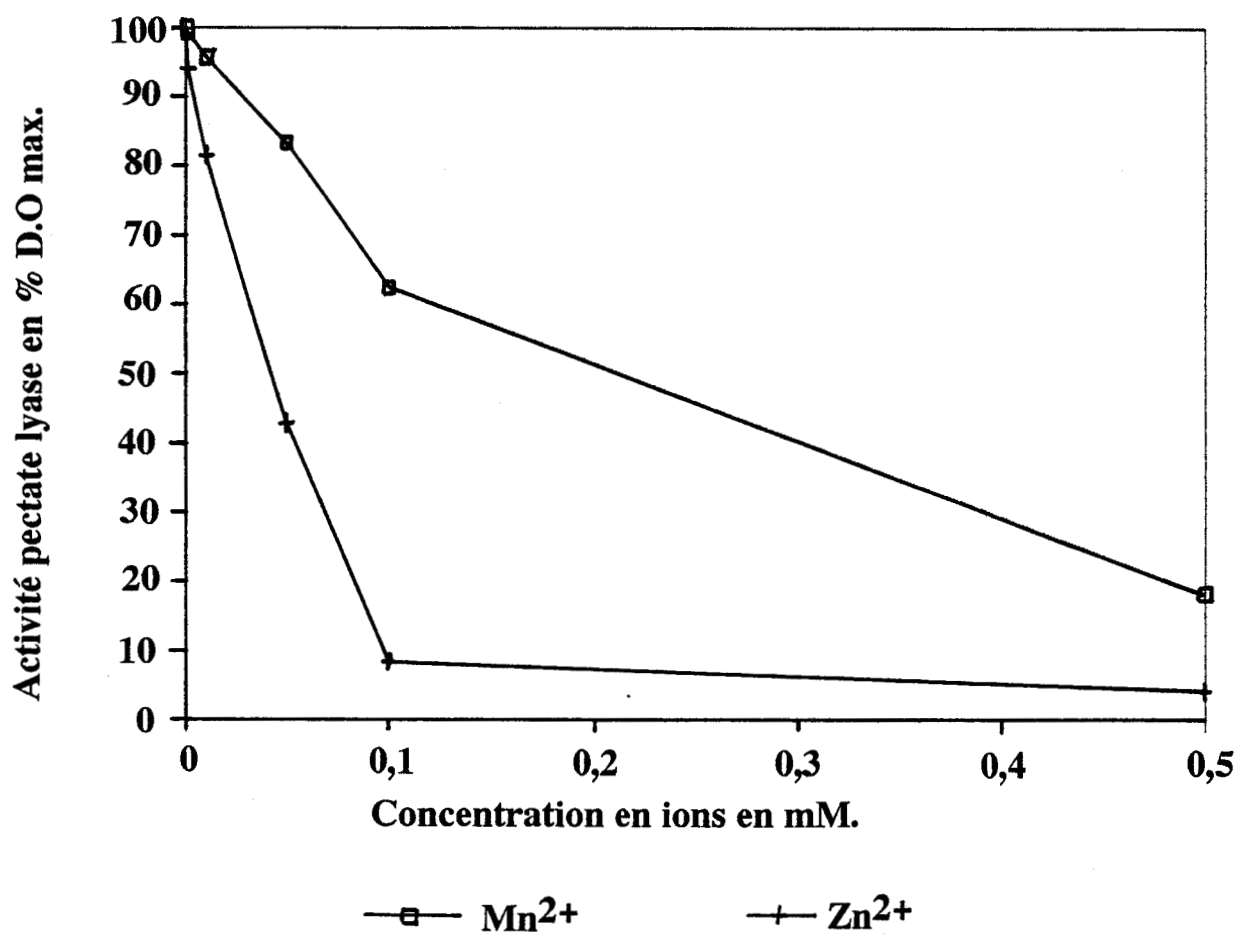


Figure 18. Effet des ions Mn^{++} et Zn^{++} sur la pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217.

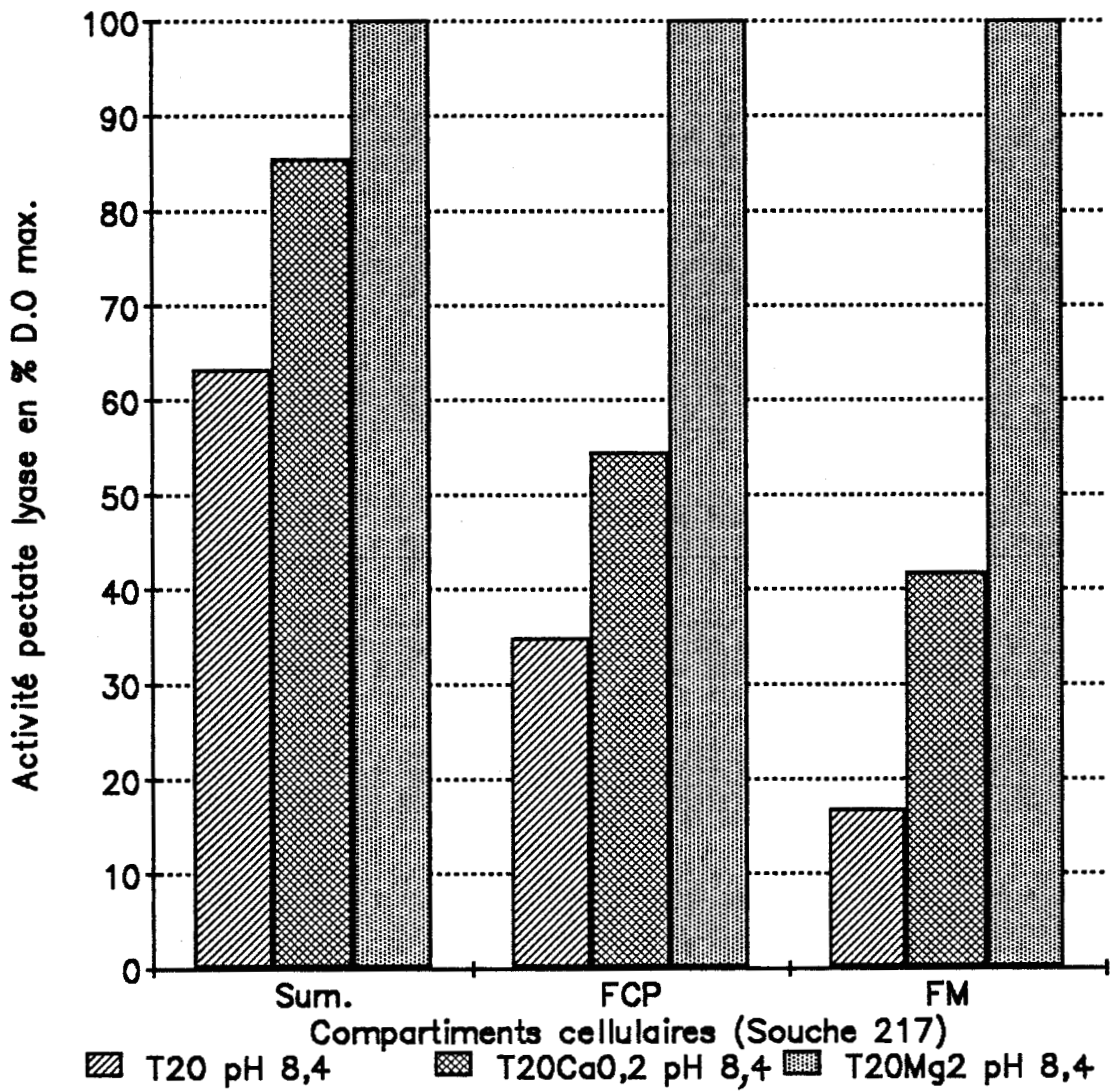


Figure 19. Effet activateur des ions divalents (Ca^{++} ou Mg^{++}) sur l'activité pectate lyase associée au surnageant de culture, ainsi qu'aux fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thaitaomicron* 217. Activité mesurée à 235 nm

tampon contenant en plus de l'EDTA 2 mM. La baisse de viscosité a été suivie au cours du temps, et des dosages de sucres réducteurs ont été effectués pour une diminution de viscosité de 50% (temps d'écoulement de 33 s) et de 100% (temps d'écoulement de 22 s) (Figure 20).

La baisse de viscosité est très rapide dans le cas de la fraction incubée dans le tampon sans EDTA puisqu'au bout de 20 mn, on observe une chute de viscosité de 50%. Par contre, aucune diminution de viscosité n'est observée dans le tampon contenant de l'EDTA, ce qui indique clairement que la diminution de viscosité observée dans l'autre tampon est due à l'activité pectate lyase présente dans la fraction cyto-périplasmique.

Le rapport quantité de sucres réducteurs formés à 50% de réduction de viscosité (89 $\mu\text{g/ml}$ d'échantillon) sur quantité de sucres réducteurs formés à 100% de réduction de viscosité (52,5 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ d'échantillon) est égal à 4,2%, ce qui indique qu'il s'agit d'une activité de type endo puisque ce rapport est inférieur à 10%.

2.2.8 - Conservation.

L'enzyme contenue dans la fraction cyto-périplasmique est parfaitement stable à -20°C puisqu'au bout d'une période d'un an de conservation, on observe une diminution d'activité de 2 à 5% selon les échantillons testés.

2.3 - POLYGALACTURONASE.

2.3.1 - Localisation.

La localisation a été déterminée après un temps de culture de 17 h en milieu de Caspari et Macy additionné de polygalacturonate en concentration finale à 0,5%. L'activité polygalacturonase est essentiellement associée aux membranes puisqu'on a une activité spécifique apparente de 120 nmoles/mn/mg ou 67,2% contre 59 nmoles/mn/mg ou 32,8% retrouvée au niveau de la fraction cyto-périplasmique, ce qui a également été constaté par McCarthy *et al.* (154). De plus, selon eux, l'activité polygalacturonase est essentiellement liée aux membranes internes (154). Contrairement à la pectate lyase, aucune activité polygalacturonase n'a pu être mise en évidence dans le surnageant de culture de la souche *B. thetaiotaomicron* 217, même après dialyse et concentration.

2.3.2 - pH optimum.

Il a été déterminé à 37°C , dans le tampon citrate de sodium 50 mM contenant de l'EDTA à 10 mM en concentration finale et à partir de l'enzyme présente dans les deux fractions. Dans

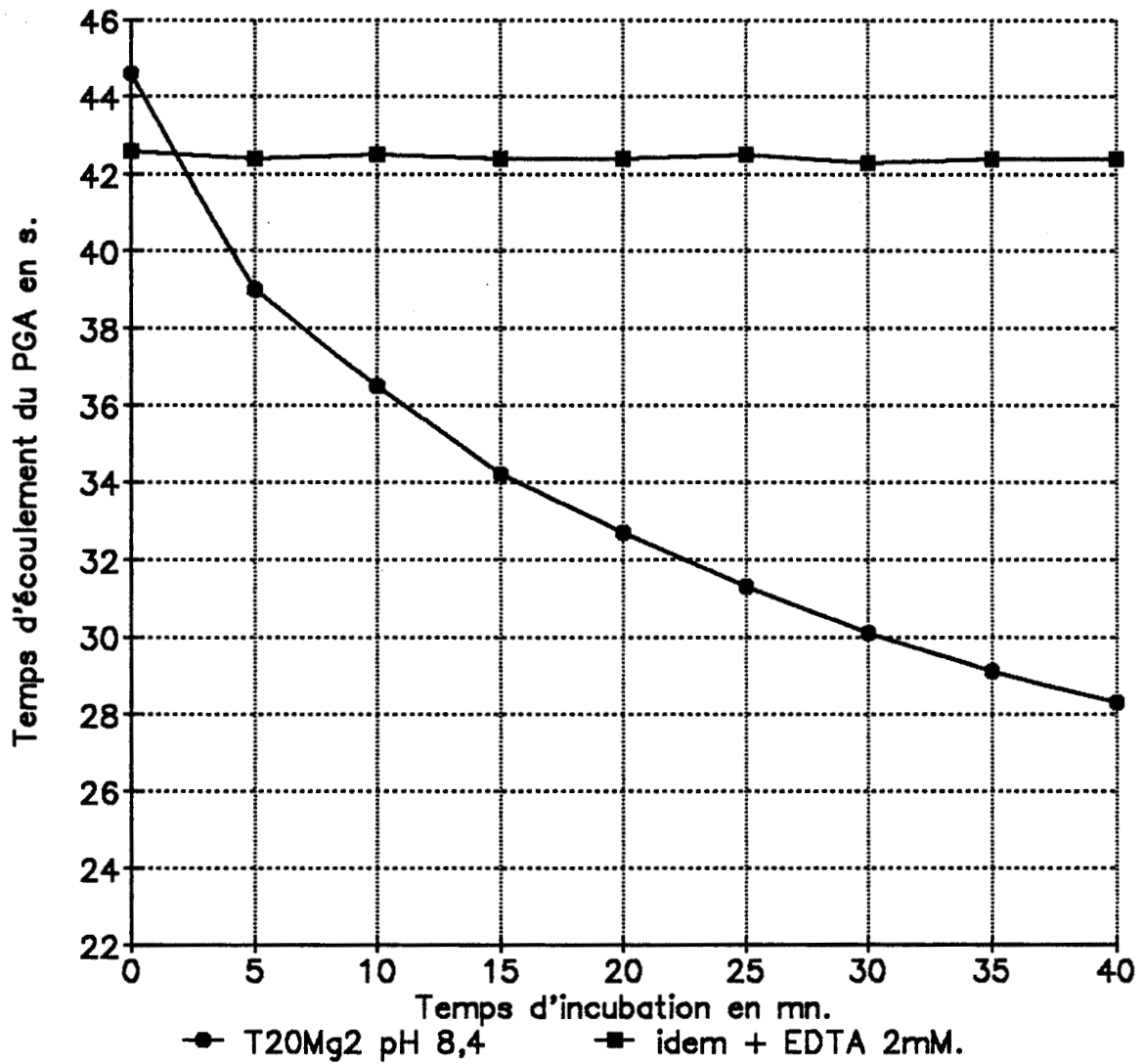


Figure 20. Mode d'action de la pectate lyase déterminé par mesure de la réduction de viscosité d'une solution tamponnée de PGA à 1% et sur la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217.

tous les cas, le pH optimum est de 5,0, ce qui s'approche de la valeur déterminée par McCarthy *et al.* et qui est de 5,5 (154). Pour des valeurs inférieures à 5,0, l'activité chute très rapidement (18% d'activité résiduelle à pH 4,5 pour la polygalacturonase présente dans la fraction membranaire). Par contre, pour des valeurs supérieures à 5,0, la perte d'activité est progressive et l'enzyme conserve encore 50% de son activité à pH 7,0 (Figure 21).

2.3.3 - Température optimale.

Évaluée dans le tampon citrate de sodium 50 mM, EDTA 10 mM pH 5,0 après dosage des sucres réducteurs libérés lors de la réaction d'hydrolyse. Les deux fractions ont été testées sur une gamme de températures comprises entre 30 et 60°C. Dans les deux cas, on observe un pic d'activité bien marqué à 50°C (Figure 22).

Cependant, l'enzyme n'est pas stable à cette température puisqu'après 20 mn d'incubation à 50°C, on enregistre une activité résiduelle de 5% et de 17% pour les enzymes présentes respectivement au niveau des fractions cyto-périplasmique et membranaire (Voir figure 23).

2.3.4 - Influence des ions divalents.

Elle a été testée sur les fractions cyto-périplasmique et membranaire pour les ions Ca^{++} et Mg^{++} en utilisant le tampon citrate de sodium 50 mM pH 5,0 complété en ions Ca^{++} pour des concentrations variant de 0,1 à 1 mM, ou Mg^{++} (0,1 à 5 mM), avec un témoin sans ions ou avec EDTA 10 mM en concentration finale. Aucune variation significative de la D.O n'a été observée quelle que soit la concentration utilisée en Ca^{++} ou Mg^{++} , en comparaison avec le témoin sans ions ou EDTA. Les ions Ca^{++} , tout comme les ions Mg^{++} , n'exercent donc aucun effet activateur sur la polygalacturonase présente au niveau des fractions cyto-périplasmique et membranaire. Constatation qui a également été faite par McCarthy *et al.* (154).

2.3.5 - Mode d'action.

Déterminé dans une solution de PGA à 1% préparée dans le tampon citrate de sodium 50 mM, EDTA 10 mM pH 5,0 sur la polygalacturonase présente au niveau de la fraction membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217. Lorsque l'on ajoute l'équivalent de 0,6 nanokatal* (150 μl de fraction) aux 15 ml de tampon, la viscosité diminue de 6% en 24 h. A l'issue de cette période d'incubation à 37°C, nous avons effectué un dosage de sucres réducteurs et il s'avère que cette très faible diminution (6%) s'accompagne de la libération d'une quantité importante de sucres réducteurs : 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Si l'on compare ce chiffre à celui obtenu dans le

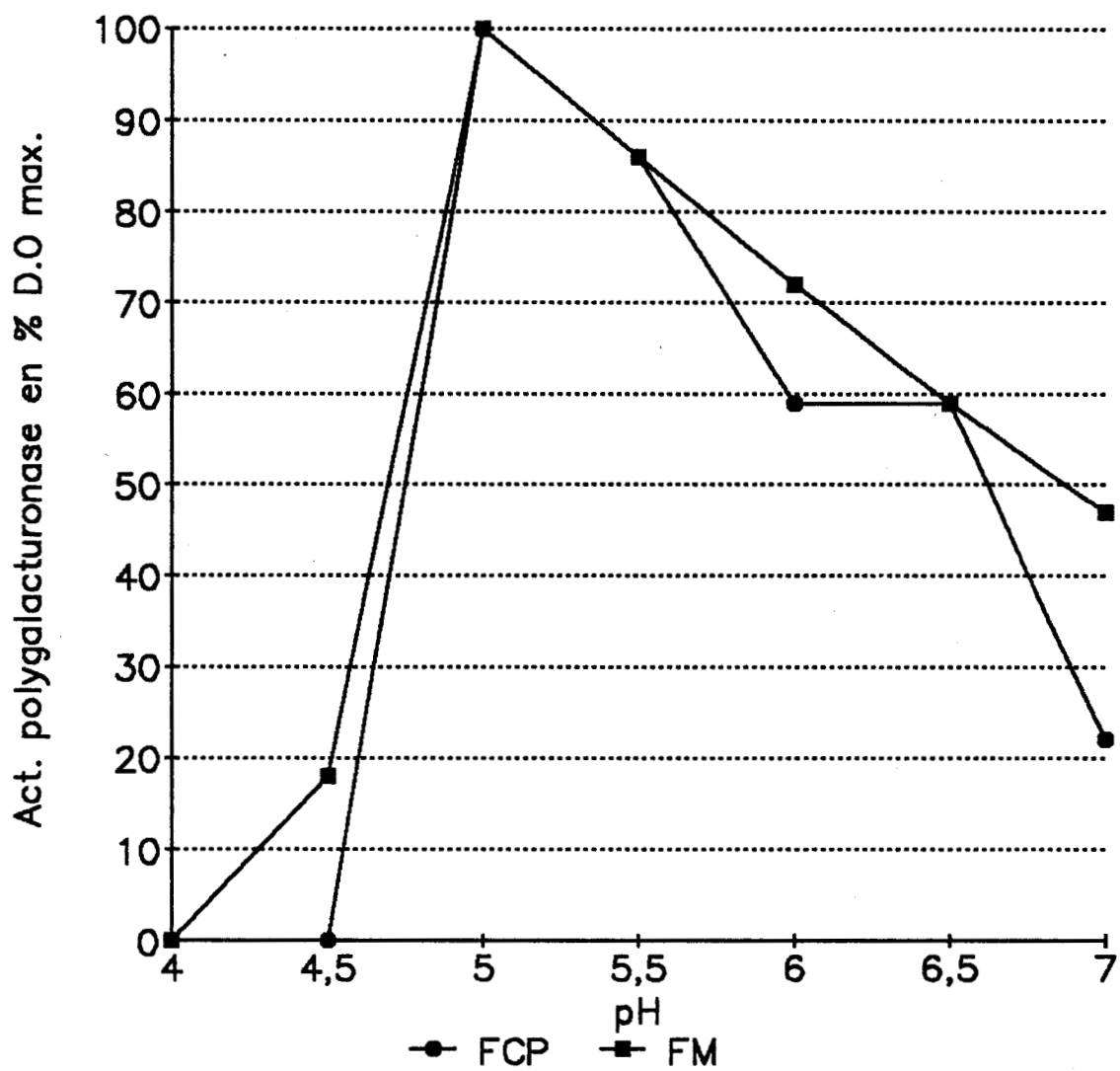


Figure 21. pH optimum de l'activité polygalacturonase contenue dans les fractions cytopériplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217. Activité mesurée dans le tampon citrate de sodium 50 mM et pour une densité optique de 700 nm (dosage des sucres réducteurs).

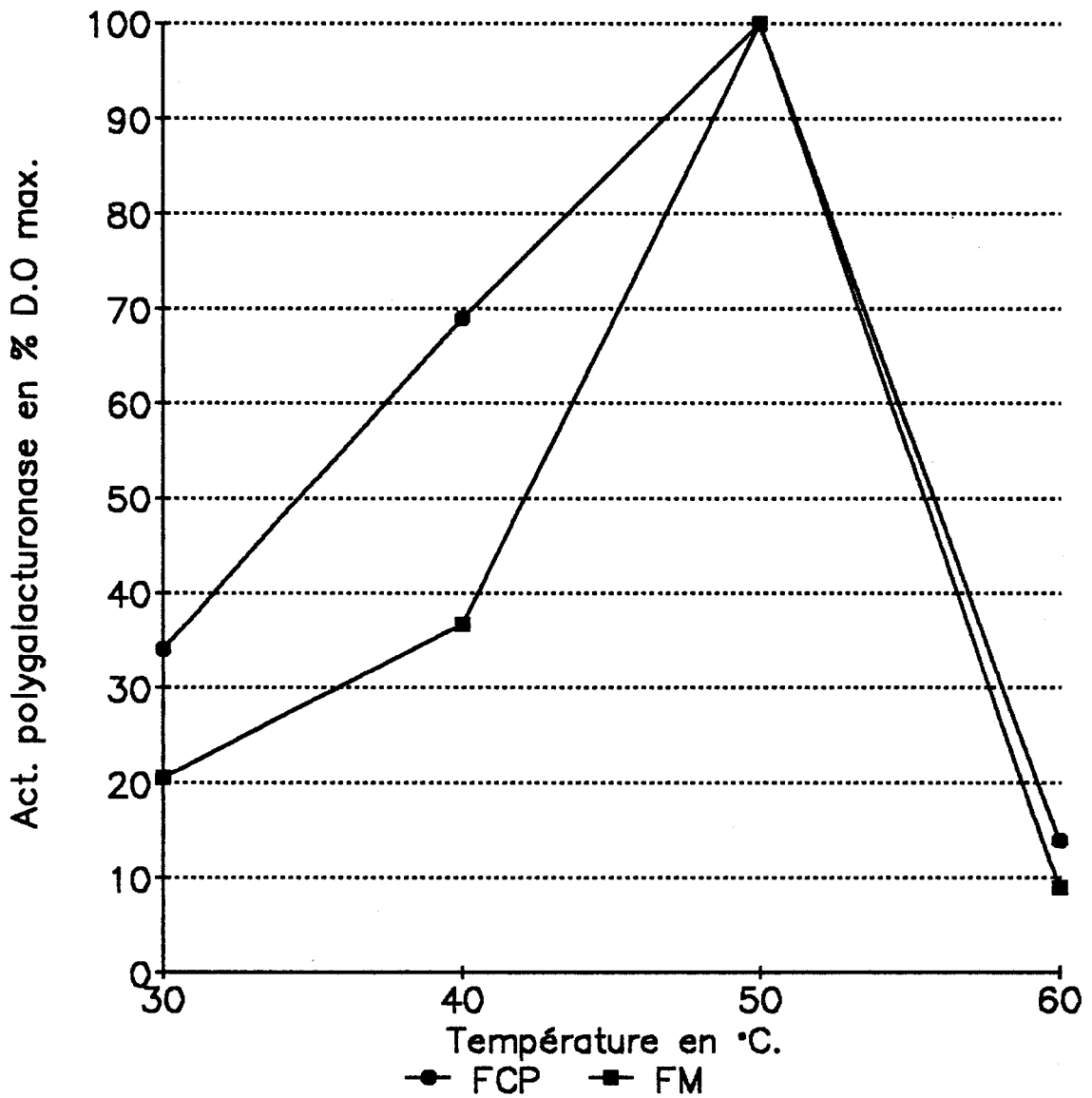


Figure 22. Température optimale de l'activité polygalacturonase présente au niveau des fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217. Activité mesurée dans le tampon citrate de sodium 50 mM pH 5,0 et pour une densité optique de 700 nm (dosage des sucres réducteurs).

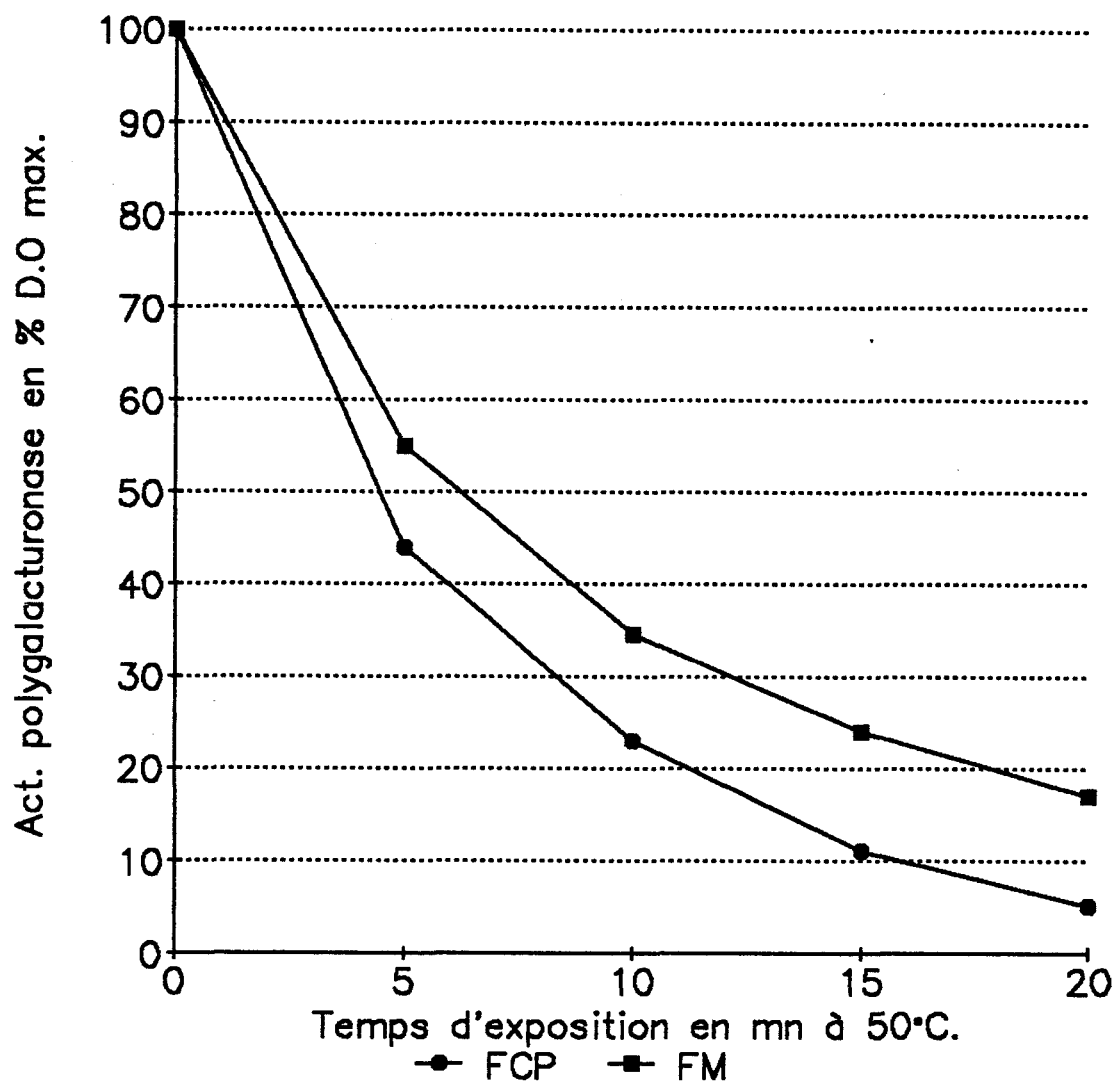


Figure 23. Thermostabilité à 50°C de l'activité polygalacturonase présente au niveau des fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche *B. thetaiotaomicron* 217. Activité mesurée dans le tampon citrate de sodium 50 mM pH 5,0 et pour une densité optique de 700 nm (dosage des sucres réducteurs).

cas de la pectate lyase qui est de 89 $\mu\text{g/ml}$ de sucres réducteurs formés à 50% de diminution de viscosité, on peut en déduire qu'il s'agit d'une activité de type exo.

* Rappel : 1 nanokatal correspond à la formation d'une nanomole de sucres réducteurs par seconde.

2.3.6 - Conservation.

Même observation que pour la pectate lyase, à savoir une excellente conservation à -20°C, quelles que soient les fractions testées (cyto-périplasmique ou membranaire).

2.4 - SUBSTRATS INDUCTEURS DE CES ACTIVITES.

Aucune des trois activités n'a pu être détectée lorsque la souche est mise en culture en milieu de Caspari et Macy additionné de glucose ou d'acide galacturonique.

Par contre, lorsque la souche est cultivée sur pectine ou polygalacturonate, les trois activités sont présentes. Dans ce cas, la répartition cellulaire ainsi que les niveaux d'activités sont semblables.

2.5 - CONCLUSION.

La souche *B. thetaiotaomicron* 217 possède donc trois types d'activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des pectines. La pectate lyase est essentiellement cyto-périplasmique contrairement à la polygalacturonase qui est associée aux membranes, la pectine méthylestérase étant retrouvée au niveau des trois fractions (surnageant, FCP et FM). Les pectate lyase et polygalacturonase ont des pH optimum très différents, des modes d'action différents (endoPL et exoPG), des températures optimales d'action identiques mais une thermostabilité différente pour cette température optimale d'action et les ions divalents (Ca^{++} et Mg^{++}) ont un effet activateur sur la pectate lyase. D'autre part, les activités pectate lyase et polygalacturonase présentes au niveau des fractions cyto-périplasmique ou membranaire, bien qu'ayant des températures optimales d'action et des pH optimum identiques, ont des comportements différents vis-à-vis de la température, de la thermostabilité, du pH et de l'influence des ions divalents. Ces différences s'expliquent vraisemblablement par la localisation qu'occupent ces enzymes. L'ensemble des résultats obtenus figure sur le tableau 7. La souche 217 a donc été retenue pour la fabrication des banques d'ADN en vue du clonage d'un ou des gènes responsables de ces activités.

	PECTATE LYASE	POLYGALACTURONASE	PECTINE METHYLESTERASE
Mode d'action	β -élimination ENDO	hydrolyse EXO	dé-estérification
Localisation après 17 h de culture sur CM + PGA 0,5%	* FCP : 61% membranaire : 33% surnageant : 6%	membranaire : 67% FCP : 33% surnageant : 0%	tous les compartiments
pH optimum	8,4	5,0	non déterminé
Température optimale	50°C thermostable	50°C thermolabile	non déterminé
Effet des ions Ca ⁺⁺ et Mg ⁺⁺	activateurs EDTA : -	sans effet	non déterminé
Principaux inducteurs	pectine et PGA	pectine et PGA	pectine et PGA
Milieux de détection	PGA, Ca ⁺⁺ ou Mg ⁺⁺ pH 8,4	PGA, EDTA, pH 5,0	pectine, BBT, pH 7,0 faiblement tamponné

Tableau 7. Caractéristiques biochimiques des pectinases produites par *B. thetaiotaomicron* 217. * Activité mesurée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4.

3 - MISE EN PLACE DE BANQUES D'ADN GENOMIQUE.

3.1 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE pBR322.

3.1.1 - Préparation du vecteur.

Le vecteur pBR322 porte deux marqueurs signalant sa présence dans la souche réceptrice; il s'agit des gènes impliqués dans la résistance à la tétracycline et à l'ampicilline. Un site *Bam*HI unique est localisé à l'intérieur du gène de résistance à la tétracycline, ce qui signifie que l'insertion d'un gène étranger au niveau de ce site entraîne l'inactivation de ce gène rendant la souche réceptrice du vecteur sensible à la tétracycline. La sélection des transformants s'effectue donc sur milieu gélosé additionné d'ampicilline. Ces transformants sont alors contre sélectionnés pour la sensibilité à la tétracycline, ce qui permet de mettre en évidence les transformants recombinants; autrement dit, les souches qui ont reçu soit (a) un vecteur hybride, soit (b) un vecteur ayant subi une délétion au niveau du gène de résistance à la tétracycline.

Le pBR322 porté par la souche *E. coli* HB101 a été extrait par la méthode de Ish-Horowicz et Burke (110) décrite au § 4.2.1 du chapitre Matériels et Méthodes. Le plasmide a alors été linéarisé par *Bam*HI et déphosphorylé de façon à éviter que le vecteur ne se recircularise spontanément avant ligature.

3.1.2 - Préparation des fragments d'ADN génomique.

L'ADN génomique a été extrait de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 par la méthode de Dhaese *et al.* (53). Cet ADN a alors été digéré partiellement par *Sau*3AI, et les fragments dont la taille est comprise entre 6 et 12 kb ont été isolés par électroélution sur gel d'agarose à 0,8%. Les fragments d'ADN électroélués ont ensuite été passés sur colonne DEAE de purification (mini-colonnes Schleicher et Schüll), précipités à l'acétate d'ammonium 7,5 M, puis repris dans un volume réduit d'eau distillée.

3.1.3 - Ligature.

Les fragments d'ADN ont été ligaturés au pBR322, les rapports de ligature vecteur/ADN étant de 1/5, c'est-à-dire :

* 2,5 μg d'ADN 217 (40 μl)(fragments compris entre 6 et 12 kb) + 0,5 μg de pBR322 (25 μl) + 2 μl d'ADN ligase (2 unités) + 16,7 μl de tampon ligase x 5, pour un volume total de ligature de 84 μl .

Nota : Les extrémités engendrées lors de la digestion de l'ADN génomique par *Sau3AI* sont compatibles avec celles résultant de la digestion du vecteur par *BamHI*, puisque la séquence reconnue par ces deux enzymes est la même à deux nucléotides près : *Sau3AI* = NGATCN et *BamHI* = GGATCC.

3.1.4 - Transformation.

Le mélange de ligature a servi à transformer la souche d'*E. coli* HB101 Sm^r. Les bactéries issues de la transformation ont été étalées, à raison de 100 μl par boîte, en milieu de Luria contenant de la streptomycine à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et de l'ampicilline à 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en concentration finale. Après 24 h d'incubation à 37°C, nous avons dénombré 3220 transformants sur un total de 100 boîtes pour la souche transformée avec l'ADN 217 ligaturé au pBR322. Des numérations ont été réalisées sur milieu de Luria contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine, ce qui a permis de calculer la fréquence de transformation qui est environ de 10^{-7} . D'autre part, connaissant la quantité d'ADN utilisée pour la transformation, il a été possible d'exprimer l'efficacité de la transformation en terme de nombre de transformants par μg d'ADN, ce nombre est de $4,4 \times 10^3$ transformants/ μg d'ADN.

Ces transformants ont été repiqués sur milieu de Luria additionné d'ampicilline (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de streptomycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et sur le même milieu contenant en plus de la tétracycline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cette contre-sélection a permis de mettre en évidence 2000 clones Tc^S (62,1%). Onze clones Ap^r Tc^S ont été sélectionnés au hasard et passés en lyse directe. Huit clones parmi les 11 testés sont des recombinants réels (73% de recombinants), les autres possèdent un vecteur délété au niveau du gène de résistance à la tétracycline (Photo de lyse directe en figure 24).

3.1.5 - Recherche de transformants recombinants pectinolytiques.

Le milieu utilisé devait permettre de mettre en évidence les souches d'*E. coli* portant un gène impliqué dans une activité de dépolymérisation du polygalacturonate ou de la pectine

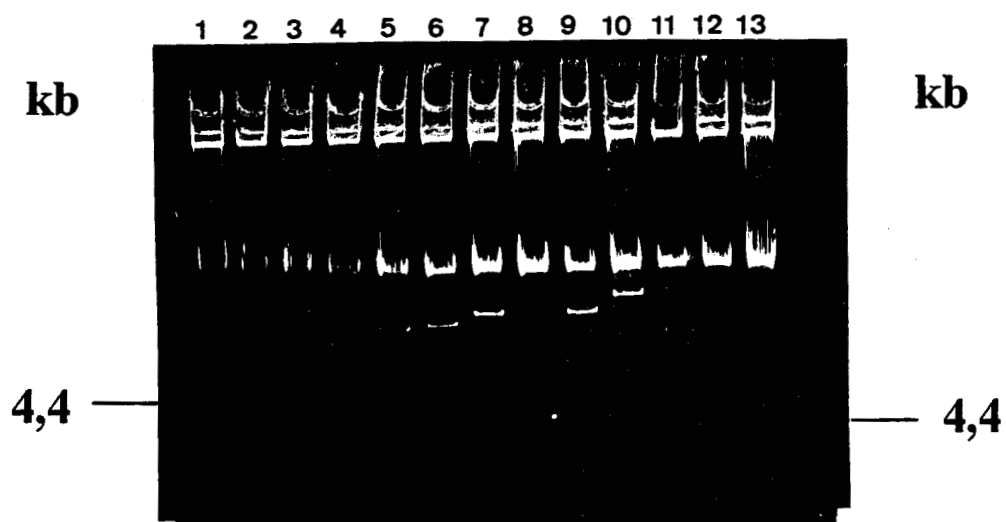


Figure 24. Analyse du contenu plasmidique des clones d'*E. coli* HB101 ($Ap^r Tc^S$) issus de la banque génomique réalisée dans le pBR322, par lyse directe en gel d'agarose à 0,8%. Puits 1 et 13: témoin *E. coli* HB101(pBR322); et 2 à 12: clones d'*E. coli* HB101 ($Ap^r Tc^S$).

(activités pectate lyase ou polygalacturonase).

Les souches d'*E. coli* HB101 Sm^r, Ap^r et Tc^S ont été repiquées sur milieu YC gélosé à 1,5% + Ap₈₀ contenant 0,5% de pectine de citron ou de polygalacturonate. Les boîtes ont alors été incubées en aérobiose pendant 72 h ou anaérobiose pendant 144 h (*E. coli* se développe très lentement dans ces conditions), puis recouvertes par une solution saturée d'acétate de cuivre ou de CTAB à 1%.

Aucun halo de clarification, correspondant à l'hydrolyse du substrat, n'a pu être mis en évidence sur les 2000 transformants Tc^S testés (vraisemblablement 1500 recombinants réels); le nombre de clones était suffisant pour avoir une probabilité de 95% de cloner une séquence d'ADN particulière en admettant que la taille du génome de *Bacteroides* soit comparable à celle d'*E. coli* (4,2 x 10⁶ pb), et que la taille moyenne des fragments d'ADN insérés sur le vecteur soit de 8,0 kb.

Nota : La formule permettant de calculer le nombre de clones recombinants (N) nécessaire pour avoir une probabilité p de cloner une séquence d'ADN particulière étant la suivante : $N = \ln(1-p)/\ln(1-x/y)$, où x est la taille moyenne des fragments insérés sur le vecteur et y la taille du génome de la souche utilisée pour réaliser la banque d'ADN.

3.1.6 - Conclusion.

Cette absence de réponse pouvait être due à un certain nombre de facteurs tels que :

- absence d'expression chez *E. coli* des gènes de *Bacteroides* impliqués dans la dégradation des pectines;
- localisation intracellulaire (cytoplasmique ou périplasmique) des produits des gènes synthétisés par *E. coli* rendant leur mise en évidence difficile;
- faible sensibilité du milieu de détection;
- existence d'un nombre important de sites Sau3AI localisés au niveau des gènes codant pour les pectinases de *Bacteroides*;

Toutes ces éventualités ont fait qu'il a fallu revoir notre stratégie de clonage au niveau du choix du vecteur notamment. Il nous a semblé plus judicieux d'utiliser un cosmide (le pH_{C79}), ce type de vecteur permettant de cloner des fragments de grande taille (20 à 40 kb). Ceci devait permettre de limiter le nombre de clones nécessaires pour avoir une représentation complète du génome de la souche et d'être assuré de cloner l'ensemble du (ou des) gène(s) avec leur système de régulation. De plus, un certain nombre d'auteurs ont utilisé avec succès ce cosmide, pour cloner des pectinases provenant de divers genres bactériens (124,260,278,285).

3.2 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE pHC79.

3.2.1 - Préparation du vecteur.

Le pHC79 est un vecteur de 6,4 kb contenant les gènes impliqués dans la résistance à la tétracycline et à l'ampicilline ainsi que les extrémités Cos du bactériophage lambda. Ici, l'insertion des fragments d'ADN exogènes s'effectue au niveau du site *Bam*HI situé dans le gène de résistance à la tétracycline comme dans le cas du pBR322. Après digestion par *Bam*HI, le vecteur est déphosphorylé puis précipité à l'acétate d'ammonium et repris dans un volume réduit d'eau distillée.

3.2.2 - Préparation des fragments d'ADN génomique.

L'ADN génomique a été extrait de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 par la méthode de Dhaese *et al.* (53). Cet ADN a alors été digéré partiellement par *Sau*3AI et les fragments dont la taille est comprise entre 14 et 30 kb ont été isolés par électroélution sur gel d'agarose à 0,6%. Les fragments d'ADN électroélués ont ensuite été passés sur colonne DEAE de purification, précipités à l'acétate d'ammonium 7,5 M et repris dans un volume réduit d'eau distillée.

3.2.3 - Ligature et transduction.

Les fragments d'ADN ont été ligaturés au pHC79 selon le rapport de ligature suivant : 8 μ g d'ADN 217 (40 μ l) + 2 μ g de pHC79 (10 μ l) + 1 μ l de ligase + 1/4 de vol. de tampon ligase x 5 (12 μ l), pour un volume total de ligature de 63 μ l.

Le protocole qui a été suivi est décrit dans le § 6.2 du chapitre Matériels et Méthodes. La souche d'*E. coli* HB101 a été utilisée pour la transduction. Les bactéries transduites ont alors été étalées sur milieu de Luria gélosé, contenant de la streptomycine (50 μ g/ml) et de l'ampicilline (80 μ g/ml), les numérations ont été réalisées sur Luria gélosé additionné de streptomycine à 50 μ g/ml.

Après 24 h d'incubation à 37°C, on a dénombré 730 colonies Sm^r et Ap^r et pour les numérations 66 colonies à la dilution 10⁻⁷, ce qui donne une fréquence de transduction très faible de 3,4 x 10⁻⁸ et une efficacité de transduction de 730 transductants/ μ g d'ADN. Ces transductants ont été contre-sélectionnés sur Luria gélosé contenant 50 μ g/ml de streptomycine et 20 μ g/ml de tétracycline, ce qui a permis de mettre en évidence 715 transductants recombinants Sm^r, Ap^r et Tc^s (98%).

3.2.4 - Recherche de transductants recombinants pectinolytiques.

Les milieux sélectifs utilisés sont les mêmes que ceux qui ont servi pour les clones recombinants portant le pBR322, à savoir : les milieux YC gélosés additionnés de streptomycine (50 µg/ml), d'ampicilline (80 µg/ml) et de polygalacturonate ou de pectine à 0,5%. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 96 h, un lot de colonies a alors été traité aux vapeurs de chloroforme, puis les boîtes ont été recouvertes de CTAB à 1%. Dans tous les cas, que les colonies soient traitées ou non aux vapeurs de chloroforme, aucun halo de clarification n'a pu être observé après traitement au CTAB, bien que le nombre de transductants analysés soit suffisant pour avoir une probabilité de 98,6% de cloner la séquence d'ADN recherchée.

3.2.5 - Conclusion.

Les résultats obtenus avec le pBR322 et le pH79 nous ont conduits à nous interroger sur la localisation chez *E. coli* d'une éventuelle activité clonée. En effet, la plupart des pectinases de *Erwinia*, *Yersinia* et *Pseudomonas* clonées chez *E. coli* sont localisées au niveau de l'espace périsplasmique (12,43,92,124, 125,135,148,185,190,214,255,285) alors qu'elles sont extracellulaires chez la souche de départ. De plus, les cellulases et xylanases qui sont extracellulaires chez *F. succinogenes* deviennent périsplasmiques chez *E. coli* (49,109,234).

En ce qui concerne ce problème de localisation chez *E. coli*, un vecteur phagique paraissait être le vecteur de clonage le plus approprié, puisqu'à l'issue du processus d'infection, il permettait d'obtenir une lyse des bactéries infectées et par là-même, une libération d'une activité clonée, rendant sa détection plus aisée. De plus, les vecteurs phagiques présentent de nombreux avantages tels que la taille des inserts (9 à 23 kb), l'efficacité de transduction, la stabilité de la banque dans le temps ainsi que celle du vecteur.

De ce fait, nous avons réalisé une troisième banque génomique dans le vecteur phagique lambda EMBL3.

3.3 - BANQUE GENOMIQUE REALISEE AVEC LE VECTEUR lambda EMBL3.

3.3.1 - Préparation du vecteur.

Les caractéristiques de ce vecteur sont données au § 2.1.3 du chapitre Matériels et Méthodes. Le vecteur est digéré totalement par *EcoRI* et *BamHI*, puis précipité avant d'être déphosphorylé. Les fragments *EcoRI-BamHI* de faible poids moléculaire, qui sont formés lors de la digestion, ne précipitent pas avec le vecteur, ce qui permet de les éliminer. Autrement dit,

après la précipitation, il y a très peu de chance pour que la région moyenne se réassocie aux deux bras du vecteur puisque les extrémités en présence (*EcoRI* pour la région moyenne et *BamHI* pour les bras du vecteur) ne sont pas complémentaires, ce qui évite d'électroéluer les bras du vecteur.

3.3.2 - Préparation des fragments d'ADN génomique.

L'ADN génomique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 a été digéré partiellement par *Sau3AI*, et les fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 12 et 23 kb ont été isolés par électroélution sur gel d'agarose à 0,8%. Les fragments d'ADN électroélués ont ensuite été passés sur colonne DEAE de purification, précipités à l'acétate d'ammonium 7,5 M et repris dans un volume réduit d'eau distillée.

3.3.3 - Ligature et transfection.

Pour la ligature, nous avons utilisé un rapport vecteur/ADN génomique de 1 mole/2 moles c'est à dire 0,75 μg de vecteur (1,5 μl) pour 0,55 μg d'ADN génomique (8 μl). Nous avons ajouté 1 μl de T_4 DNA ligase et 1 μl de tampon ligase concentré 5 fois. C'est la souche d'*E. coli* LE392 Sm^{r} qui a été retenue pour la transfection.

Le protocole précis de transfection qui a été utilisé est détaillé dans le § 6.3 du chapitre Matériels et Méthodes.

Les bactéries ayant subi la transfection ont été incorporées dans de la gélose molle contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine, puis coulées sur gélose nutritive contenant également 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine (Voir § 3.2.5 du chapitre Matériels et Méthodes).

Résultat : On observe de très nombreuses plages de lyse aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , avec en moyenne 100 plages de lyse à la dilution 10^{-3} , ceci pour 100 μl d'ADN empaqueté (0,1 μg), ce qui représente 10^6 plages de lyse par μg d'ADN. Chaque plage de lyse correspond à une bactérie infectée par un bactériophage recombinant, c'est-à-dire portant un vecteur hybride. En effet, lors du processus d'empaquetage ce sont des vecteurs d'une taille comprise entre 75 et 105% de celle de l'ADN du bactériophage normal qui sont empaquetés. Ce qui explique que le bruit de fond (vecteurs non recombinés) soit très faible c'est-à-dire de l'ordre de 0,0015%.

3.3.4 - Recherche de bactériophages recombinants pectinolytiques.

Le milieu de détection qui a été mis au point, devait permettre de mettre en évidence de façon directe, (sans avoir recours à l'utilisation d'agents précipitants) une activité de dépolymérisation du polygalacturonate. Ce milieu de détection est constitué d'un gel de

polygalacturonate de magnésium très peu riche en agar (0,4%). En effet, le polygalacturonate, de par sa structure et sa charge électrique globale, forme un gel en présence d'ions divalents tels que les ions Ca^{++} et Mg^{++} . A partir du moment où il est dégradé par une enzyme dépolymérisante, il perd localement sa structure, ce qui se traduit par la formation d'une dépression. En conséquence, le critère d'identification des bactériophages recombinants pectinolytiques est basé sur la présence d'une dépression centrée autour d'une plage de lyse.

* Résultat : une dépression a pu être mise en évidence sur 2000 plages de lyse observées sous éclairage oblique. De plus, après précipitation à l'acétate de cuivre, un halo est nettement visible autour de la plage de lyse présentant le phénotype pectinolytique (Figures 25 A et B). Nous avons de plus remarqué que l'acétate de cuivre renforçait la taille des dépressions, ce qui nous a permis de mettre en évidence 3 autres plages de lyses présentant une légère dépression associée à la présence d'un halo. Dépressions qui étaient passées inaperçues lors de l'observation sous éclairage oblique. Malheureusement, ces 3 clones recombinants n'ont pas pu être ré-isolés puisque détruits par l'acétate de cuivre.

Nota : Les caractéristiques et les résultats obtenus avec les différents vecteurs utilisés figurent sur le tableau 8.

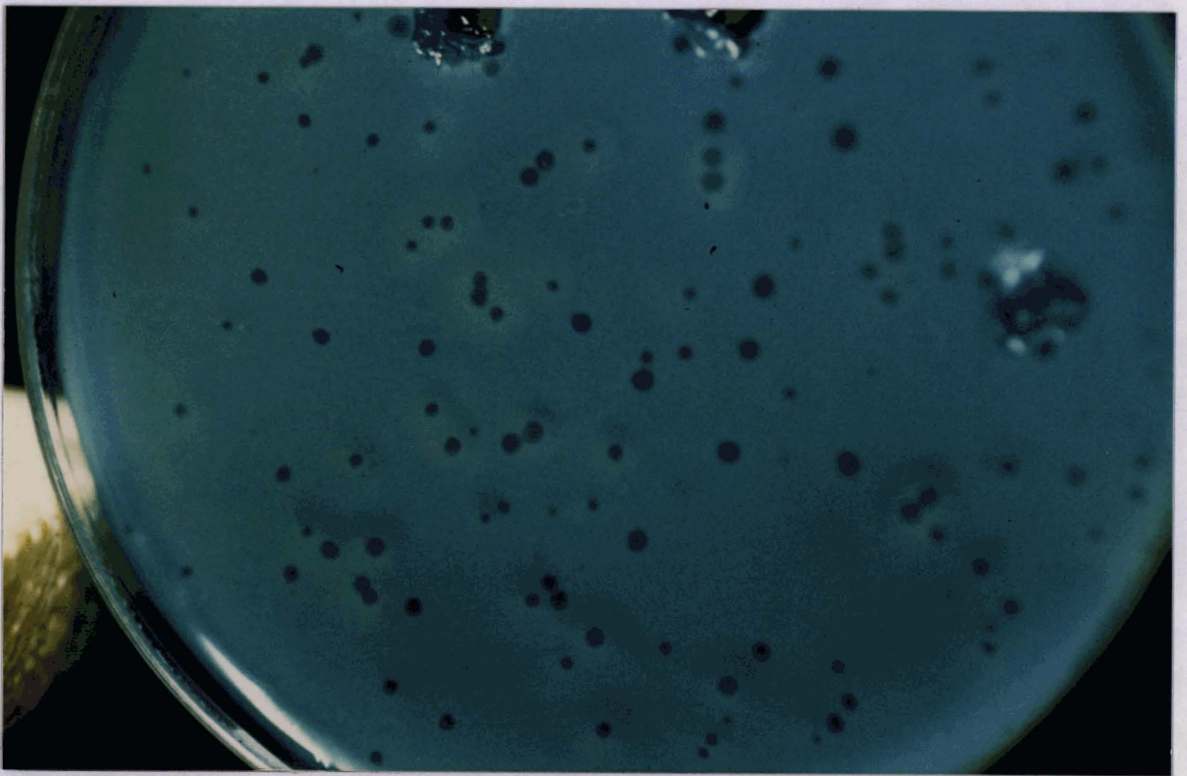
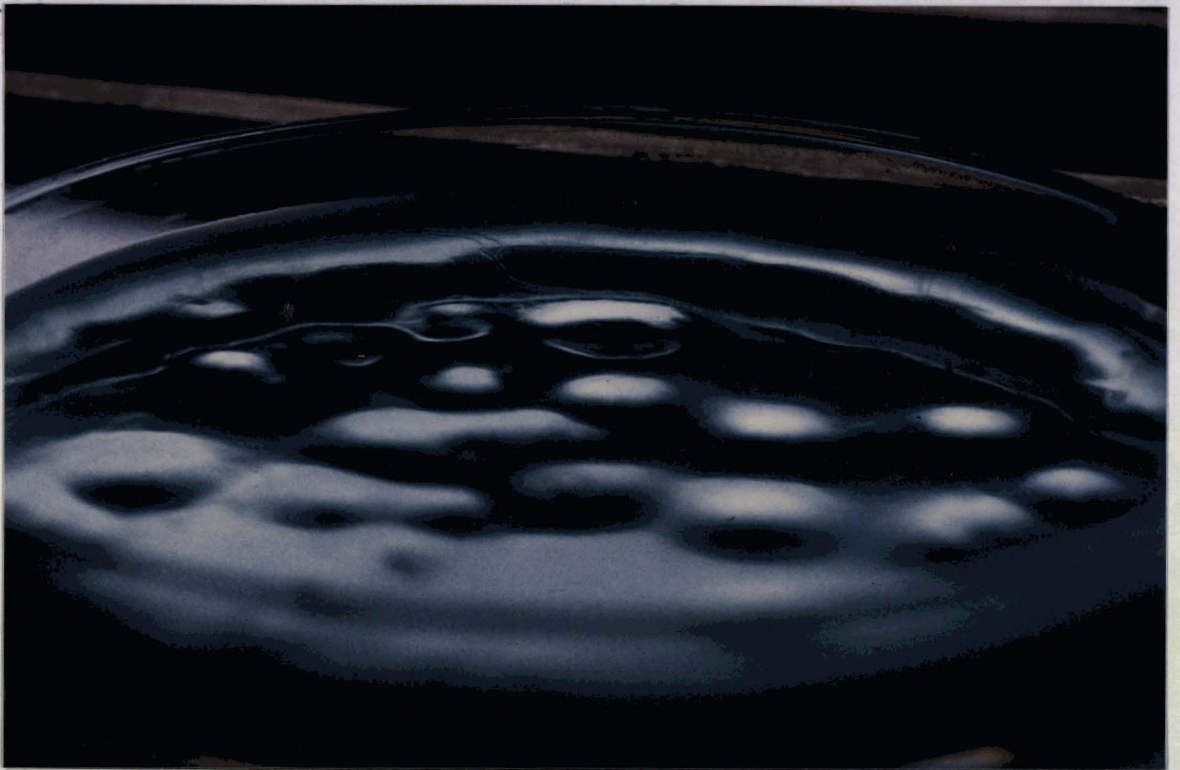
A**B**

Figure 25. Dépressions observées sur gel de polygalacturonate de magnésium autour des plages de lyse dues au bactériophage recombinant pectinolytique et renforcées après traitement à l'acétate de cuivre à 10%. Observation réalisée sous deux angles différents (A et B).

	pBR322	pHC79	Lambda(EMBL3)
Type	plasmide (4,4 kb)	cosmide (6,4 kb)	phagique (42,4 kb)
Marqueur de sélection	ampicilline	ampicilline	phénotype spi
Site d'insertion	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI
Taille des inserts	6 à 12 kb	14 à 30 kb	12 à 23 kb
Nb de transformants par µg d'ADN	10 ³	6 × 10² 700	10 ⁶
Stabilité du vecteur	moyenne	faible	importante
% de recombinants	62 % (Ap ^r Tc ^s)	98 % (Ap ^r Tc ^s)	100%
Nb de recombinants	# 2000	# 700	# 10 ⁶
Nombre testé	2000	700	2000
Probabilité (%) *	95	98,6	# 100
Nb pectinase +	aucun	aucun	1

Tableau 8. Caractéristiques des différents vecteurs utilisés pour réaliser les banques d'ADN génomique à partir de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 et résultats obtenus. * Probabilité d'avoir cloné une séquence d'ADN particulière.

4 - CARACTERISATION DES ACTIVITES CLONEES.

Le bactériophage recombinant présentant le phénotype pectinolytique a été purifié par une série d'isolements sur gélose molle additionnée de PGA, et le stock de phage obtenu après amplification a servi à infecter une culture d'*E. coli* LE392 en milieu liquide. Après lyse des bactéries obtenue en utilisant des multiplicités d'infection variées, la culture a été centrifugée et des mesures d'activités ont été effectuées au niveau du surnageant. Une activité pectate lyase, associée à une activité pectine méthylestérase, ont été mises en évidence au niveau du surnageant de lyse.

* L'activité pectate lyase a été mise en évidence en mesurant l'augmentation d'absorption à 235 nm consécutive à l'apparition de composés insaturés. Cette activité a été mesurée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 et à partir de surnageants provenant de cultures lysées différemment. Lorsque la lyse est optimale (pour une multiplicité d'infection de 0,1, c'est-à-dire un phage pour 10 bactéries et une D.O avant infection de 0,5), on a une activité pectate lyase de 0,4 U/ml ou 0,1 U/mg, ce qui correspond à la libération de 10 µg de sucres réducteurs par mn et par mg de protéines.

Un spectre d'absorption a été réalisé entre 200 et 800 nm sur les milieux réactionnels provenant de l'incubation de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 et du surnageant de lyse dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4/PGA 0,1%. Entre 270 et 800 nm, l'absorption est nulle et on observe un optimum d'absorption matérialisé par un pic, situé à 236 nm pour le surnageant de lyse et 232 nm pour la fraction cyto-périplasmique de la souche 217 (Figure 26).

* L'activité pectine méthylestérase a été révélée par l'apparition de halos jaunes sur tampon gélosé T20 pH 7,0/pectine 0,5% contenant du BBT à 0,04%, après dépôt sur gel de 5 µl de surnageant de lyse et incubation à 37°C pendant 12 h. Halos relatifs au virage de l'indicateur coloré consécutif à l'acidification du milieu par dé-estérification du substrat (Figure 27 A). Aucune quantification précise n'a été effectuée en ce qui concerne l'activité pectine méthylestérase présente au niveau du surnageant de lyse.

* Aucune activité hydrolase n'a pu être mise en évidence par dosage des groupements réducteurs libérés lors de la réaction d'hydrolyse du PGA. Ici, l'incubation du surnageant de lyse en présence de PGA à 0,1% s'effectue dans le tampon citrate de sodium 50 mM EDTA 10 mM pH 5,0.

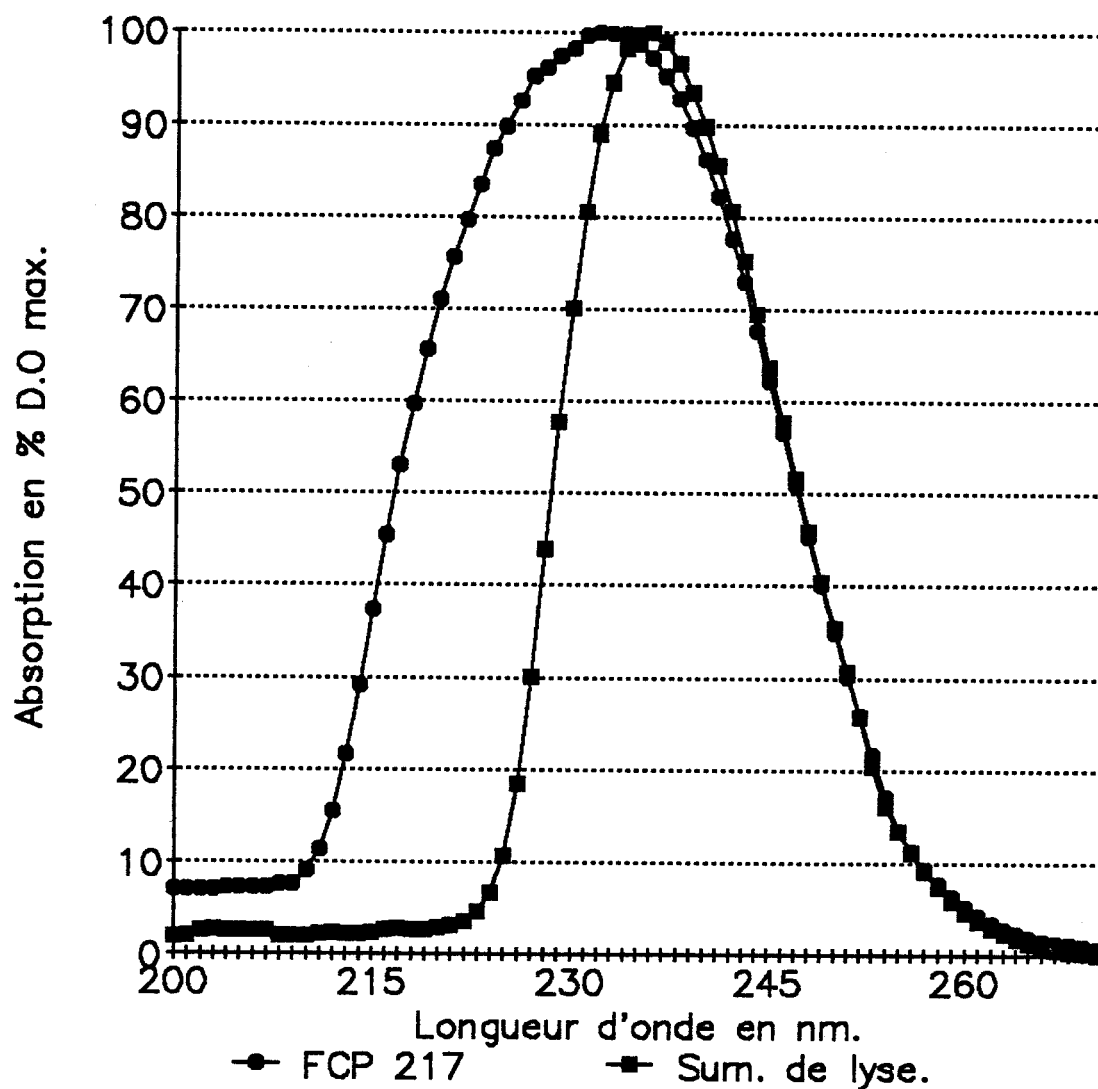


Figure 26. Spectres d'absorption comparés des milieux réactionnels résultant de l'incubation des activités pectate lyase présentes au niveau du surnageant de lyse et de la fraction cyto-périplasmique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4.

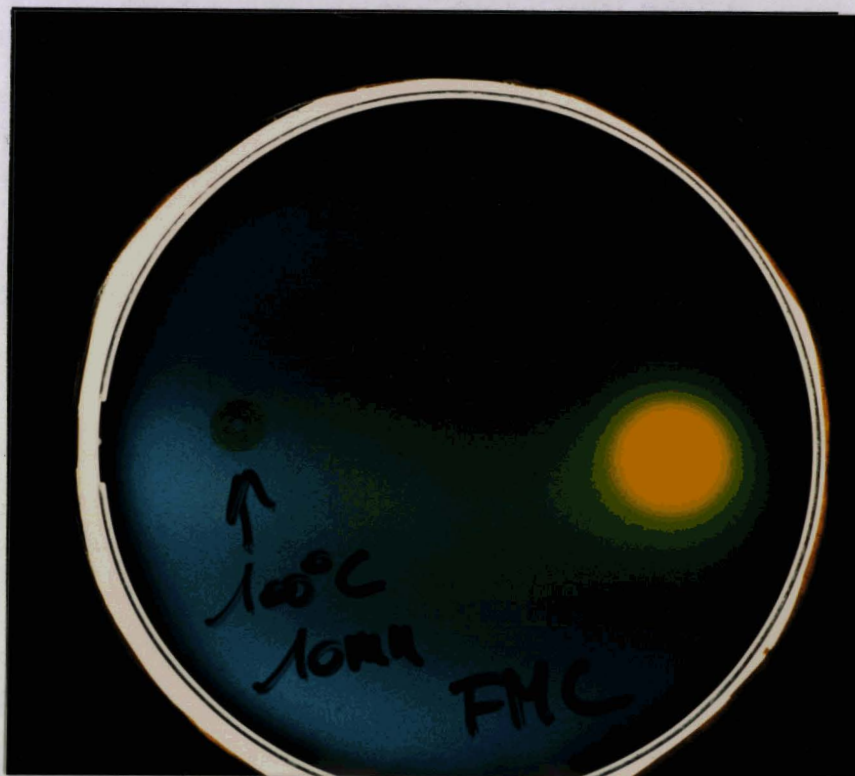
A**B**

Figure 27. Halos jaunes consécutifs à l'acidification de la pectine par action de la pectine méthylestérase en milieu gélosé faiblement tamponné contenant du BBT à 0,04%. A : Mise en évidence de la pectine méthylestérase (PME) présente au niveau du surnageant de lyse; et B: Activité PME associée à l'extrait brut du clone d'*E. coli* pBT1.

De façon à vérifier que les activités détectées provenaient bien du bactériophage recombinant et non de la souche, des mesures d'activités ont été également effectuées sur des surnageants provenant de la lyse de la souche d'*E. coli* LE392 Sm^r par des bactériophages recombinants ne présentant pas le phénotype pectinolytique. Dans tous les cas, aucune activité du type polygalacturonase, pectate lyase et pectine méthylestérase n'a pu être mise en évidence.

5 - CARTE DE RESTRICTION DE L'INSERT.

L'ADN phagique provenant du bactériophage recombinant présentant le phénotype pectinolytique a été extrait selon la technique de Yamamoto *et al.* (281) décrite au § 7.2 du chapitre Matériels et Méthodes. La carte de restriction de l'insert a été élaborée à partir de digestions simples ou doubles du vecteur recombinant par les enzymes de restriction suivantes : *Ava*I, *Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pvu*I, *Pvu*II et *Sal*I (Tableaux 9a et b). La position de certains sites a été précisée ultérieurement, lors du sous-clonage des fragments *Sal*I et *Eco*RI de l'insert dans les vecteurs pDR720, pBR322 et pBR325.

Le vecteur phagique recombinant a dans un premier temps été digéré par *Sal*I de façon à déterminer précisément la taille de l'insert présent sur le vecteur. En effet, les deux sites de restriction *Sal*I du vecteur se trouvent placés aux bordures de l'insert à quelques paires de bases en aval des sites de clonage *Bam*HI, ce qui permet de séparer l'insert de la partie vecteur.

* La digestion de l'ADN par *Sal*I conduit à l'obtention d'un profil de restriction composé de 5 fragments dont :

- deux correspondent aux bras du vecteur phagique (20 kb pour le bras gauche et 9,0 kb pour le bras droit).

- les trois autres sont de 6,4, 5,9 et 0,9 kb et correspondent à l'insert (Figure 28, puits 14 et figure 29, puits 16).

Deux sites de restriction reconnus par *Sal*I sont donc présents à l'intérieur de l'insert dont la taille est de 13,2 kb. Le vecteur phagique recombinant a donc une taille de 42,2 kb contre 42,4 kb pour le lambda EMBL3.

* Par *Eco*RI, on obtient 4 fragments de 21,0; 13,0; 4,5 et 3,7 kb, ce qui indique la présence de trois sites *Eco*RI au niveau de l'insert puisque les deux sites *Eco*RI du vecteur ont été éliminés avec la région moyenne lors de la ligature (Figure 28, puits 7). Un site *Eco*RI se trouve localisé à environ 1 kb du bras gauche du vecteur (21,0 = 20 + 1). De plus, un site *Eco*RI se trouve à environ 4 kb de l'extrémité gauche du bras droit du vecteur (13,0 = 9,0 +

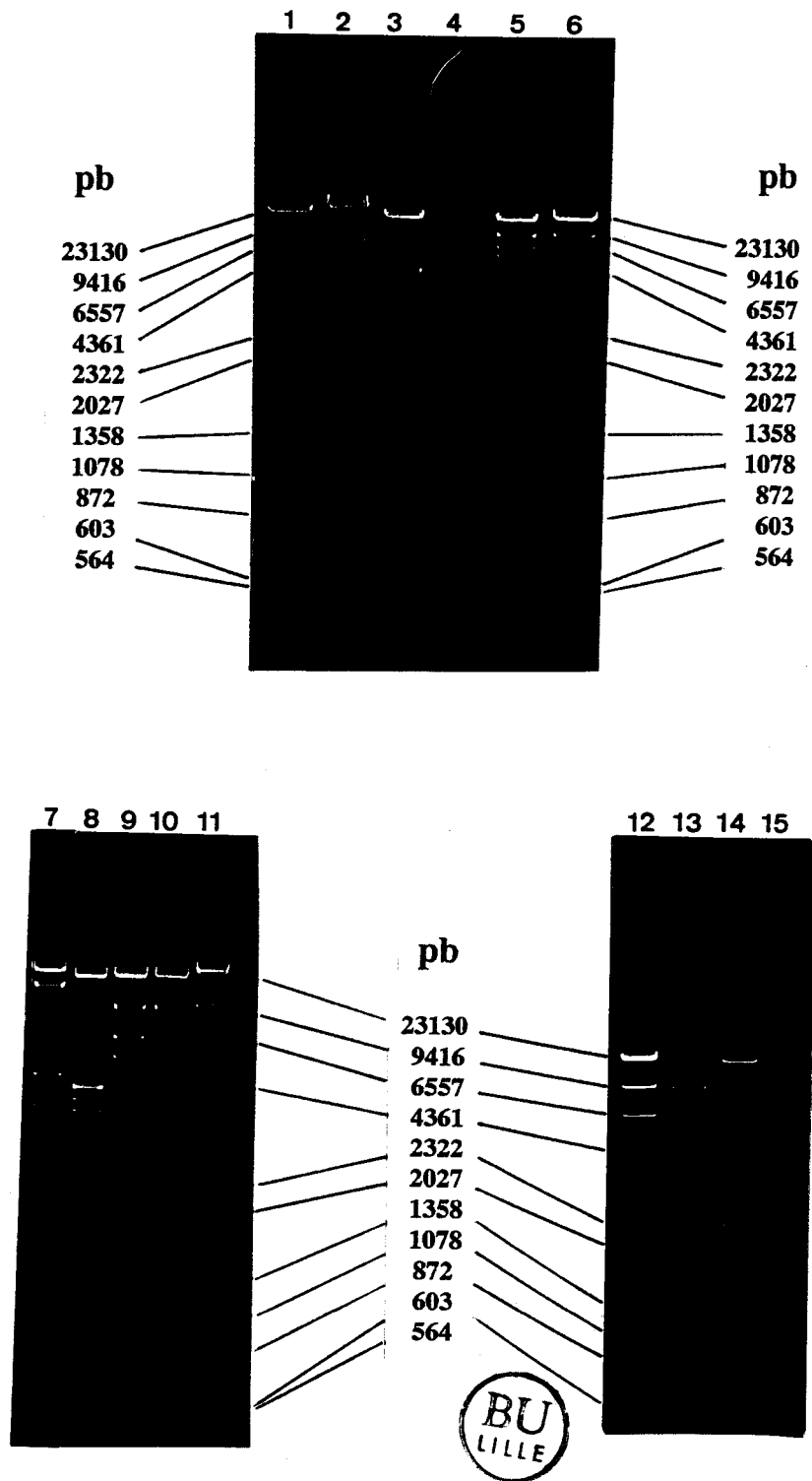


Figure 28. Profils de restriction du vecteur phagique recombinant λ EMBT1. Puits 1, 6, 11 et 12: témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN \emptyset X174 digéré par *Hae*III); 2: λ EMBT1/*Bgl*II; 3: λ EMBT1/*Pvu*II; 4: λ EMBT1/*Sal*I; 5: λ EMBT1/*Sal*I+*Bam*HI; 7: λ EMBT1/*Eco*RI; 8: λ EMBT1/*Pvu*II; 9: λ EMBT1/*Sal*I+*Bam*HI; 10: λ EMBT1/*Sal*I+*Eco*RI; 13: λ EMBT1/*Sal*I+*Pvu*II; 14: λ EMBT1/*Sal*I et 15: λ EMBT1/*Sal*I+*Pst*I.

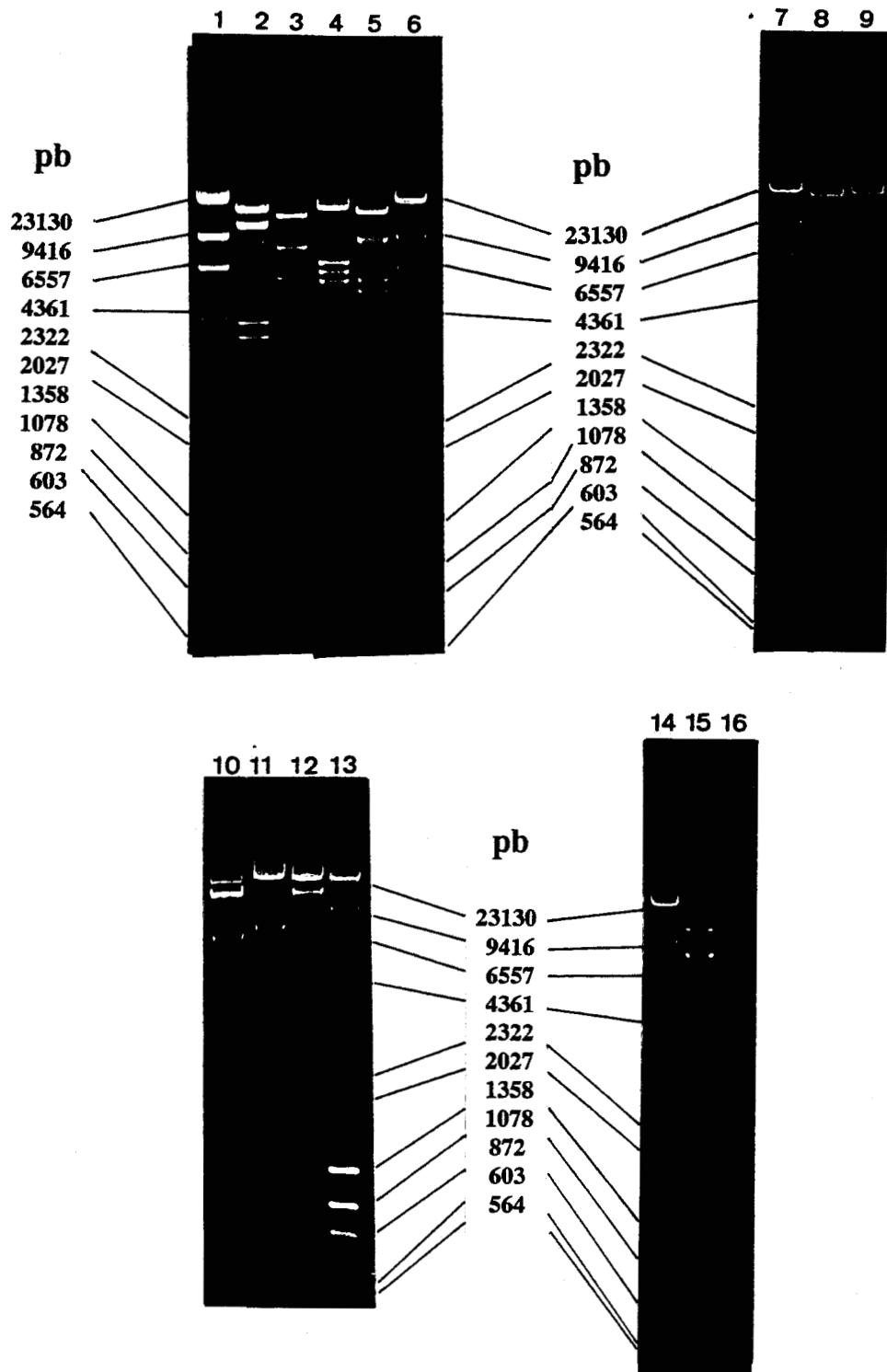


Figure 29. Profils de restriction du vecteur phagique recombinant EMBT1. Puits 1, 6, 7, 13 et 14: témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 2: λ EMBT1/*Cla*I; 3: λ EMBT1/*Hpa*I; 4: λ EMBT1/*Sal*I+*Bgl*II; 5: λ EMBT1/*Sal*I+*Kpn*I; 8: λ EMBT1/*Sal*I+*Hind*III; 9: λ EMBT1/*Hind*III; 10: λ EMBT1/*Kpn*I; 11: λ EMBT1/*Bgl*II; 12: λ EMBT1/*Bam*HI; 15: λ EMBT1/*Sal*I+*Pvu*I et 16: λ EMBT1/*Sal*I.

4,0). Reste un site dont il fallait préciser la position.

* La double digestion par *SaII* et *EcoRI* se traduit par un profil composé de 8 fragments de 20,0; 9,0; 4,0; 3,7; 1,9; 1,7; 1,0 et 0,9 kb, confirmant la présence de 3 sites *EcoRI* répartis au niveau des fragments *SaII* de 6,4 et 5,9 kb de l'insert (Figure 28, puits 10). Avec un site *EcoRI* situé au niveau du fragment de 5,9 kb (4,0 + 1,9) et deux sites *EcoRI* situés sur le fragment de 6,4 kb (3,7 + 1,7 + 1,0). De plus, cette double digestion associée à la digestion par *EcoRI* permet de positionner le troisième site *EcoRI* ainsi que les deux sites *SaII* de l'insert. En effet, par *EcoRI* on obtient un fragment de 13,2 kb qui correspond au bras droit du vecteur associé à un fragment de 4,0 kb provenant du fragment *SaII* de 5,9 kb, ce dernier forme donc l'extrémité droite de l'insert. On obtient également un fragment de 21 kb correspondant au bras gauche du vecteur (20,0 kb) lié à un fragment d'environ 1 kb. Ce dernier ne peut provenir que du fragment *SaII* de 6,4 kb de l'insert puisqu'il n'existe pas de site *EcoRI* à l'intérieur du fragment *SaII* de 0,9 kb. Autrement dit, le fragment *SaII* de 6,4 kb forme l'extrémité gauche de l'insert. En conséquence, le fragment *SaII* de 0,9 kb est situé au centre de l'insert. En résumé, les fragments engendrés par la digestion par *SaII* du vecteur recombinant se succèdent dans l'ordre suivant : 20,0 kb (bras gauche) - 6,4 kb - 0,9 kb - 5,9 kb - 9,0 kb (bras droit).

* La double digestion par *SaII* et *BamHI* entraîne la formation d'un profil caractérisé par la présence de 6 bandes de 20,0; 9,0; 6,4; 5,3; 0,9 et 0,6 kb, ce qui permet de mettre en évidence la présence d'un site *BamHI* localisé à 0,6 kb d'une des extrémités du fragment *SaII* de 5,9 kb (Figure 28, puits 5 et 9).

* Lorsque le vecteur recombinant est digéré par *BamHI*, on obtient un profil composé de deux bandes de haut poids moléculaire (Figure 29, puits 12). Par cette digestion, il est possible de préciser la position du site *BamHI* au niveau du fragment *SaII* de 5,9 kb. En effet, si le site *BamHI* était localisé au niveau de l'extrémité droite de l'insert, la digestion par *BamHI* devrait faire apparaître deux fragments de 32,7 et 9,5 kb ce qui n'est pas le cas. Le deuxième fragment a une taille largement supérieure à 9,7 kb, si l'on en juge par sa position par rapport à la bande de 9,4 kb du témoin lambda digéré par *HindIII*. Le site *BamHI* est donc localisé au niveau de l'extrémité gauche du fragment *SaII* de 5,9 kb. La position de ce site sera confirmée ultérieurement, lors du sous-clonage des fragments *SaII* et *EcoRI* de l'insert.

* La digestion du vecteur recombinant par *SaII* et *KpnI* fait apparaître un profil de restriction constitué de 7 bandes de 17,1; 9,0; 5,9; 5,4; 1,5; 1,0 et 0,9 kb, dont une bande d'intensité double à 1,5 kb, correspondant à la présence de deux fragments de taille égale (Figure 29, puits 5 et figure 30, puits 16). Or il existe deux sites *KpnI* au niveau du bras gauche

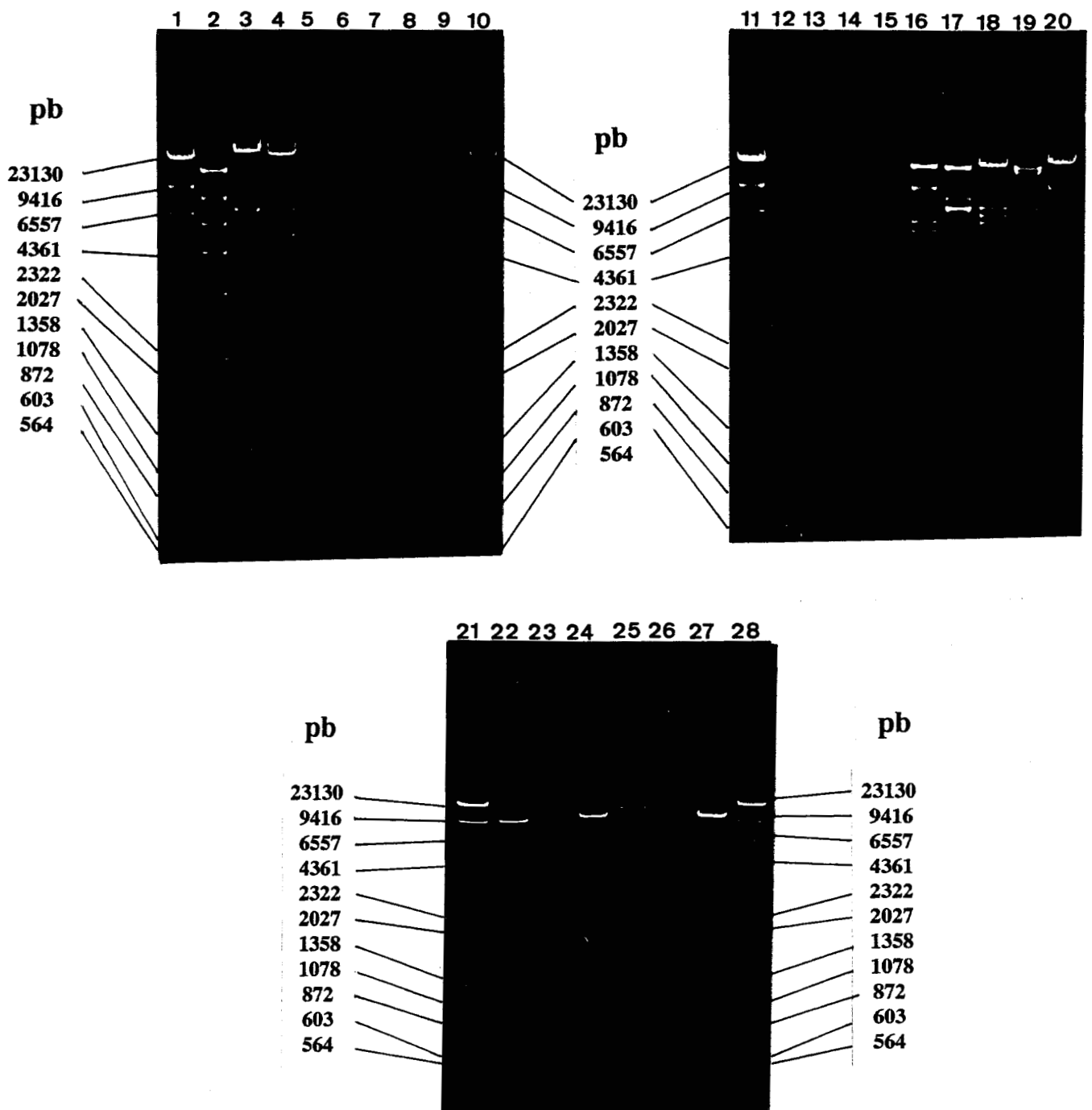


Figure 30. Profils de restriction des vecteurs hybrides λ EMBT1, pBT1, pBT2, pBT3, pBT4 et pBT5. Puits 1, 10, 11, 20, 21 et 28: témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN \emptyset X174 digéré par *Hae*III); 2: λ EMBT1/*Hpa*I; 3: λ EMBT1/*Bgl*II; 4: λ EMBT1/*Bgl*II+*Bam*HI; 5: pBT2/*Pvu*II; 6: pBT3/*Pvu*II; 7: pBT3/*Bam*HI; 8: pBT3/*Bam*HI+*Eco*RI; 9: pBT3/*Eco*RI+*Sal*I; 12: pBT3/*Sal*I+*Kpn*I; 13: pBT3/*Sal*I+*Bgl*II; 14: pBT2/*Sal*I+*Bgl*II; 15: pBT2/*Sal*I+*Kpn*I; 16: λ EMBT1/*Sal*I+*Kpn*I; 17: λ EMBT1/*Bgl*II+*Kpn*I; 18: λ EMBT1/*Sal*I+*Bgl*II; 19: λ EMBT1/*Bam*HI+*Kpn*I; 22: pBT4/*Ava*I; 23: pBT5/*Ava*I; 24: pBT1/*Ava*I; 25: λ EMBT1/*Ava*I; 26: pBT4/*Pst*I et 27: pBT5/*Pst*I.

du vecteur et aucun site au niveau du bras droit, la double digestion se traduit donc par la formation des fragments de 17,1; 9,0; 1,5 et 1,5 kb. Il reste donc 4 fragments provenant de l'insert de 5,9; 5,4; 1,0 et 0,9 kb dont il faut déterminer l'origine. Les bandes situées à 5,9 et 0,9 kb correspondent aux fragments obtenus par simple digestion par *SaII*, il n'existe donc pas de site *KpnI* au niveau de ces fragments. Par contre, le fragment *SaII* de 6,4 kb est scindé en deux par la double digestion (5,4 + 1,0), il existe donc un site *KpnI* au niveau de ce fragment.

* La simple digestion par *KpnI* se traduit par la formation de 3 bandes de 17,0; 6,9 et 1,5 kb, dont une bande double à 17 kb (Figure 29, puits 10). La digestion par *KpnI* du bras gauche du vecteur fait apparaître deux fragments de 17,1 et 1,5 kb, ainsi qu'un fragment composé d'une partie de 1,5 kb du vecteur associée à une section de x kb provenant de la partie gauche de l'insert en l'occurrence 5,4 kb (6,9 - 1,5 kb), portion située dans le fragment *SaII* de 6,4 kb. L'autre fragment d'environ 17 kb provient donc, pour partie du bras droit du vecteur (9 kb) et de la portion droite de l'insert (7,8 kb). Cette digestion confirme donc la présence d'un site unique de restriction *KpnI* et permet de préciser sa position sur l'insert.

* La digestion par *BgIII* fait apparaître un profil composé de 4 bandes de 32,7; 6,8; 1,2 et 0,7 kb, avec 3 bandes supplémentaires de 0,4; 0,3 et 0,06 kb non visibles sur le profil de digestion (Figure 28, puits 2 et figure 29, puits 11). Le fragment de 1,2 kb indique la présence d'un site *BgIII* localisé au niveau de l'extrémité droite de l'insert.

* La double digestion par *SaII* et *BgIII* se traduit par l'obtention d'un profil formé de 7 bandes de 20,0; 6,8; 6,4; 5,8; 1,2; 0,9 et 0,6 kb avec 3 bandes supplémentaires de 0,4; 0,3 et 0,06 kb non visibles sur le profil de digestion (Figure 29, puits 4 et figure 30, puits 18). Les fragments de 20,0; 6,8; 1,2; 0,6; 0,4; 0,3 et 0,06 kb proviennent du vecteur et les autres de l'insert. Comme on peut le voir, seul le fragment de 5,9 kb est coupé par *BgIII*. Cette double digestion permet de confirmer que le site *BgIII* est localisé à proximité (moins de 100 pb) du site *SaII* de l'extrémité droite de l'insert.

* Lorsque le vecteur recombinant est digéré par *HindIII*, on observe un profil caractérisé par 6 bandes de 22,1; 6,3; 5,2; 4,4; 2,7 et 1,5 kb (Figure 29, puits 9). Or, il existe un seul site *HindIII* au niveau du bras droit du vecteur, ce qui sous-entend la présence de 4 sites *HindIII* au niveau de l'insert. De plus, le fragment de 22,1 kb ne peut provenir que du bras gauche associé à un fragment d'ADN de 2,1 kb originaire de l'insert; on peut donc en déduire la présence d'un site *HindIII* localisé sur le fragment *SaII* de 6,4 kb et situé à 2,1 kb en aval du bras gauche. D'autre part, le bras droit du vecteur comporte un site *HindIII* localisé à 4,4 kb de son extrémité. Autrement dit, une digestion par *HindIII* entraîne l'apparition d'un fragment de 4,4

kb et d'un autre fragment composé d'une partie du vecteur (4,8 kb) associé à une portion droite de l'insert. Or ici, on observe deux fragments de taille supérieure à 4,8 kb en l'occurrence 6,3 et 5,2 kb, ce qui signifie que la partie vecteur de 4,6 kb est associée à un segment d'insert de 0,6 ou 1,7 kb. La double digestion par *SaII* et *HindIII* nous permettra de localiser le site *HindIII* de la partie droite de l'insert.

* Neuf fragments d'ADN de 20,0; 4,8; 4,4; 4,3; 2,7; 2,1; 1,7; 1,5 et 0,9 kb sont obtenus lors de la double digestion du vecteur recombinant par *HindIII* et *SaII* (Figure 29, puits 8). Les fragments de 20,0; 4,8 et 4,4 kb proviennent des bras gauche et droit du vecteur et celui de 0,9 kb correspond au fragment *SaII* situé au centre de l'insert. On observe également une bande d'ADN à 1,7 kb qui correspond à la partie droite de l'insert associée au fragment de 4,6 kb du bras droit du vecteur. Restent deux sites *HindIII* dont la position sur l'insert ne pourra être précisée qu'après sous-clonage des fragments *EcoRI* de l'insert.

* La digestion par *SaII* et *PvuI* aboutit à un profil composé de 8 bandes de 11,9; 8,0; 7,8; 5,9; 3,8; 2,6; 1,3 et 0,9 kb (Figure 29, puits 15). Les fragments de 11,9 et 8,0 kb proviennent du bras gauche du vecteur, ceux de 7,8 et 1,3 kb du bras droit. Restent les fragments de 5,9; 3,8; 2,6 et 0,9 kb qui indiquent que seul le segment *SaII* de 6,4 kb est scindé par *PvuI* en deux fragments de 3,8 et 2,6 kb. Ici encore, le sous-clonage du fragment *SaII* de 6,4 kb permettra de préciser la position du site *PvuI* sur l'insert.

* La digestion du lambda EMBL3 recombinant par *PvuI* se traduit par la formation d'un profil de restriction constitué de 4 bandes de 11,9; 11,7; 10,8 et 7,8 kb (non représenté). Or, il existe un site *PvuI* au niveau de chaque bras du vecteur ce qui signifie la présence d'un site *PvuI* au niveau de l'insert.

* La digestion par *PvuII* donne un profil formé de 11 bandes de 19,0; 4,3; 4,3; 4,2; 3,9; 2,6; 1,6; 0,8 (fragment de digestion partielle); 0,6; 0,5 et 0,5 (Figure 28, puits 3 et 8). Il existe 10 sites de restriction *PvuII* au niveau du bras gauche du vecteur, ce qui donne par digestion des fragments de 4,3; 4,2; 3,9; 1,6; 0,8; 0,6; 0,5 et 0,5 ainsi que des fragments de très petite taille (environ 0,2 kb). Nous savons que le dernier site *PvuII* du bras gauche est situé à 3,8 kb de l'extrémité gauche de l'insert, or la présence d'un fragment de 4,3 kb sous-entend l'existence d'un site *PvuII* localisé à environ 0,5 kb du premier site *SaII*. Le fragment de 19,0 kb comprend le bras droit du vecteur (9,0 kb) ainsi qu'un fragment de 10,0 kb issu de l'insert, ce qui implique l'existence d'un deuxième site *PvuII* au niveau du fragment *SaII* de 6,4 kb. La distance séparant les deux sites nous est donnée par le fragment de 2,6 kb provenant de la digestion du vecteur recombinant par *PvuII*. La digestion par *PvuII* des plasmides recombinants portant les

fragments *SaII* de 6,4 et 5,9 kb a permis de confirmer ces observations, à savoir qu'il n'existe pas de site *PvuII* au niveau du segment *SaII* de 5,9 kb et qu'il en existe deux au niveau de l'autre segment.

* La double digestion *SaII/PvuII* donne 14 bandes visibles sur gel d'agarose à 1,4%, de : 9,0; 5,9; 4,3; 4,2; 3,9; 3,8; 3,2; 2,6; 1,6; 0,9; 0,6; 0,5; 0,5 et 0,5 (Figure 28, puits 13). Les fragments d'ADN de 9,0; 4,3; 4,2; 3,9; 3,8; 0,6; 0,5 et 0,5 kb proviennent du vecteur, ceux de 5,9 et 0,9 kb correspondent aux segments *SaII* de l'insert dépourvus de site *PvuII* et ceux de 0,5; 2,6 et 3,2 kb dérivent de la portion *SaII* de 6,4 kb de l'insert au niveau de laquelle se trouvent deux sites *PvuII*.

* La digestion par *AvaI* se traduit par la formation de 7 bandes de 14,8; 8,1; 6,8; 5,8; 4,7; 1,7 et 0,5 kb (Figure 30, puits 25). Les fragments de 14,8; 4,7 et 0,5 kb proviennent du bras gauche, ceux de 5,8 et 1,7 du bras droit. Un site *AvaI* est placé à 100 pb en aval de l'extrémité droite du bras gauche du vecteur, et un autre site est placé à 1,5 kb en aval de l'extrémité gauche du bras droit du vecteur. Les deux fragments restants (8,1 et 6,7 kb) indiquent qu'il existe un site unique de restriction au niveau de l'insert.

* La double digestion par *SaII* et *AvaI* donne un profil composé de 10 bandes correspondant à des fragments de 14,8; 6,4; 5,8; 5,2; 4,6; 1,5; 1,5; 0,9; 0,7 et 0,6 kb (Figure 31, puits 22). Les fragments de 14,8; 5,8; 4,6; 1,5; 1,5 et 0,6 kb proviennent des deux bras du vecteur et les fragments de 6,4 et 0,9 kb correspondent au segments *SaII* de l'insert, ce qui signifie que le site *AvaI* est localisé au niveau du segment *SaII* de 5,9 kb et scinde ce dernier en deux fragments de 5,2 et 0,7 kb. Compte-tenu de la digestion par *AvaI*, on peut en déduire que le site *AvaI* est placé à 0,7 kb du site *SaII* localisé à gauche du fragment *SaII* de 5,9 kb.

* La double digestion *SaII/PstI* (Figure 28, puits 15) réalisée en présence d'un témoin *SaII* (Figure 28, puits 14) permet d'affirmer qu'il existe au moins un site *PstI* au niveau du fragment *SaII* de 6,4 kb de l'insert de 13,2 kb puisque ce fragment disparaît lors de cette double digestion et que par contre, il n'existe pas de site *PstI* au niveau du fragment *SaII* de 5,9 kb. Nous ne pouvons rien déduire de plus puisqu'on ne dispose pas d'informations concernant le nombre et la position des sites *PstI* éventuellement présents sur le vecteur.

* La digestion par *ClaI* aboutit à l'obtention d'un profil de restriction composé de 7 fragments de 17,4; 11,4; 4,1; 3,8; 2,6; 2,1 et 0,6 kb, ce qui signifie qu'il n'existe pas de site *ClaI* au niveau de l'insert (Figure 29, puits 2).

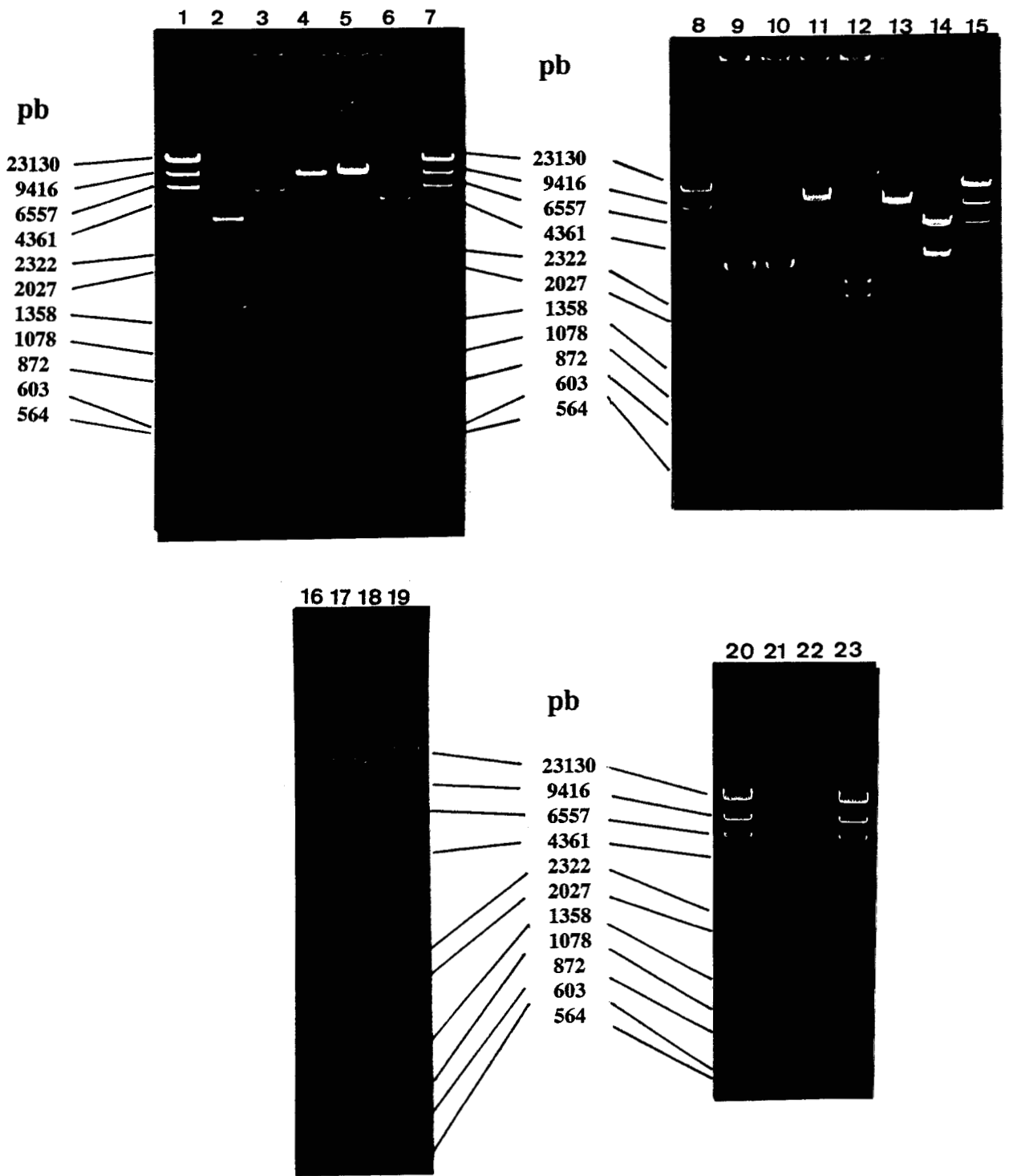


Figure 31. Profils de restriction des vecteurs hybrides λ EMBT1 et pBT1. Puits 1, 7, 8, 15, 19, 20 et 23 : témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN \emptyset X174 digéré par *Hae*III); 2: pBT1/*Eco*RI; 3: pBT1/*Hind*III; 4: pBT1/*Hpa*I+*Kpn*I; 5: pBT1/*Hpa*I; 6: pBT1/*Pst*I; 9: pBT1/*Eco*RI; 10: pBT1/*Bgl*II+*Eco*RI; 11: pBT1/*Bam*HI+*Bgl*II; 12: pBT1/*Hind*III+*Pst*I; 13: pBT1/*Hpa*I+*Kpn*I; 14: pBT1/*Sal*I; 16: λ EMBT1/*Sal*I; 17: λ EMBT1/*Sal*I+*Sma*I; 18: λ EMBT1/*Sma*I; 21: pBT1/*Sal*I+*Ava*I et 22: λ EMBT1/*Sal*I+*Ava*I.

Nota : L'ensemble de ces résultats est repris sur les tableaux 9a et 9b et sur la carte de restriction représentée sur la figure 32.

Des essais de sous-clonage des fragments *Sall* de 6,4; 5,9 et 0,9 kb et des fragments *EcoRI* de 3,7 et 4,4 kb provenant de l'insert ont été effectués dans les buts :

- de localiser plus précisément les gènes codant pour les activités pectate lyase et pectine méthylestérase;
- de les isoler, afin d'étudier leur expression séparée chez *E. coli*, de façon à savoir s'ils constituent un système d'opéron ou des unités de transcription indépendantes;
- de préciser la localisation de certains sites sur la carte de restriction de l'insert (*HindIII*, *PvuI* et *PvuII*) et d'en découvrir d'autres (*HpaI* et *PstI*).

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure- N° de puits
<i>AvaI</i> _p	14,8; 8,1; 6,8; 5,8; 4,7; 1,7 et (0,5)	30-25
<i>Bam</i> HI	27,9 et 14,3	29-12
<i>Bgl</i> III*	32,7; 6,8; 1,2; 0,7; (0,4 et 0,3)	28-2
<i>Cla</i> I	17,4; 11,4; 4,1; 3,8; 2,6; 2,1 et (0,6)	29-2
<i>Eco</i> RI	21,0; 13,0; 4,5 et 3,7	28-7
<i>Hind</i> III	22,1; 6,3; 5,2; 4,4; 2,7 et 1,5	29-9
<i>Hpa</i> I* _p	10,9; 7,9; 5,9; 4,5; 3,4; 3,4; 2,3; 2,2; 0,7; (0,4; 0,3 et 0,2)	29-3
<i>Kpn</i> I	17,1; 16,8; 6,9 et 1,5	29-10
<i>Pvu</i> II*	19,0; 4,3; 4,3; 4,2; 3,9; 2,6 1,6; 0,8; 0,6; 0,5; 0,5 et (0,2 x 3)	28-3
<i>Sal</i> I*	20,0; 9,0; 6,4; 5,9 et 0,9	28-4
<i>Sma</i> I	19,4; 17,0 et 5,8	31-18

Tableau 9a. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestion simple par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride λ EMBT1 ou λ EMBL3::ADN 217-13,2 kb. * Digestions que l'on retrouve sur d'autres puits : *Bgl*III 29-11 et 30-3; *Hpa*I 30-2; *Pvu*II 28-8 et 28-13; et *Sal*I 28-14; 29-16 et 31-16. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel. _p : digestion partielle.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure- N° de puits
<i>SalI/AvaI</i>	14,8; 6,4; 5,8; 5,2; 4,6; 1,5 1,5; 0,9; 0,7; (0,6 et 0,1)	31-21
<i>SalI/BamHI</i> *	20,0; 9,0; 6,4; 5,3; 0,9 et 0,6	28-5
<i>SalI/BglIII</i> *	20,0; 6,8; 6,4; 5,8; 1,2; 0,9; 0,6; (0,4 et 0,1)	29-4
<i>SalI/EcoRI</i>	20,0; 9,0; 4,0; 3,7; 1,9; 1,7; 1,0 et 0,9	28-10
<i>SalI/HindIII</i>	20,0; 4,8; 4,4; 4,3; 2,7; 2,1; 1,7; 1,5; 0,9 et (0,1)	29-8
<i>SalI/KpnI</i> *	17,1; 9,0; 5,9; 5,4; 1,5; 1,5; 1,0 et 0,9	29-5
<i>SalI/PstI</i>	aucune indication sur la position des sites présents sur le vecteur	28-15
<i>SalI/PvuI_p</i>	11,9; 8,0; 7,8; 5,9; 3,8; 2,6; 1,3 et 0,9	29-15
<i>SalI/SmaI</i>	19,4; 6,4; 5,9; 5,8; 3,2; 0,9 (et 0,6)	31-17
<i>BamHI/KpnI_p</i>	17,0; 14,3; 6,9; 2,5 et 1,5	30-19
<i>BamHI/BglIII</i>	27,5; 7,0; 5,3; 1,1; 0,6; (0,4; 0,3 et 0,1)	30-4
<i>BglIII/KpnI_p</i>	16,8; 7,7; 6,9; 6,8; 1,5; 1,2; (0,6; 0,4; 0,3 et 0,1)	30-17
<i>EcoRI/HindIII</i>	21,0; 6,3; 4,4; 2,9; 2,6; 2,3; 1,5; 1,1 et (0,2)	32-2

Tableau 9b. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestions doubles par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride λ EMBT1 ou λ EMBL3::ADN217 (13,2 kb). * Digestions que l'on retrouve sur d'autres puits : *SalI/BamHI* 28-9; *SalI/BglIII* 30-18 et *SalI/KpnI* 30-16. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel. p : digestion partielle.

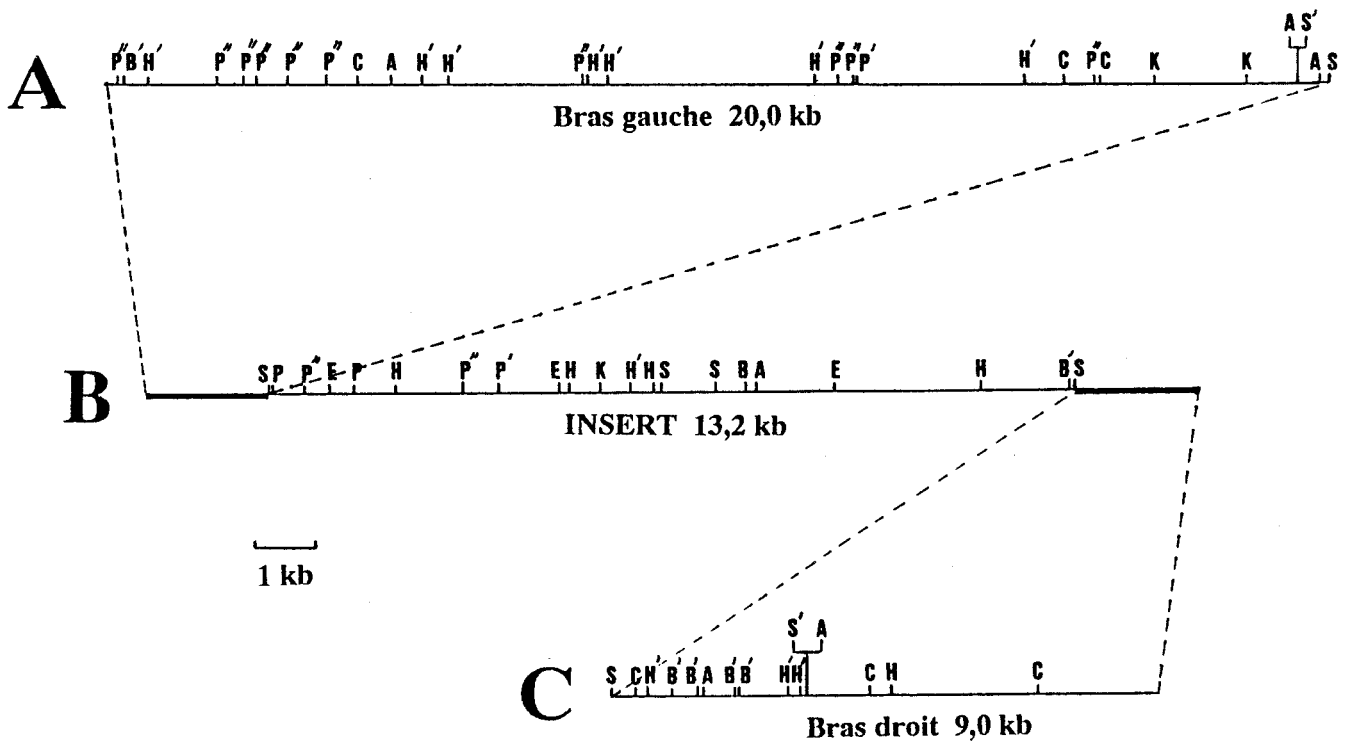


Figure 32. Carte de restriction détaillée des bras gauche (A) et droit (B) du vecteur phagique Lambda EMBL3, ainsi que de l'insert de 13,2 kb (C). Abréviations utilisées pour les sites de restriction : A (*Ava*I); B (*Bam*HI); B' (*Bgl*II); C (*Cla*I); E (*Eco*RI); H (*Hind*III); H' (*Hpa*I); K (*Kpn*I); P (*Pst*I); P' (*Pvu*I); P'' (*Pvu*II); S (*Sal*I) et S' (*Sma*I).

6 - SOUS-CLONAGE SEPARÉ DES DEUX GÈNES.

6.1 - SOUS-CLONAGE DES FRAGMENTS *SaII* DE L'INSERT DE 13,2 KB AU NIVEAU DU SITE *SaII* DES VECTEURS pBR322 ET pDR720.

Deux expériences de transformation ont été réalisées en ligaturant les fragments issus de la digestion par *SaII* du vecteur phagique recombinant au niveau du site *SaII* des vecteurs pDR720 et pBR322.

6.1.1 - Transformation réalisée avec le pDR720.

Une première transformation a été réalisée en ligaturant les fragments d'ADN provenant de la digestion par *SaII* du vecteur phagique recombinant, au niveau du site unique de restriction *SaII* du pDR720, localisé en aval du promoteur *trp*.

Après 24 h d'incubation à 37°C, on a dénombré 100 colonies Ap^F et pour les numérations 38 colonies à la dilution 10⁻⁶, donnant une fréquence de transformation faible de 6,5 x 10⁻⁷ et une efficacité de transformation de 40 transformants/μg d'ADN. Ces transformants ont été passés en lyse directe, ce qui a permis de mettre en évidence un transformant recombinant portant un insert de 6,4 kb, répondant positivement pour l'activité pectine méthylestérase et négativement pour l'activité pectate lyase (PME⁺ PL⁻) (Figure 27 B).

6.1.2 - Transformation réalisée avec le pBR322.

Une deuxième transformation a été réalisée avec le pBR322, dans le but d'isoler les deux autres fragments *SaII* de 5,9 et 0,9 kb, afin de préciser la localisation du gène responsable de l'activité pectate lyase.

Huit mille transformants Ap^F ont été obtenus à l'issue de la transformation, avec pour les numérations 100 colonies à la dilution 10⁻⁵, ce qui donne une fréquence de transformation de 2 x 10⁻⁵ et une efficacité de transformation de 8 x 10³ transformants/μg d'ADN. Ces transformants ont été contre-sélectionnés sur milieu riche contenant de la tétracycline, ce qui a permis de mettre en évidence 89 clones Ap^F Tc^S qui ont été analysés par lyse directe.

Seuls 5 clones sont des recombinants réels, les autres possèdent un vecteur délété au niveau du gène de résistance à la tétracycline. L'ADN plasmidique des 5 clones a été extrait par la méthode de Grosveld *et al.* (85) et digéré par *EcoRI*, ce qui a permis d'évaluer la taille de l'insert et son orientation par rapport au vecteur.

* Quatre clones sur les 5 portent le même insert de 6,4 kb positionné dans la même orientation par rapport au vecteur (profils de digestion par *EcoRI* identiques) et répondent positivement pour l'activité pectine méthylestérase ($PME^+ PL^-$) (Figure 33, puits 14, 15, 16 et 17).

* Un clone recombinant porte le fragment *SalI* de 5,9 kb et est négatif pour les deux activités ($PME^- PL^-$) (Figure 33, puits 18).

* Aucun clone présentant le fragment *SalI* de 0,9 kb n'a pu être isolé à partir de ces deux transformations.

Le fait qu'on ne retrouve pas d'activité pectate lyase associée aux fragments *SalI* de 6,4 et 5,9 kb, suggère que le gène responsable de cette activité est localisé de part et d'autre des deux sites *SalI* présents au centre de l'insert. Il existait donc une forte probabilité pour que ce gène soit inclus dans le fragment *EcoRI* de 4,5 kb.

6.2 - SOUS-CLONAGE DES FRAGMENTS *EcoRI* DE L'INSERT DE 13,2 KB AU NIVEAU DU SITE *EcoRI* DU pBR325.

En conséquence, le vecteur EMBT1 a été digéré par *EcoRI* et les fragments *EcoRI* de 3,7 et 4,5 kb provenant de l'insert ont été électroélués, ligaturés au niveau du pBR325 digéré par *EcoRI* (1 μg d'ADN électroélué mélangé à 0,5 μg de vecteur) et le mélange de ligature a servi à transformer la souche d'*E. coli* HB101. On a dénombré 70 colonies à la dilution 10^{-4} (0,1 ml à 10^{-4}) et au total 470 transformants Ap^r et Tc^r sur 3 ml d'étalement (ce qui donne une fréquence de transformation de 7×10^{-4} et 310 transformants/ μg d'ADN), dont 441 clones recombinants Ap^r Tc^r et Cm^s qui ont été lysés et testés pour les deux activités.

Une lyse directe réalisée sur 26 clones Ap^r Tc^r Cm^s choisis au hasard, montre qu'un fragment est majoritairement représenté (Figure 34). Sur ces 26 transformants, 25 répondent positivement pour l'activité pectine méthylestérase et négativement pour l'activité pectate lyase.

Les 441 transformants Ap^r Tc^r et Cm^s ont été lysés par la technique décrite au § 10.2.3 du chapitre Matériels et Méthodes et les surnageants de lyse obtenus ont été testés pour les activités pectine méthylestérase et pectate lyase, coduisant aux résultats suivants :

- 440 clones répondent positivement pour l'activité pectine méthylestérase et négativement pour l'activité pectate lyase;

- 1 seul clone est pectate lyase-positif et pectine méthylestérase-négatif.

A l'issue de ce criblage, une lyse directe a été effectuée de façon à contrôler le contenu plasmidique du clone d'*E. coli* HB101 $PL^+ PME^-$ en le comparant à celui des clones $PME^+ PL^-$. Il en ressort que le clone $PL^+ PME^-$ est bien un recombinant possédant un insert de taille plus importante que celui présent au niveau du pBR325 porté par les souches d'*E. coli* HB101 $PME^+ PL^-$ (Figure 35).

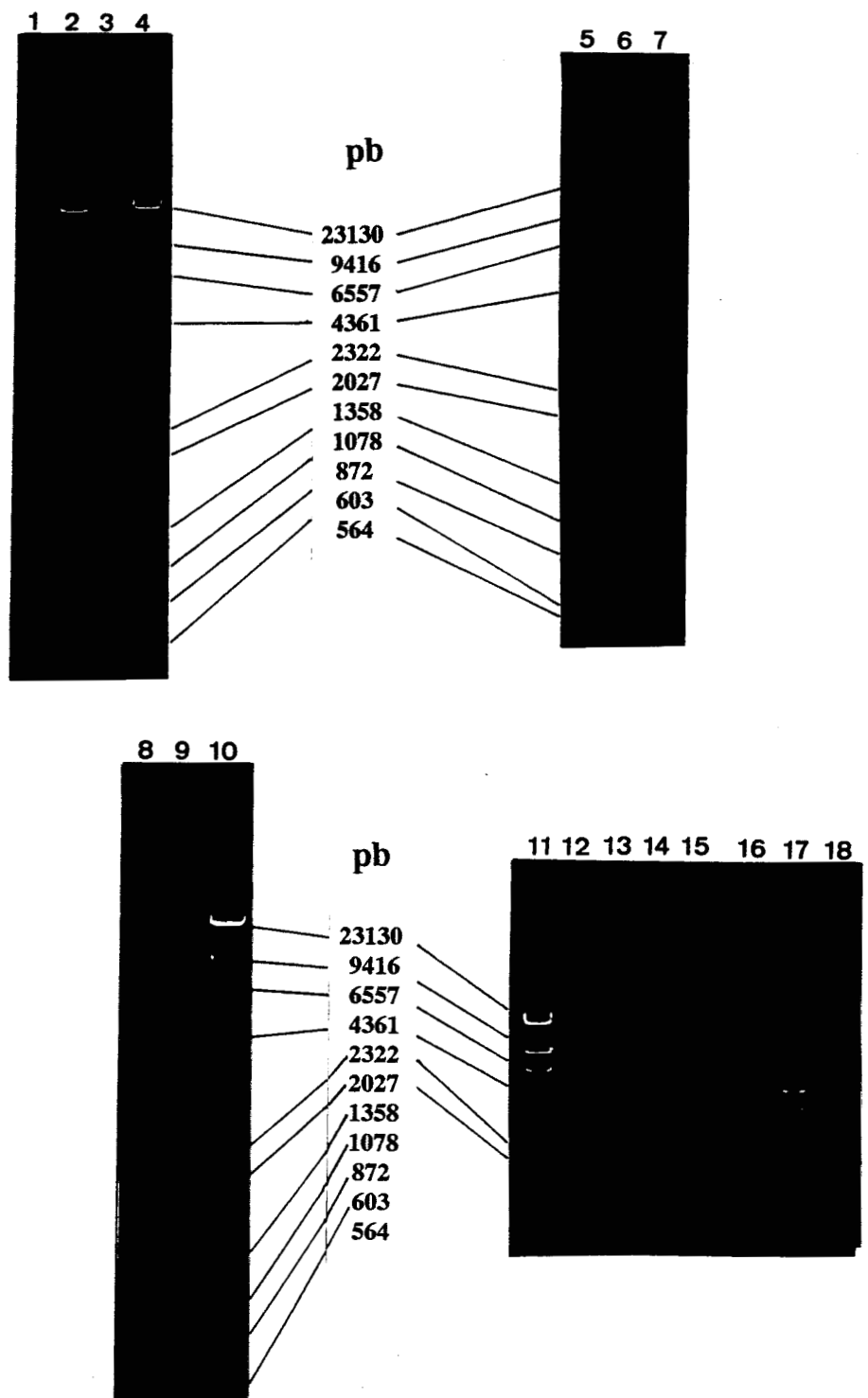


Figure 33. Profils de restriction des vecteurs hybrides λ EMBT1, pBT1, pBT2 et pBT3. Puits 4, 5, 10 et 11 : témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN ϕ X174 digéré par *Hae*III); 1: pBT2/*Sall*+*Hind*III; 2: λ EMBT1/*Eco*RI+*Hind*III; 3: pBT2/*Eco*RI+*Hind*III; 6: pBT3/*Sall*; 7: pBT2/*Sall*; 8: pBT2/*Hind*III; 9: pBT3/*Hind*III; 12: pBR322/*Eco*RI; 13: pBT1/*Eco*RI; 14: pBT2 (1)/*Eco*RI; 15: pBT2(2)/*Eco*RI; 16: pBT2 (3)/*Eco*RI; 17: pBT2(4)/*Eco*RI et 18: pBT3/*Eco*RI.

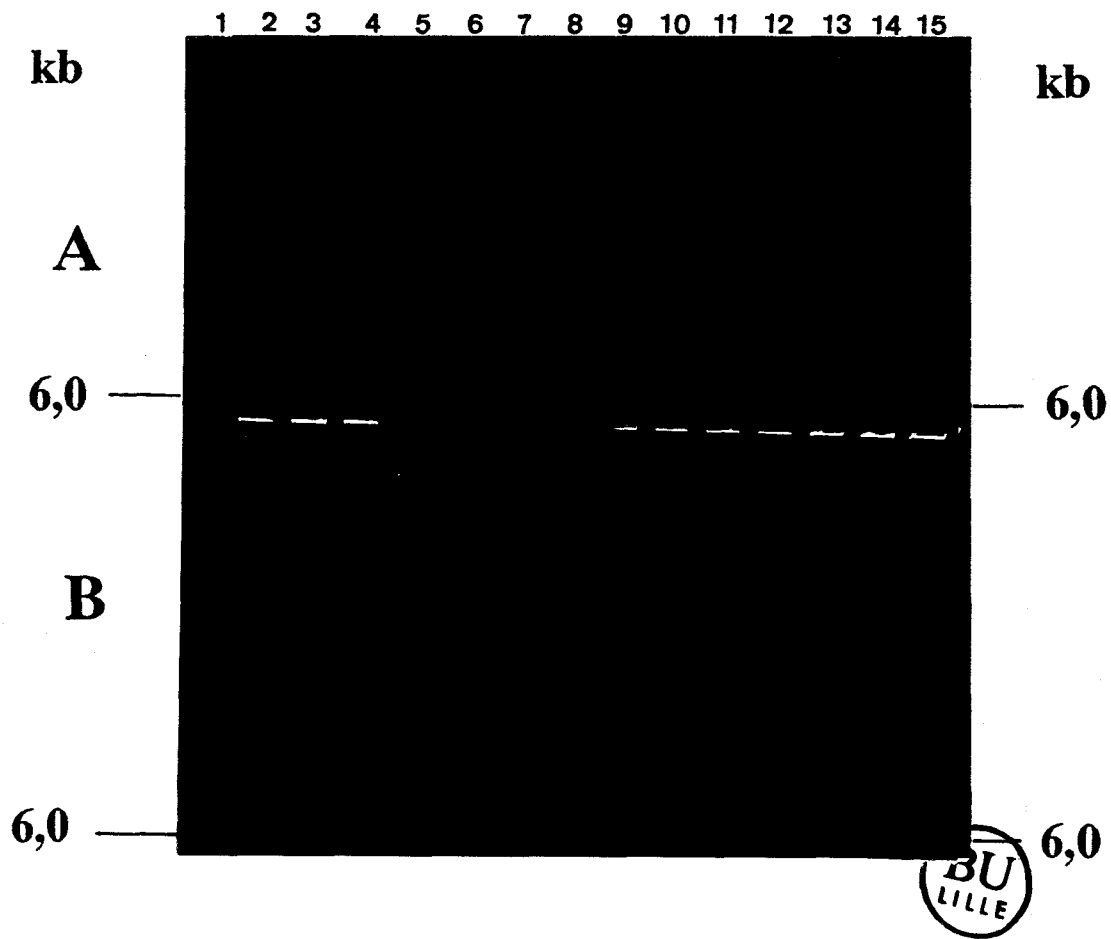


Figure 34. Analyse du contenu plasmidique des clones d'*E. coli* HB101 (Ap^r Tc^r Cm^S) issus de la transformation réalisée avec le pBR325, par lyse directe en gel d'agarose à 0,8%. Puits 1 A ,1 B, 15 A et 15 B: témoins *E. coli* HB101(pBR325); 2 à 14 A et 2 à 14 B: clones d'*E. coli* HB101 (Ap^r Tc^r Cm^S).

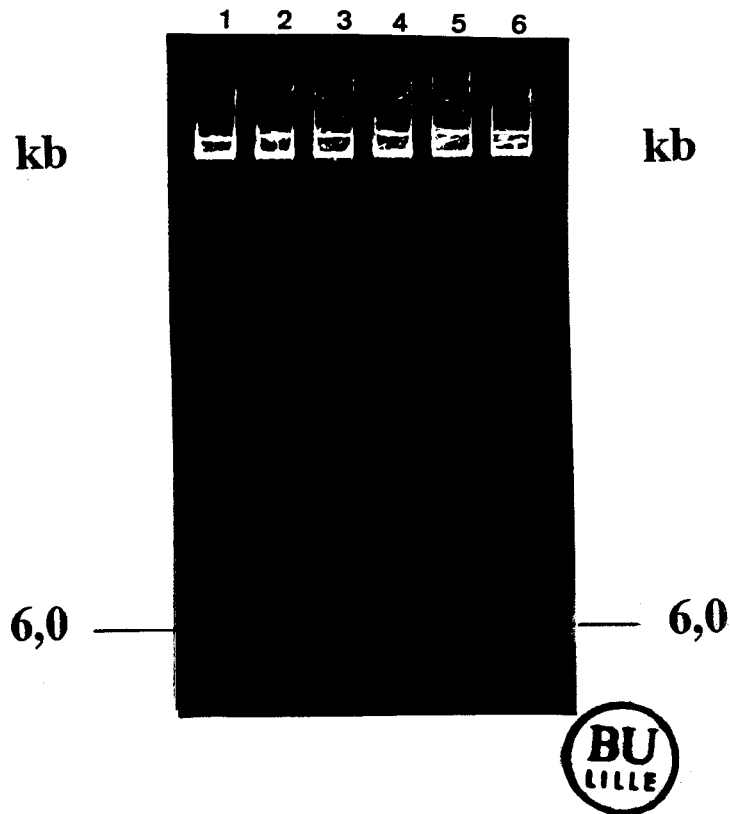


Figure 35. Analyse du contenu plasmidique des clones d'*E. coli* HB101 (Ap^r Tc^r Cm^s) issus de la transformation réalisée avec le pBR325, par lyse directe en gel d'agarose à 0,8%. Puits 1 et 6: témoin *E. coli* HB101 (pBR325); 2: clone d'*E. coli* (Ap^r Tc^r Cm^s) PL^- PME^- ; 3 et 5: clones d'*E. coli* (Ap^r Tc^r Cm^s) PL^- PME^+ et 4: clone d'*E. coli* (Ap^r Tc^r Cm^s) PL^+ PME^- .

* L'ADN plasmidique a été extrait pour 6 clones parmi les 440 et digéré dans un premier temps par *EcoRI*, ce qui a permis de mettre en évidence la présence d'un fragment *EcoRI* de 3,7 kb provenant du segment *SaII* de 6,4 kb de l'insert. La digestion des plasmides recombinants par *PvuI* et *PvuII* a permis de montrer que ce fragment *EcoRI* avait été sous-cloné dans les deux orientations (Figure 36, puits 1, 2, 3 et 4). L'activité pectine méthylestérase est d'ailleurs présente quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur. Une quantification précise de cette activité, permettrait de savoir si le niveau d'expression du gène responsable de l'activité pectine méthylestérase, est fonction de son orientation par rapport au promoteur du gène impliqué dans la résistance au chloramphénicol du vecteur.

* L'ADN plasmidique du clone pectate lyase positif a été extrait et digéré par *EcoRI*, ce qui a permis de déterminer la taille de l'insert qui est de 4,5 kb (Figure 38, puits 13).

Les deux gènes sont donc proches l'un de l'autre et fonctionnent séparément chez *E. coli*, ce qui permet d'en déduire qu'ils constituent des unités de transcription indépendantes, chaque gène étant sous contrôle de son propre promoteur. Ce modèle s'apparente à celui décrit antérieurement chez *E. chrysanthemi* (106,130), *Commentaire de complexité pol. est. par*

L'ADN plasmidique des souches d'*E. coli* HB101 pBR325::ADN 217 (3,7 kb) PME⁺ PL⁻ (pBT4) et pBR325::ADN 217 (4,5 kb) PME⁻ PL⁺ (pBT5) a ensuite servi à transformer les souches d'*E. coli* C600, HB101, JM83 et LE392. Un nombre important de clones recombinants PME⁺ a pu être obtenu avec les souches d'*E. coli* HB101, JM83 et LE392 transformées avec le plasmide pBT4. Par contre, aucun transformant recombinant n'a pu être obtenu en utilisant le pBT5 (Tableaux 10 a et b).

D'autre part, aucun transformant recombinant n'a pu être isolé après digestion par *EcoRI* du pBT5, ligature et transformation de la souche d'*E. coli* HB101 et ceci dans le but d'obtenir un clone d'*E. coli* portant l'insert de 4,5 kb positionné dans l'autre orientation sur le vecteur.

La très faible représentation de l'insert de 4,5 kb (1 clone PL⁺ contre 440 PME⁺) ne peut s'expliquer par la différence de taille des inserts. De plus, l'absence de clones recombinants portant cet insert à l'issue des diverses expériences de transformation, suggère qu'il doit exister un gène situé dans l'insert de 4,5 kb dont le produit est néfaste ou interfère avec la croissance d'*E. coli*.

Les vecteurs recombinants pDR720::ADN 217 (6,4 kb) (pBT1), pBR322::ADN 217 (6,4 kb) (pBT2) et pBR322::ADN 217 (5,9 kb) (pBT3) ainsi que les pBT4 et pBT5 ont été extraits par la technique de Ish-Horowicz (110) et digérés par un certain nombre d'enzymes de restriction, pour :

- 1 - confirmer la provenance de l'insert, déterminer l'orientation de l'insert par rapport au vecteur;
- 2 - vérifier et préciser la position des sites de restriction sur la carte;
- 3 - mettre en évidence d'autres sites.

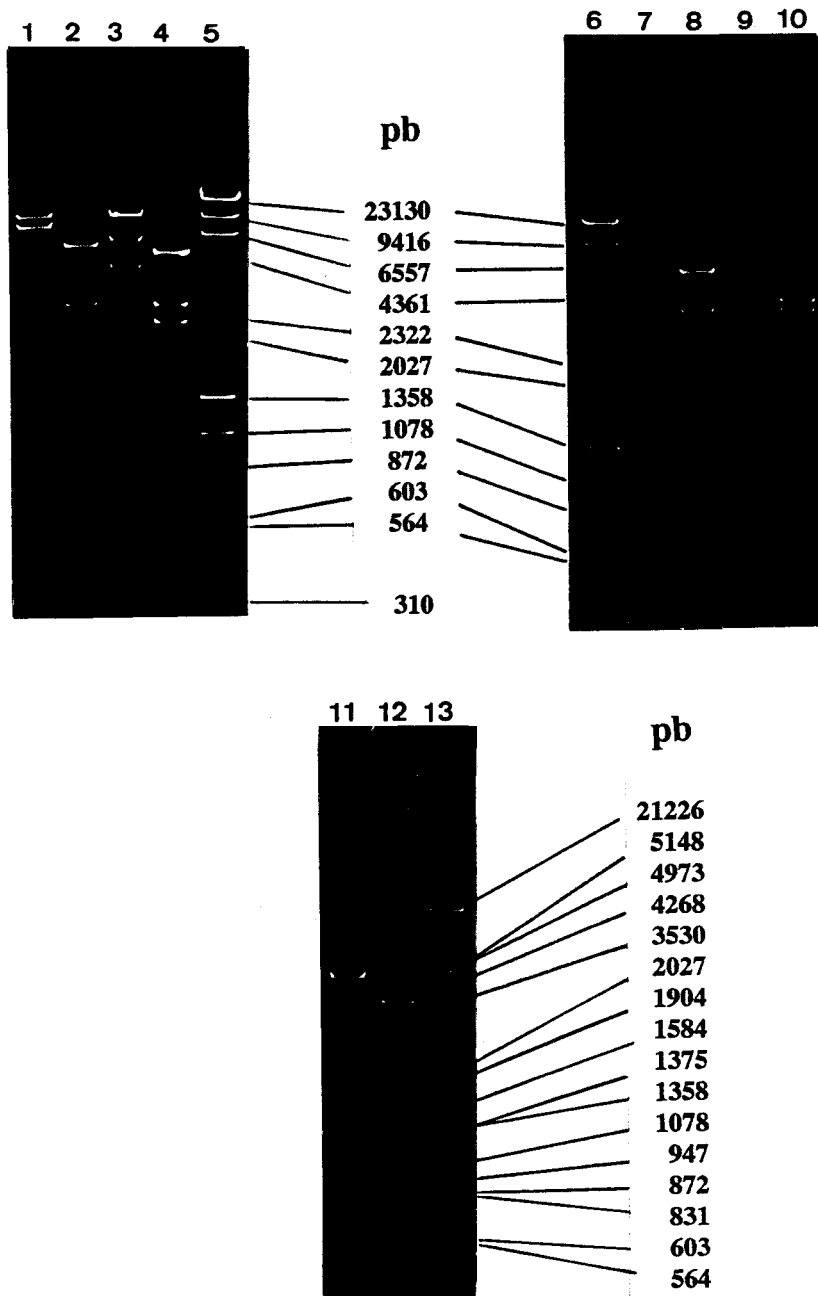


Figure 36. Profils de restriction des vecteurs hybrides pBT4 et pBT4.1. Puits 5 et 6: témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 13: témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Eco*RI et *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 1: pBT4/*Pvu*I; 2: pBT4/*Pvu*II; 3: pBT4.1/*Pvu*I; 4: pBT4.1/*Pvu*II; 7: pBR325/*Eco*RI; 8: pBT4.1/*Eco*RI; 9: pBR325/*Sal*I+*Eco*RI; 10: pBT4.1/*Sal*I+*Eco*RI; 11: pBT4.1/*Eco*RI+ *Hind*III et 12: pBT4.1/*Eco*RI+*Hind*III+*Pst*I.

Souche d' <i>E. coli</i>	Numération	Nombre de transformants	Fréquence de transformation
C600	$1,8 \times 10^8/\text{ml}$	-	-
HB101	$3,9 \times 10^7/\text{ml}$	$5,5 \times 10^2/\text{ml}$	$1,4 \times 10^{-5}$
JM83	$2,3 \times 10^8/\text{ml}$	$1,0 \times 10^2/\text{ml}$	$4,3 \times 10^{-7}$
LE392	$8,1 \times 10^7/\text{ml}$	$1,8 \times 10^3/\text{ml}$	$2,2 \times 10^{-5}$

Tableau 10a. Transformation des souches d'*E. coli* C600, HB101, JM83 et LE392 avec le pBR325 portant le fragment *EcoRI* de 3,7 kb ou pBT4 (PME⁺ PL⁻).

Souche d' <i>E. coli</i>	Numération	Nombre de transformants	Fréquence de transformation
C600	$1,3 \times 10^8/\text{ml}$	-	-
HB101	$3,0 \times 10^7/\text{ml}$	-	-
JM83	$2,0 \times 10^8/\text{ml}$	-	-
LE392	$4,6 \times 10^7/\text{ml}$	-	-

Tableau 10b. Transformation des souches d'*E. coli* C600, HB101, JM83 et LE392 avec le pBR325 portant le fragment *EcoRI* de 4,5 kb ou pBT5 (PME⁻ PL⁺).

6.3 - CARTE DE RESTRICTION DES VECTEURS RECOMBINANTS.

6.3.1 - pDR720::*Sa*II-6,4 kb ou pBT1.

* La digestion par *Sa*II permet de séparer l'insert du vecteur et conduit à l'obtention d'un profil de restriction composé de deux bandes de 6,4 kb (insert) et 4,1 kb (vecteur pDR720) (Figure 31, puits 14).

* La digestion du vecteur par *Eco*RI fait apparaître un profil composé de 4 bandes de 3,7; 1,7; 1,0 et 0,4 kb dont une bande d'intensité double à 3,7 kb (Figure 31, puits 2 et 9). Les fragments de 3,7 et 0,4 kb proviennent du vecteur et ceux de 3,7; 1,7 et 1,0 kb de l'insert *Sa*II de 6,4 kb. Cette digestion permet de déterminer plus précisément la taille du fragment sous-cloné mais ne donne aucun renseignement sur son orientation.

* La double digestion *Eco*RI/*Bg*III donne un profil strictement identique à celui observé par simple digestion par *Eco*RI (Figure 31, puits 10). Autrement dit, il n'existe pas de site *Bg*III au niveau du fragment *Sa*II de 6,4 kb. Ce qui est confirmé par la double digestion *Bam*HI/*Bg*III où le vecteur recombinant est linéarisé (Figure 30, puits 11).

* La digestion par *Hind*III se traduit par l'apparition d'un profil de restriction composé de 3 bandes correspondant à des fragments de 6,2; 2,7 et 1,5 kb (Figure 31, puits 3). Il n'existe qu'un site *Hind*III au niveau lieu multisite du vecteur; autrement dit le fragment de 6,2 kb correspond au vecteur (4,1 kb) lié à un fragment de 2,1 kb provenant de l'insert. Cette digestion permet d'orienter l'insert par rapport au vecteur.

Nous avons également effectué des digestions par *Hpa*I et *Pst*I de façon à mettre en évidence de nouveaux sites sur l'insert de 6,4 kb :

- Par *Hpa*I, on obtient deux fragments de 10,0 et 0,5 kb (Figure 31, puits 5). Or, il n'existe qu'un site *Hpa*I situé au niveau du lieu multisite du vecteur. Connaissant la position de l'insert par rapport au vecteur, nous pouvons en déduire que le site *Hpa*I est situé à 0,5 kb de l'extrémité droite de l'insert de 6,4 kb. Ce qui est confirmé par la double digestion *Hpa*I/*Kpn*I qui est caractérisée par un profil de 3 bandes de 9,4; 0,6 et 0,5 kb (Figure 31, puits 4). Cette double digestion permet également préciser la position du site *Kpn*I sur la carte.

- Par *Pst*I, on obtient 4 fragments de 5,0; 3,1; 1,3 et 1,2 kb (Figure 31, puits 6). Or, il existe deux sites *Pst*I sur le vecteur à l'origine de fragments de 1,2 et 2,9 kb. Il existe donc deux sites *Pst*I au niveau de l'insert de 6,4 kb. Reste à préciser leurs positions respectives.

Les digestions *PstI/HindIII* et *HindIII* vont permettre d'élucider la question. En effet, on obtient 6 fragments de 3,1; 2,7; 1,5; 1,3; 1,1 et 0,7 kb par la double digestion *PstI/HindIII* (Figure 31, puits 12) et 3 fragments de 6,2; 2,7 et 1,5 kb par *HindIII* (Figure 31, puits 3). Les fragments *HindIII* de 2,7 et 1,5 kb proviennent de l'insert et ne sont pas coupés par *PstI* puisqu'on les retrouve lors de la double digestion. Autrement dit, les deux sites *PstI* sont localisés au niveau du fragment *SalI-HindIII* de 2,1 kb, présent à l'extrémité gauche de l'insert de 6,4 kb. De plus, par *PstI* on obtient 4 fragments de 5,0; 3,1; 1,3 et 1,2 kb et on sait qu'il n'existe pas de site *PstI* sur la portion droite de 4,3 kb de l'insert (*HindIII-SalI*), délimitée par le site *PstI* présent au niveau du lieu multisite du vecteur. Autrement dit, un site *PstI* est localisé à 0,7 kb du site *HindIII* bordant la portion de 4,3 kb, ce qui permet de préciser la position du deuxième site à 0,2 kb de l'extrémité gauche de l'insert. En effet, le fragment *PstI* de 3,1 kb provient du segment de 2,9 kb du vecteur lié à un segment de 0,2 kb originaire de l'insert.

Nota : Les résultats obtenus lors de ces digestions figurent sur le tableau 11.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure/ N° de puits
<i>Ava</i> I	10,5	30-24
<i>Eco</i> RI*	3,7; 3,7; 1,7; 1,0 et (0,4)	31-2
<i>Hind</i> III	6,2; 2,7 et 1,5	31-3
<i>Hpa</i> I	10,0 et 0,5	31-5
<i>Pst</i> I	5,0; 3,1; 1,3 et 1,1	31-6
<i>Sal</i> I	6,4 et 4,1	31-14
<i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II	10,5	31-11
<i>Eco</i> RI/ <i>Bgl</i> II	3,7; 3,7; 1,7; 1,0 et (0,4)	31-10
<i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I	3,1; 2,7; 1,5; 1,3; 1,1 et 0,7	31-12
<i>Kpn</i> I/ <i>Hpa</i> I*	9,4; 0,6 et 0,5	31-4
<i>Sal</i> I/ <i>Ava</i> I	6,4 et 4,1	31-22

Tableau 11. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestion par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride pBT1 ou pDR720::*Sal*I-6,4 kb. * Digestions que l'on retrouve sur d'autres puits : *Eco*RI 31-9 et 33-13; *Kpn*I/*Hpa*I 31-13. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel.

6.3.2 - pBR322::SalI-6,4 kb ou pBT2.

* La digestion du vecteur recombinant par *SalI* aboutit à l'obtention d'un profil composé de deux bandes correspondant à des fragments d'ADN de 6,4 kb (insert) et 4,4 kb (vecteur) (Figure 33, puits 7).

* La double digestion *SalI/BglII* donne un profil identique à la simple digestion par *SalI*, ce qui confirme l'absence de site *BglII* au niveau du segment *SalI* de 6,4 kb (Figure 30, puits 14).

* La double digestion *HindIII/SalI* donne un profil composé de 9 fragments correspondant à une digestion partielle du vecteur recombinant (Figure 33, puits 1). On remarque la présence d'un fragment de digestion partielle de 1,6 kb qui correspond au segment *HindIII* de 1,5 kb lié au segment *HindIII-SalI* de 0,1 kb. Cette digestion partielle confirme donc l'emplacement du 3^{ème} site *HindIII* sur le fragment *SalI* de 6,4 kb de l'insert et permet de préciser la distance séparant le site *HindIII* du site *SalI*.

* Par *EcoRI*, nous obtenons trois fragments de 4,8; 3,7 et 2,3 kb (Figure 33, puits 14, 15, 16 ou 17). Le fragment de 3,7 kb est commun à celui observé lors de la digestion par *EcoRI* ou *EcoRI/SalI* du Lambda EMBT1, il provient donc de l'insert ou plus exactement du segment *SalI* de 6,4 kb; les deux autres fragments étant des hybrides vecteur/insert. Cette digestion nous indique donc que le deuxième site *SalI* est situé à 3,7 kb du premier site, lui-même situé à 1,0 kb de l'extrémité gauche de l'insert de 13,2 kb. La position et l'ordre des sites *EcoRI* de l'insert de 13,2 kb présent sur le vecteur Lambda EMBT1 est donc la suivante : bras gauche (20,0 kb) - 1,0 kb - 3,7 kb - 4,5 kb - 4,0 kb - bras droit (9,0 kb). De plus, cette digestion permet d'orienter l'insert par rapport au vecteur puisque les deux sites *EcoRI* de l'insert ne sont pas situés à égale distance des extrémités de ce dernier.

* Par *EcoRI/HindIII*, on obtient 5 fragments de 4,8; 2,6; 1,5; 1,1 et 0,7 kb dont trois communs avec le Lambda EMBT1 digéré par les mêmes enzymes (2,6; 1,5 et 1,1 kb) (Figure 33, puits 3). Connaissant la position des sites *EcoRI* et d'un site *HindIII* sur l'insert et sachant qu'il existe trois sites *HindIII* sur le segment *SalI* de 6,4 kb, il devient facile de positionner les deux autres sites *HindIII* sur ce segment. Par cette digestion, le fragment *EcoRI* de 3,7 kb est scindé en deux fragments de 2,6 et 1,1 kb, confirmant de ce fait, la position du premier site *HindIII* à 2,1 kb de l'extrémité gauche de l'insert de 13,2 kb. Restent les fragments de 1,5 et 0,7 kb dont il faut préciser l'origine. Si l'on place un site *HindIII* à 0,7 kb en aval du deuxième site *EcoRI* de l'insert de 6,4 kb, cela signifie que le troisième site *HindIII* est situé au niveau du

vecteur (à 1,5 kb du deuxième site *HindIII*). Or, nous savons qu'il existe trois sites *HindIII* au niveau de l'insert *SaII* de 6,4 kb; cette solution n'est donc pas envisageable. Un site *HindIII* est donc localisé à 0,7 kb en amont du site *HindIII* du vecteur, c'est-à-dire à environ 0,1 kb du site *SaII* de l'extrémité droite de l'insert de 6,4 kb. L'autre site *HindIII* est placé à 1,5 kb en amont du troisième site *HindIII* c'est-à-dire à 0,1 kb en aval du deuxième site *EcoRI* de l'insert. Les sites *HindIII* sont donc placés dans l'ordre suivant sur l'insert *SaII* de 13,2 kb : bras gauche (20 kb) + 2,1 kb - 2,7 kb - 1,5 kb - 5,2 kb - 1,7 kb + bras droit (9,0 kb).

* La digestion du pBT2 par *PvuI* donne deux fragments de 7,0 et 3,8 kb (photo non représentée). Or, nous savons que la digestion *PvuI/SaII* du Lambda EMBT1 donne pour l'insert de 6,4 kb, deux fragments de 3,8 et 2,6 kb. Connaissant l'orientation de l'insert par rapport au vecteur, il devient très simple de positionner l'unique site *PvuI* au niveau du segment *SaII* de 6,4 kb; site localisé à 3,8 kb de l'extrémité gauche de ce segment.

* La double digestion *SaII/KpnI* du pBT2 se traduit par l'apparition de trois fragments de 5,4; 4,4 et 1,0 kb (Figure 30, puits 15). Ce qui confirme la présence d'un site *KpnI* au niveau du fragment *SaII* de 6,4 kb.

* La digestion du pBT2 par *PvuII* donne naissance à trois fragments d'ADN de 6,2; 2,6 et 2,0 kb (Figure 30, puits 5). Le fragment de 2,6 kb étant commun à celui observé lors de la digestion du lambda recombinant par la même enzyme. Cette digestion confirme la présence de deux sites *PvuII* sur le segment *SaII* de 6,4 kb et permet de préciser leur position respective connaissant l'orientation de l'insert sur le vecteur.

Nota : Le tableau 12 reprend l'ensemble de ces résultats.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure- N° de puits
<i>EcoRI</i> [*] _p	4,8; 3,7 et 2,3	33-14
<i>HindIII</i>	5,9; 2,7; 1,5 et (0,7)	33-8
<i>PvuII</i>	6,1; 2,6 et 2,1	30-5
<i>SalI</i>	6,4 et 4,4	33-7
<i>EcoRI/HindIII</i>	4,8; 2,6; 1,5; 1,1; (0,7 et 0,1)	33-3
<i>HindIII/SalI</i> _p	3,8; 2,7; 2,1; 1,5; (0,6 et 0,1)	33-1
<i>SalI/BglII</i>	6,4 et 4,4	30-14
<i>SalI/KpnI</i>	5,4; 4,4 et 1,0	30-15

Tableau 12. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestion par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride pBT2 ou pBR322::*SalI*-6,4 kb. * Digestions que l'on retrouve sur d'autres puits : *EcoRI* 33-15; 33-16 et 33-17. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel. _p : digestion partielle.

6.3.3 - pBR322::SalI-5,9 kb ou pBT3.

Un seul clone possédant ce vecteur recombinant a pu être isolé. La taille de l'insert a été estimée après digestion du vecteur hybride par *SalI*, on obtient alors deux fragments de 4,4 et 5,9 kb correspondant respectivement au vecteur et à l'insert (Figure 33, puits 6) et l'orientation de l'insert sur le vecteur a été déterminée d'après les profils de digestions obtenus avec les enzymes *BamHI* (Figure 30, puits 7) et *HindIII* (Figure 33, puits 9).

* La double digestion *EcoRI/SalI* donne 4 fragments de 4,0; 3,8; 1,9 et 0,6 kb (Figure 30, puits 9). Les fragments de 3,8 et 0,6 kb proviennent du vecteur et ceux de 4,0 et 1,9 kb de l'insert. Cette digestion confirme la position de l'unique site de restriction *EcoRI* de l'insert de 5,9 kb à 4,0 kb en amont de l'extrémité droite de l'insert de 13,2 kb.

* La digestion du pBT3 par *BamHI* donne deux fragments d'ADN de 9,5 et 0,8 kb, ce qui confirme la présence d'un site *BamHI* au niveau du segment *SalI* de 5,9 kb et permet de positionner ce site à 0,6 kb de l'extrémité gauche du segment (Figure 30, puits 7).

* La double digestion *EcoRI/BamHI* a permis de préciser la distance séparant ces deux sites sur l'insert. En effet, on obtient 4 fragments de 7,8; 1,3; 0,8 et 0,4 kb (dont 3 visibles sur la Figure 30, puits 8). Le fragment de 7,8 kb est un hybride vecteur/insert, celui de 0,4 kb provient du vecteur et celui de 0,8 kb est commun avec celui obtenu lors de la digestion du vecteur hybride par *BamHI* (0,2 kb (vecteur) + 0,6 kb (insert)). Le fragment de 1,3 kb correspond donc au segment *BamHI-EcoRI* de l'insert et sa taille nous donne la distance séparant ces deux sites.

Nota : Tous ces résultats sont repris sur le tableau 13.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure/ N° de puits
<i>Bam</i> HI	9,5 et (0,8)	30-7
<i>Eco</i> RI	7,8 et 2,5	33-18
<i>Hind</i> III	5,4 et 4,9	33-9
<i>Pvu</i> II	10,3	30-6
<i>Sal</i> I	5,9 et 4,4	33-6
<i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	7,8; 1,4; (0,8 et 0,4)	30-8
<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	4,0; 3,8; 1,9 et (0,6)	30-9
<i>Sal</i> I/ <i>Bgl</i> III	5,8; 4,4 et (0,1)	30-13
<i>Sal</i> I/ <i>Kpn</i> I	5,9 et 4,4	30-12

Tableau 13. Taille des fragments d'ADN obtenus après digestion, par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride pBT3 ou pBR322::*Sal*I-5,9 kb. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel.

6.3.4 - pBR325::EcoRI-3,7 kb ou pBT4 et pBT4.1.

* Les digestions réalisées avec les enzymes *PvuI* et *PvuII* ont permis de déterminer l'orientation de l'insert sur le vecteur et de confirmer la présence d'un site de restriction reconnu par chaque enzyme au niveau du segment *EcoRI* de 3,7 kb (Figure 36, puits 1, 2, 3 et 4). D'autre part, la digestion par *EcoRI* a permis d'estimer la taille de l'insert sous-cloné (Figure 36, puits 8).

* La digestion par *PstI* confirme la présence d'un site au niveau de ce segment de 3,7 kb. En effet, on obtient deux fragments de 8,1 et 1,6 kb (orientation E' ou pBT4.1) sachant qu'il n'existe qu'un site *PstI* au niveau du vecteur (Figure 37, puits 15). Cette digestion permet de préciser la position du site *PstI* à 0,4 kb en aval du premier site *EcoRI* de l'insert de 13,2 kb.

* La triple digestion *EcoRI/PstI/HindIII* donne 6 fragments de 3,5; 2,6; 1,3; 1,2; 0,7 et 0,4 kb (orientation E' ou pBT4.1) (Figure 36, puits 12). Les fragments de 3,5; 1,3 et 1,2 kb proviennent du vecteur et les autres de l'insert. Ces derniers (2,6; 0,7 et 0,4 kb) permettent de préciser les distances séparant les différents sites, à savoir : 0,4 kb pour le fragment *EcoRI-PstI*, 0,7 kb pour le fragment *PstI-HindIII* et 2,6 kb pour le fragment *HindIII-EcoRI*.

Nota : Le tableau 14 reprend les digestions réalisées sur le pBT4 et le tableau 15 celles réalisées sur le pBT4.1.

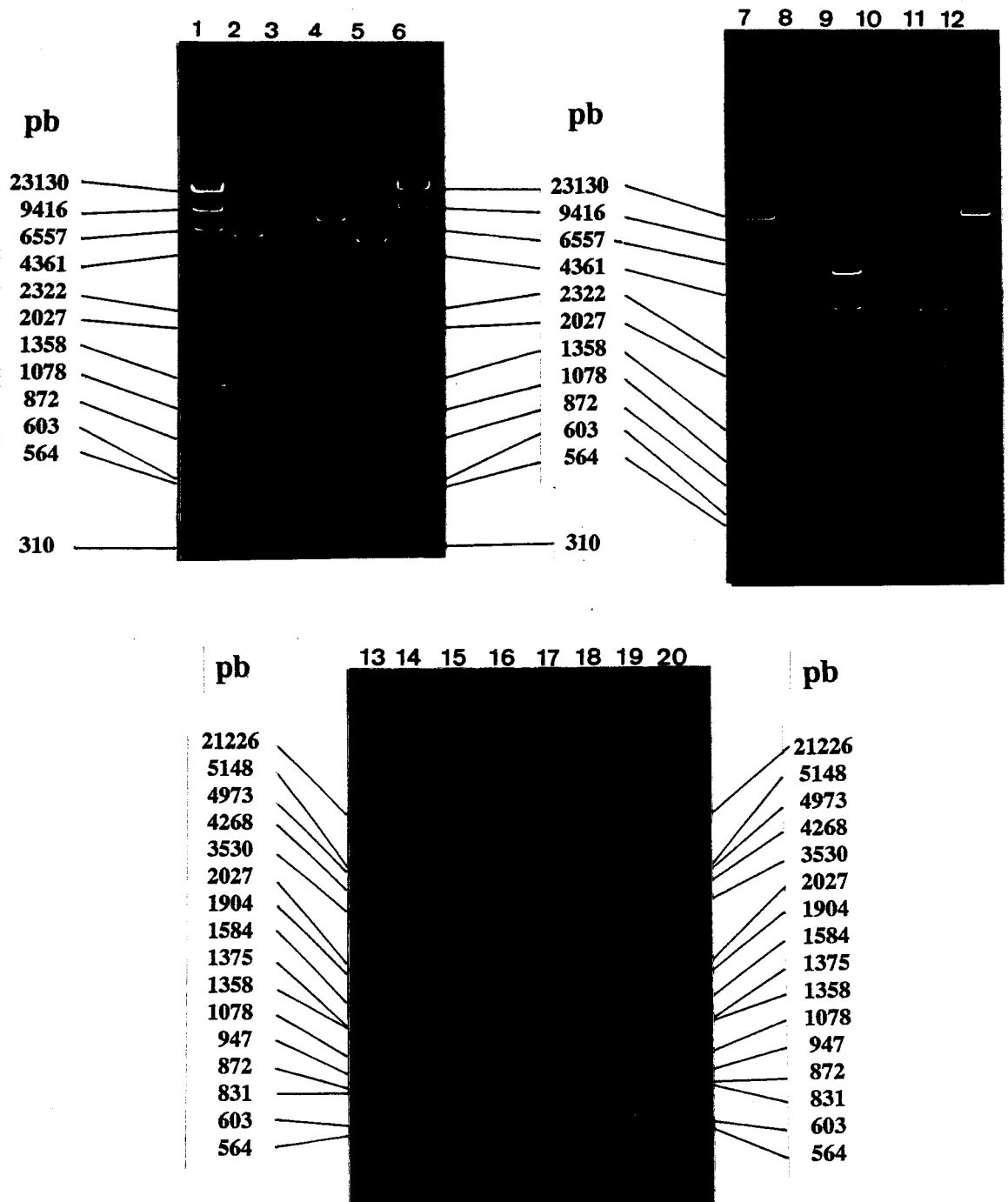


Figure 37. Profils de restriction des vecteurs hybrides pBT4 et pBT4.1. Puits 1, 6, 7 et 12: témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 13 et 20: témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Eco*RI et *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 2: pBT4/*Bgl*III+*Eco*RI; 3: pBT4/*Hind*III+*Pst*I; 4: pBT4/*Pvu*I; 5: pBT4/*Pvu*II; 8: pBR325/*Hind*III; 9: pBT4.1/*Hind*III; 10: pBR325/*Hind*III+*Pvu*I; 11: pBT4.1/*Hind*III+ *Pvu*I; 14: pBR325/*Pst*I; 15: pBT4.1/*Pst*I; 16: pBR325/*Hind*III+*Pst*I; 17: pBT4.1/*Hind*III+*Pst*I; 18: pBR325/*Eco*RI+*Pst*I et 19: pBT4.1/*Eco*RI +*Pst*I.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure/ N° de puits
<i>Ava</i> I	9,7	30-22
<i>Pst</i> I	5,2 et 4,5	30-26
<i>Pvu</i> I*	7,8 et 1,9	36-1
<i>Pvu</i> II*	5,2; 2,8 et 1,7	36-2
<i>Eco</i> RI/ <i>Bgl</i> III	6,0 et 3,7	37-2
<i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I	3,8; 3,5; 1,7 et 0,7	37-3

Tableau 14. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestion par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride pBT4 ou pBR325::*Eco*RI-3,7 kb. * Digestions que l'on retrouve sur d'autres puits : *Pvu*I 37-4 et *Pvu*II 37-5.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure/ N° de puits
<i>EcoRI</i>	6,0 et 3,7	36-8
<i>HindIII</i>	5,8 et 3,9	37-9
<i>PstI</i>	8,1 et 1,6	37-15
<i>PvuI</i>	5,9 et 3,8	36-3
<i>PvuII</i>	4,6; 2,7 et 2,4	36-4
<i>EcoRI/HindIII</i>	4,7; 2,6; 1,3 et 1,1	36-11
<i>EcoRI/PstI</i>	4,8; 3,3; 1,2 et (0,4)	37-19
<i>EcoRI/SalI</i>	4,0; 3,7 et 1,9	36-10
<i>HindIII/PstI</i>	3,9; 3,5; 1,6 et 0,7	37-17
<i>HindIII/PvuI</i>	3,7; 2,2; 2,1 et 1,7	37-11
<i>EcoRI/PstI/HindIII</i>	3,5; 2,6; 1,3; 1,2; 0,7 et (0,4)	36-12

Tableau 15. Taille des fragments d'ADN obtenus, après digestion par différentes enzymes de restriction, du vecteur hybride pBT4.1 ou pBR325::*EcoRI*-3,7 kb. Les fragments entre parenthèses ne sont pas visibles sur le gel.

6.3.5 - pBR325::EcoRI-4,5 kb ou pBT5.

Un seul clone possédant ce vecteur hybride a pu être isolé parmi les 441 clones testés pour les activités pectine méthylestérase et pectate lyase. La taille, ainsi que l'orientation de l'insert sur le vecteur, ont été déterminées après analyse des profils de restriction obtenus par coupure du vecteur hybride par *EcoRI* (Figure 38, puits 13), *BamHI* (Figure 38, puits 6) et *AvaI* (Figure 30, puits 23).

* La digestion du vecteur hybride par *SalI* donne 3 fragments de 5,7; 3,9 et 0,9 kb (Figure 38, puits 8). Ce qui confirme la présence de deux sites *SalI* au niveau du segment *EcoRI* de 4,5 kb et permet de préciser leurs positions ainsi que celle de l'insert sur le vecteur.

* La double digestion *AvaI/EcoRI* qui permet de préciser la position du site *AvaI* sur l'insert de 4,5 kb, se traduit par l'obtention d'un profil composé de 4 bandes de 3,3; 3,3; 2,7 et 1,2 kb (Figure 38, puits 2). Les fragments de 3,3 et 2,7 kb provenant du vecteur et les autres de l'insert.

* La digestion *HpaI/KpnI* donne deux fragments de 10,0 et 0,5 kb; elle permet de préciser la distance séparant ces deux sites au niveau de l'insert.

* La digestion par *HindIII* confirme la présence de deux sites au niveau de l'insert et permet d'affiner leurs positions. On obtient en effet 3 fragments de 4,8; 4,2 et 1,5 kb (Figure 38, puits 7).

Nota : Toutes ces digestions figurent sur le tableau 16 et les cartes de restriction des différents vecteurs recombinants sont représentées sur la figure 39.

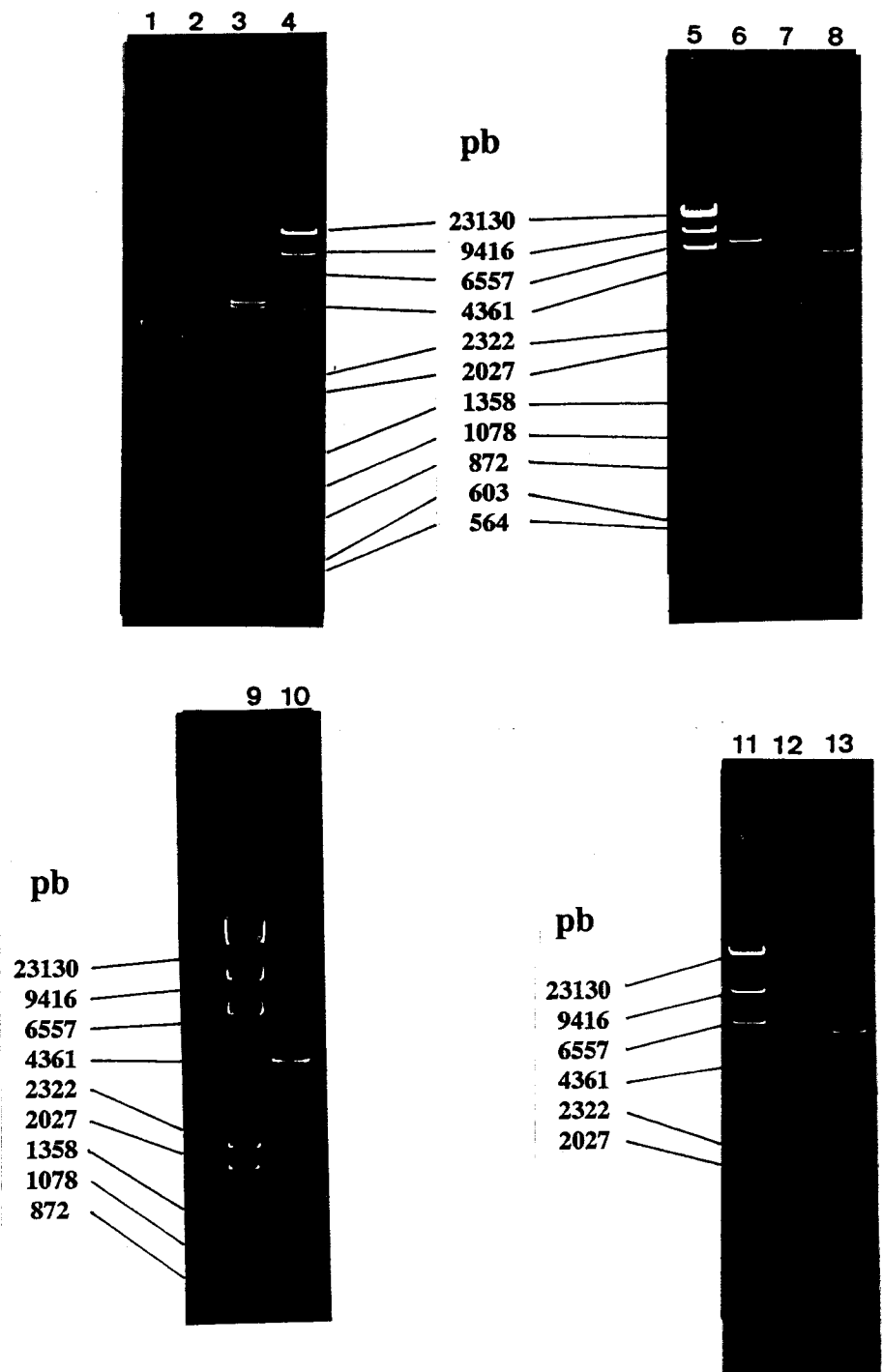


Figure 38. Profils de restriction du vecteur hybride pBT5. Puits 4, 5 et 9: témoins de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III + ADN ØX174 digéré par *Hae*III); 11: témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par *Hind*III); 1: pBT5/*Ava*I+*Pst*I; 2: pBT5/*Ava*I+*Eco*RI; 3: pBT5/*Eco*RI+*Pst*I; 6: pBT5/*Bam*HI; 7: pBT5/*Hind*III; 8: pBT5/*Sa*II; 10: pBT5/*Eco*RI+*Bam*HI; 12: pBT5 non digéré et 13: pBT5/*Eco*RI.

Enzymes utilisées	Taille des fragments d'ADN obtenus (en kb)	N° de figure/ N° de puits
<i>Ava</i> I	6,6 et 3,9	30-23
<i>Bam</i> HI	7,7 et 2,8	38-6
<i>Eco</i> RI	6,0 et 4,5	38-13
<i>Hind</i> III	4,8; 4,2 et 1,5	38-7
<i>Pst</i> I	10,5	30-27
<i>Sal</i> I	5,7; 3,9 et 0,9	38-8
<i>Ava</i> I/ <i>Eco</i> RI	3,3; 3,3; 2,7 et 1,2	38-2
<i>Ava</i> I/ <i>Pst</i> I	4,3; 4,1 et 2,1	38-1
<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I	4,8; 4,5 et 1,2	38-3
<i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	4,5; 3,2; 1,5 et 1,3	38-10

Tableau 16. Taille des fragments d'ADN obtenus après digestion par différentes enzymes de restriction du vecteur hybride pBT5 ou pBR325::*Eco*RI-4,5 kb.

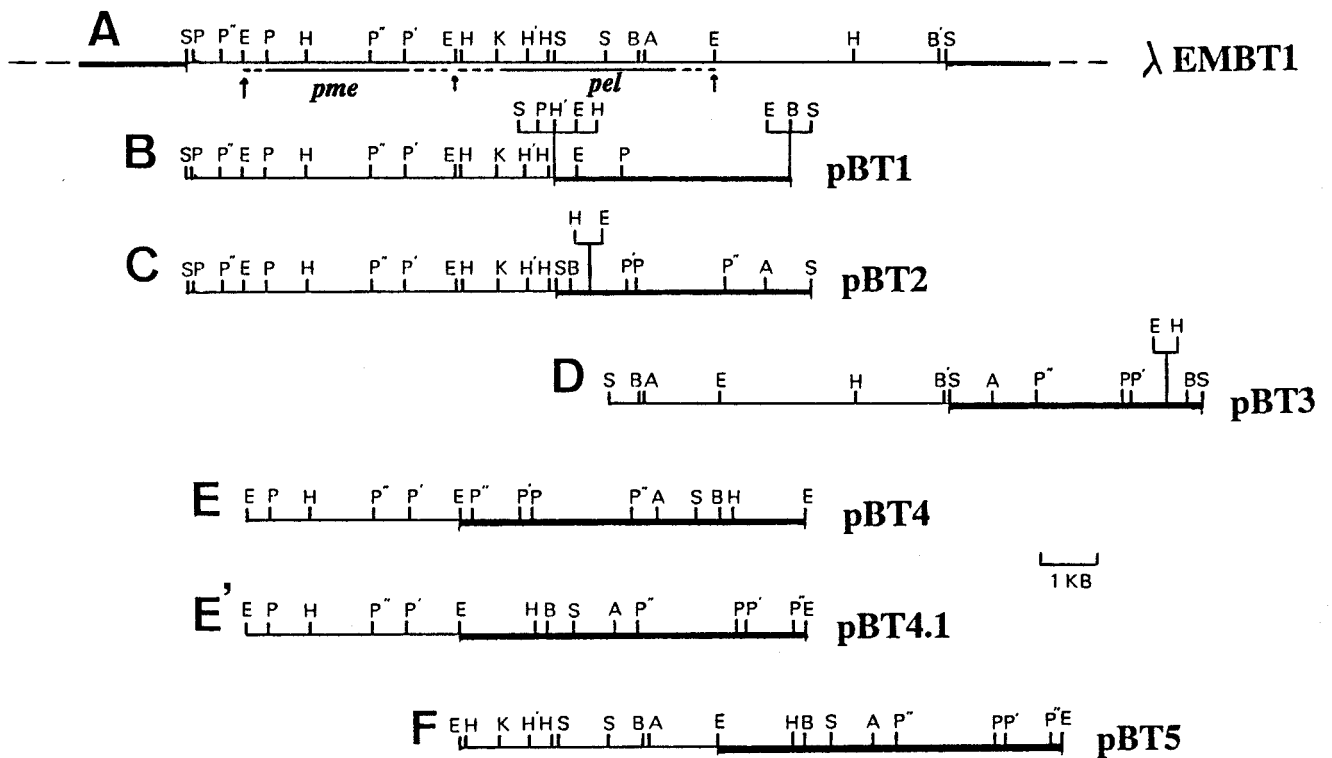


Figure 39. Cartes de restriction des vecteurs utilisés lors des expériences de clonage ou de sous-clonage réalisées chez *E. coli*. A: Insert de 13,2 kb provenant de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 ligaturé au niveau du site *Bam*HI du λEMBL3 (phage PME⁺ PL⁻); B: Fragment *Sal*II de 6,4 kb sous-cloné dans le pDR720 (*E. coli* PME⁺ PL⁻); C: Idem sauf pBR322 (*E. coli* PME⁺ PL⁻); D: Fragment *Sal*II de 5,9 kb sous-cloné dans le pBR322 (*E. coli* PME⁻ PL⁻); E et E': Fragment *Eco*RI de 3,7 kb sous-cloné dans les deux orientations dans le pBR325 (*E. coli* PME⁺ PL⁻) et F: Fragment *Eco*RI de 4,5 kb sous-cloné dans le pBR325 (*E. coli* PME⁻ PL⁺). Abréviations utilisées pour les sites de restriction : A (*Ava*I); B (*Bam*HI); B' (*Bgl*II); E (*Eco*RI); H (*Hind*III); H' (*Hpa*I); K (*Kpn*I); P (*Pst*I); P' (*Pvu*I); P'' (*Pvu*II) et S (*Sal*I).

7 - VERIFICATION DE L'ORIGINE DES FRAGMENTS *EcoRI* DE 3,7 ET 4,5 KB PAR HYBRIDATION.

Les fragments *EcoRI* de 3,7 et 4,5 kb portés par le pBR325, responsables des activités pectine méthylestérase et pectate lyase chez *E. coli*, ont été marqués au ^{35}S -ATP par translation de coupure ("nick translation") et ont été mis en hybridation avec l'ADN chromosomique, digéré par *EcoRI*, des souches : *B. thetaiotaomicron* 217 et 519, *P. ruminicola* NCFB2202, *B. fragilis* 464 et *B. distasonis* 462, ainsi qu'avec l'ADN du bactériophage λ EMBT1 digéré également par *EcoRI* (témoin positif). Ceci, de façon à s'assurer que les deux fragments *EcoRI* proviennent bien de la souche d'origine (*B. thetaiotaomicron* 217).

7.1 - HYBRIDATION AVEC LE FRAGMENT *EcoRI* DE 3,7 KB .

L'autoradiographie révèle la présence de deux bandes d'hybridation avec la sonde pBT4 ($4,5 \times 10^6$ cpm/ μl de sonde). Ces bandes, de même poids moléculaire (3,7 kb) sont associées au témoin positif λ EMBT1 (bande d'hybridation intense) et à l'ADN de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 (bande d'hybridation faible) confirmant de ce fait l'origine de l'insert (Figure 40).

7.2 - HYBRIDATION AVEC LE FRAGMENT *EcoRI* DE 4,5 KB .

Malgré le marquage plus faible de la sonde (2×10^6 cpm/ μl de sonde), l'autoradiographie révèle également la présence de deux bandes d'hybridation d'intensité comparable à celles obtenues lors de l'hybridation précédente (Figure 41). Ces bandes, de même poids moléculaire, correspondent à l'hybridation de la sonde pBT5 à l'ADN du λ EMBT1 et à l'ADN de la souche *B. thetaiotaomicron* 217. L'insert de 4,5 kb porté par le pBR325 provient donc bien de la souche de *B. thetaiotaomicron* 217 puisqu'il s'hybride avec l'ADN génomique de cette dernière. Dans les deux cas, aucune bande d'hybridation n'est observée avec l'ADN génomique des autres souches de *Bacteroides*, ce qui peut s'expliquer par le faible marquage de la sonde et par les conditions d'hybridation (forte "stringence").

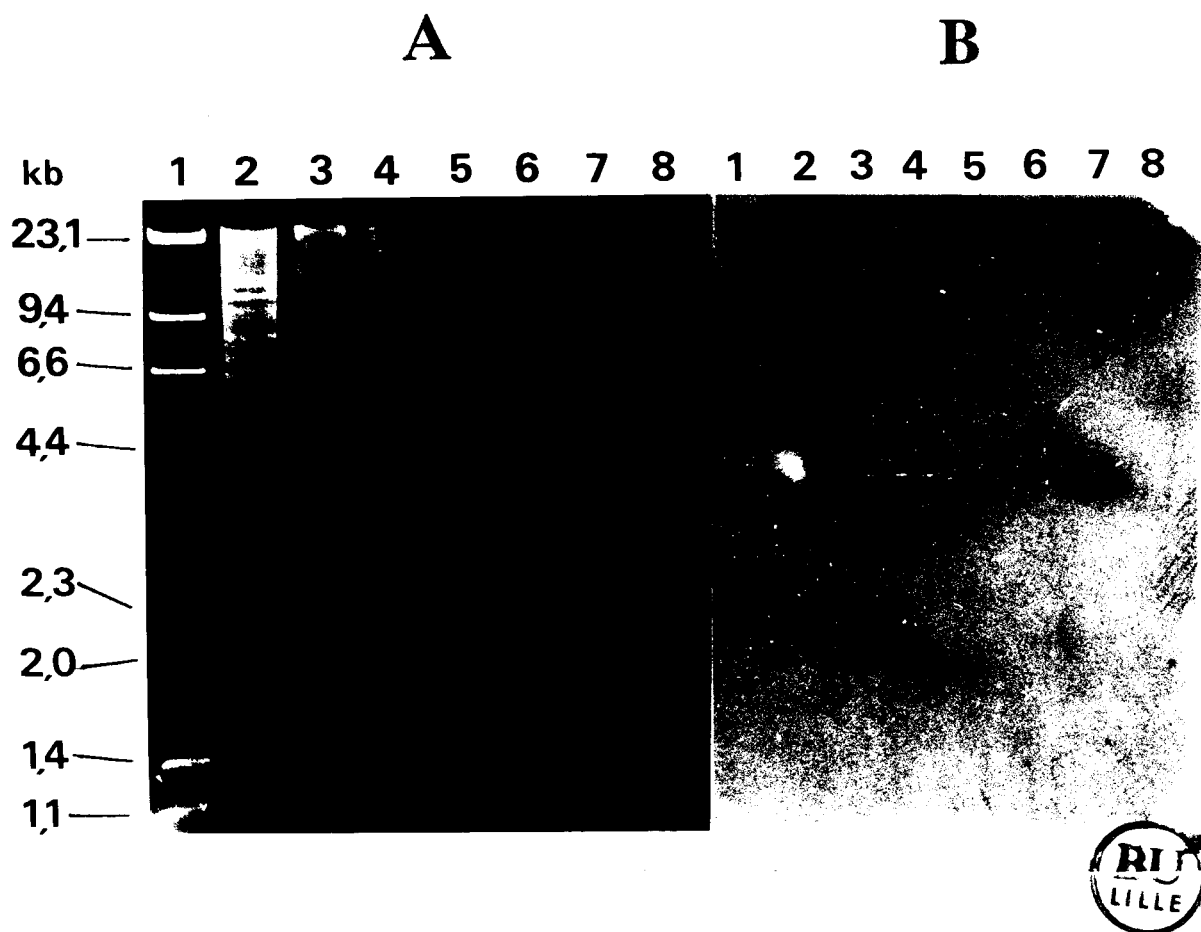


Figure 40. Bandes d'hybridation obtenues après mise en contact de la sonde pBR325::EcoRI-3,7 kb ou pBT4 marquée au ^{35}S avec l'ADN génomique de souches différentes de *Bacteroides* digéré par EcoRI, ainsi qu'avec le vecteur λ EMBT1 digéré par la même enzyme. A: gel d'agarose à 0,8%; et B: membrane d'hybridation ("réplique" du gel). Puits n° 1 et 8: Témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par HindIII associé à l'ADN ØX174 digéré par HaeIII); 2: ADN *B. thetaiotaomicron* 519/EcoRI; 3: ADN *B. fragilis* 464/EcoRI; 4: ADN *B. distasonis* 462; 5: ADN *B. thetaiotaomicron* 217/EcoRI; 6: ADN *P. ruminicola* NCFB 2202/EcoRI et 7: ADN λ EMBT1/EcoRI.

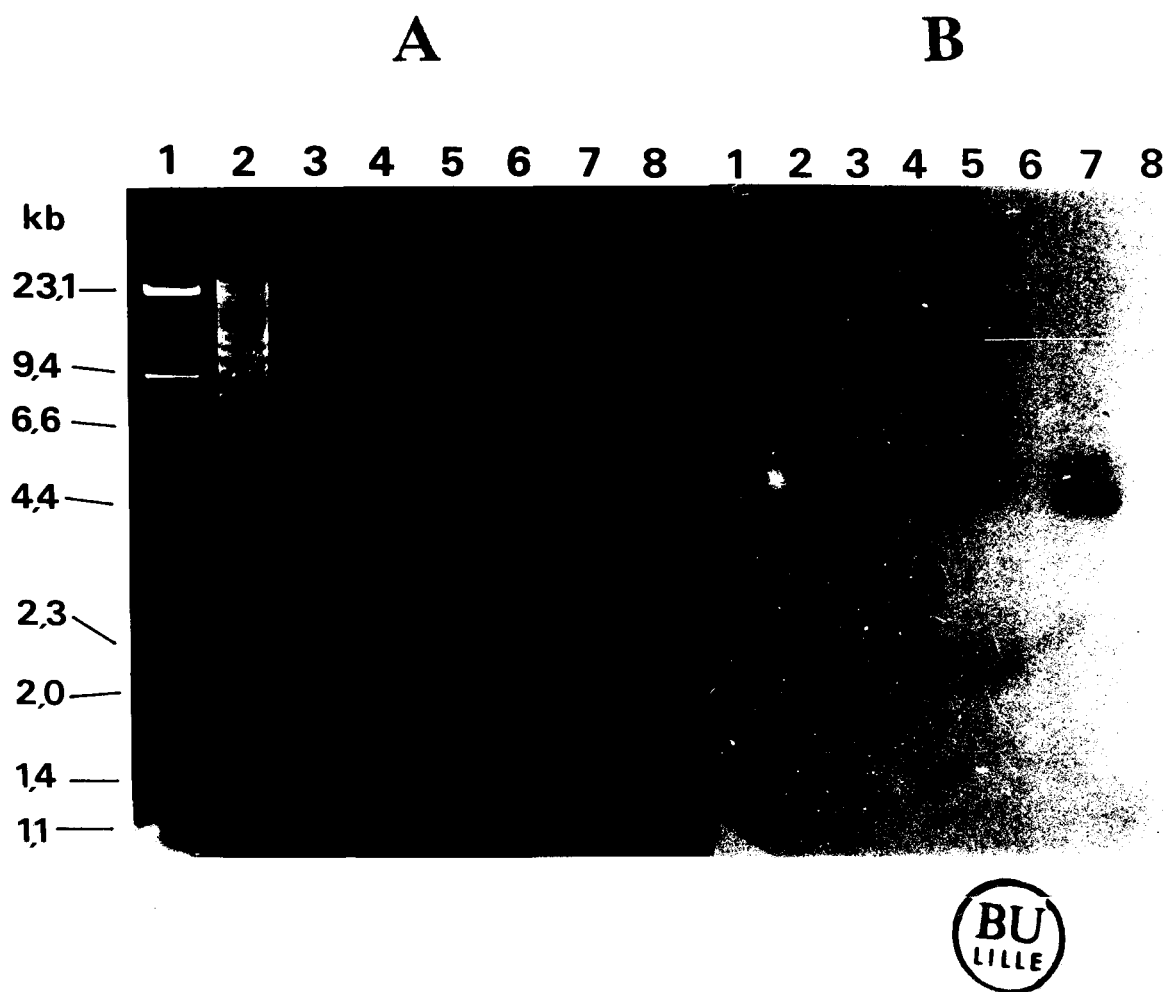


Figure 41. Bandes d'hybridation obtenues après mise en contact de la sonde pBR325::EcoRI-4,5 kb ou pBT5 marquée au ^{35}S avec l'ADN génomique de différentes souches de *Bacteroides* digéré par EcoRI, ainsi qu'avec le vecteur λ EMBT1 digéré par la même enzyme. A: gel d'agarose à 0,8%; et B: membrane d'hybridation ("réplique" du gel). Puits n° 1 et 8: Témoin de poids moléculaire (ADN lambda digéré par HindIII associé à l'ADN \emptyset X174 digéré par HaeIII); 2: ADN *B. thetaiotaomicron* 519/EcoRI; 3: ADN *B. fragilis* 464/EcoRI; 4: ADN *B. distasonis* 462; 5: ADN *B. thetaiotaomicron* 217/EcoRI; 6: ADN *P. ruminicola* NCFB 2202/EcoRI et 7: ADN λ EMBT1/EcoRI.

8 - LOCALISATION ET NIVEAU D'EXPRESSION DES ACTIVITES PECTINE METHYLESTERASE ET PECTATE LYASE CHEZ E. COLI.

La localisation des activités pectine méthylestérase et pectate lyase chez les souches d'*E. coli* HB101 pBT4 et pBT5, c'est-à-dire ayant reçu les inserts *EcoRI* de 3,7 ou 4,5 kb, a été déterminée par réalisation de sphéroplastes ou lyse des bactéries à la presse de French. Les souches ont été cultivées en milieu riche (LB) sans inducteurs jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance; aucun développement n'étant observé en milieu minimum additionné de PGA ou de pectine à 0,5%. Comme nous pouvons le voir sur le tableau 17, les deux activités sont localisées dans des compartiments différents :

* L'activité pectine méthylestérase est associée à la fraction II qui correspond aux sphéroplastes lysés par choc osmotique et est liée à la fraction cyto-périplasmique lorsque les bactéries sont lysées à la presse de French. Sa localisation est donc cytoplasmique chez *E. coli*, constatation qui a été faite à propos de la pectine méthylestérase de *P. solanacearum* synthétisée par *E. coli* (241).

* L'activité pectate lyase présente une distribution inverse c'est-à-dire qu'on la retrouve associée à la fraction I (Tris/ Saccharose/EDTA/lysozyme) et aux membranes lorsque les bactéries sont lysées à la presse de French. Elle est donc essentiellement localisée aux niveau des membranes externes chez *E. coli*. Cette constatation a été faite par Guthrie *et al.* au sujet de la chondroïtine lyase II de *B. thetaiotaomicron* clonée chez *E. coli*, enzyme à localisation périplasmique chez *Bacteroides* et membranaire chez *E. coli* (87).

En ce qui concerne la quantification de l'activité pectate lyase au niveau des différentes fractions (surnageant, FCP et FM) en terme de productivité, c'est-à-dire d'activité rapportée en nombre d'unités d'enzyme par ml de milieu de culture et pour les bactéries lysées à la presse de French, elle est de :

- 0,15 U/ml pour la pectate lyase présente au niveau du surnageant de culture;
- 1,5 U/ml pour celle présente au niveau de la FCP;
- 19 U/ml pour celle associée aux membranes externes.

Les activités pectine méthylestérase et pectate lyase sont donc intracellulaires chez *E. coli* comme chez *B. thetaiotaomicron* mais occupent une localisation différente.

De plus, l'expression des gènes responsables de ces activités devient constitutive chez *E. coli*, puisque ces activités sont mises en évidence à partir d'une culture réalisée en milieu riche sans inducteur, alors qu'elle dépend de la présence, dans le milieu de culture, des inducteurs tels que le PGA ou la pectine chez *B. thetaiotaomicron*.

	PECTINE METHYLESTERASE	PECTATE LYASE
Surnageant (Culture sur LB)	non détectée	faible
Fraction I (TSE, lysozyme)	non détectée	(22,0 U/mg)*
Fraction II (Choc osmotique)	importante	(1,3 U/mg)*
Cyto-périplasmique (Presse de French)	importante	(5,6 U/mg)*
Associée aux membranes (Presse de French)	faible	(26,8 U/mg)*

Tableau 17. Localisation des produits des gènes chez *E. coli* déterminée à partir d'extraits bruts obtenus par lyse des bactéries à la presse de French ou par réalisation de sphéroplastés. Abréviations : TSE = Tris 50 mM Saccharose 25% EDTA 1 mM pH 7,2. * Activité déterminée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4.

Enfin, l'activité spécifique apparente pectate lyase est respectivement 1,5 fois et 15 fois plus élevée aux niveau des fractions cyto-périplasmiques et membranaires d'*E. coli* que de *B. thetaiotaomicron*, bien que le gène soit sous le contrôle de son propre promoteur.

9 - CARACTERISTIQUES DE LA PECTATE LYASE SYNTHETISEE PAR E. COLI.

9.1 - pH OPTIMUM D'ACTIVITE.

Il a été déterminé sur une gamme s'étendant de 7,0 à 11,0 dans le tampon T₂₀ Mg₂ et sur la pectate lyase présente au niveau de la FCP. On observe sur la courbe un optimum bien marqué à 9,5 avec un écart d'activité important entre pH 9,0/9,5 et 10,5/11,0 (Figure 42). La pectate lyase synthétisée par *E. coli* présente donc un pH optimum d'action différent de celle de *Bacteroides* : 9,5 pour *E. coli* contre 8,4 pour *Bacteroides*.

9.2 - TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION.

Etudiée sur la pectate lyase présente au niveau de la FCP d'*E. coli* en utilisant les tampons T₂₀ Mg₂ pH 8,4 et T₂₀ Mg₂ pH 9,5 pour une gamme de températures comprises entre 30 et 65°C, et en mesurant la variation de D.O à 235 nm au cours de la première minute de la réaction.

* Dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4, la variation de D.O augmente progressivement entre 30 et 50°C, avec un optimum d'activité à 50°C, comme pour la pectate lyase synthétisée par *Bacteroides* (Figure 43).

* Dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 9,5, la variation de D.O augmente également de façon progressive avec un optimum à 45°C (Figure 43). Dans tous les cas, quel que soit le tampon utilisé, on observe une chute rapide d'activité pour des températures supérieures à 55°C.

Lorsque l'on compare les courbes de température optimale des pectate lyases synthétisées par *B. thetaiotaomicron* 217 et par *E. coli*, on s'aperçoit qu'elles se superposent pratiquement entre 40 et 55°C, avec un pic d'activité situé à 50°C. Cependant, la courbe d'activité de la pectate lyase synthétisée par *E. coli* s'infléchit fortement pour une température de 60°C contrairement à celle observée chez *B. thetaiotaomicron* 217 (Figure 44).

Les pectate lyases synthétisées par *E. coli* et *Bacteroides* ont donc des températures optimales d'action voisines mais l'enzyme synthétisée par *E. coli* est-elle thermostable à 50°C ?

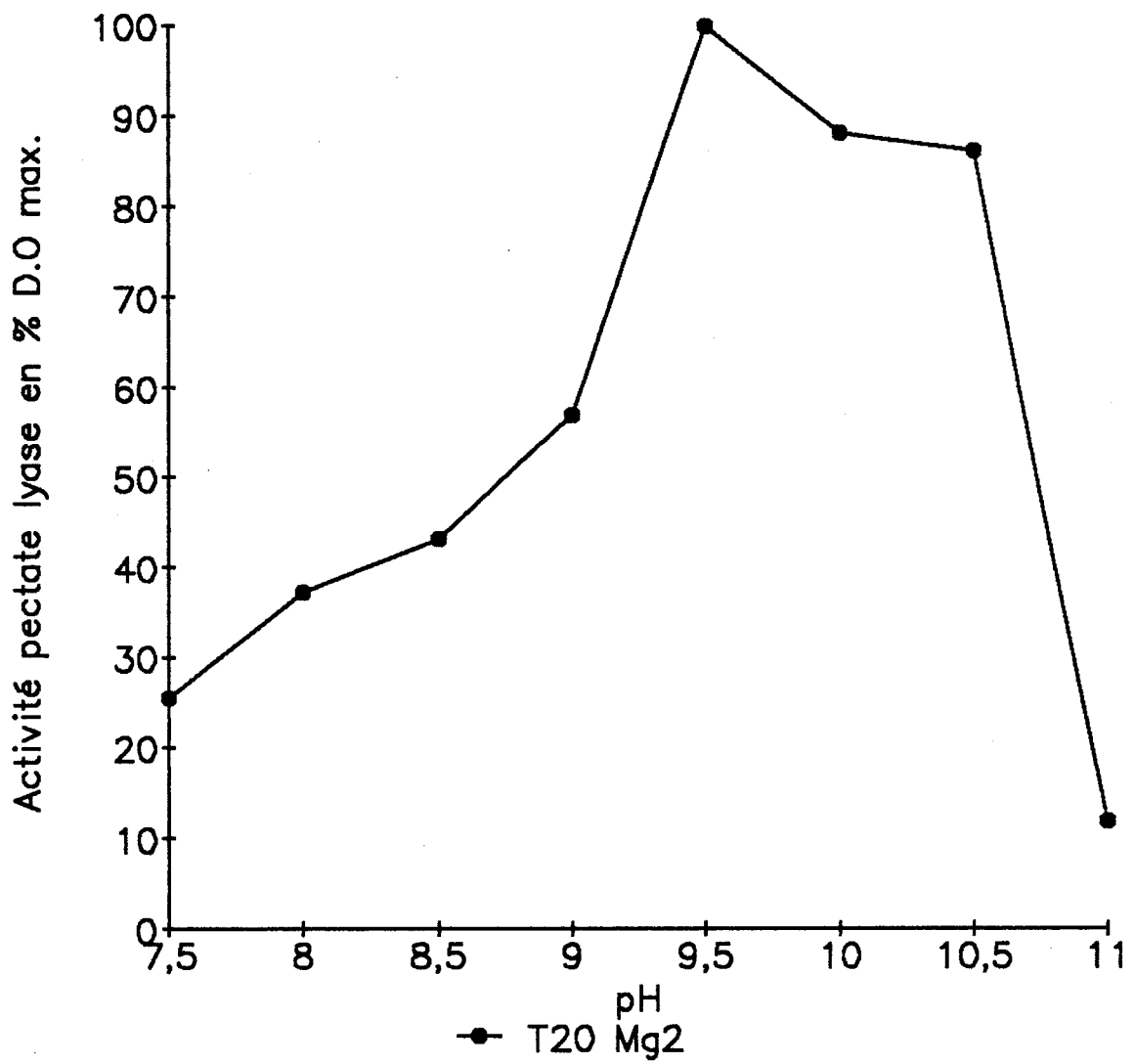


Figure 42. pH optimum de la pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche d'*E. coli* pBT5.

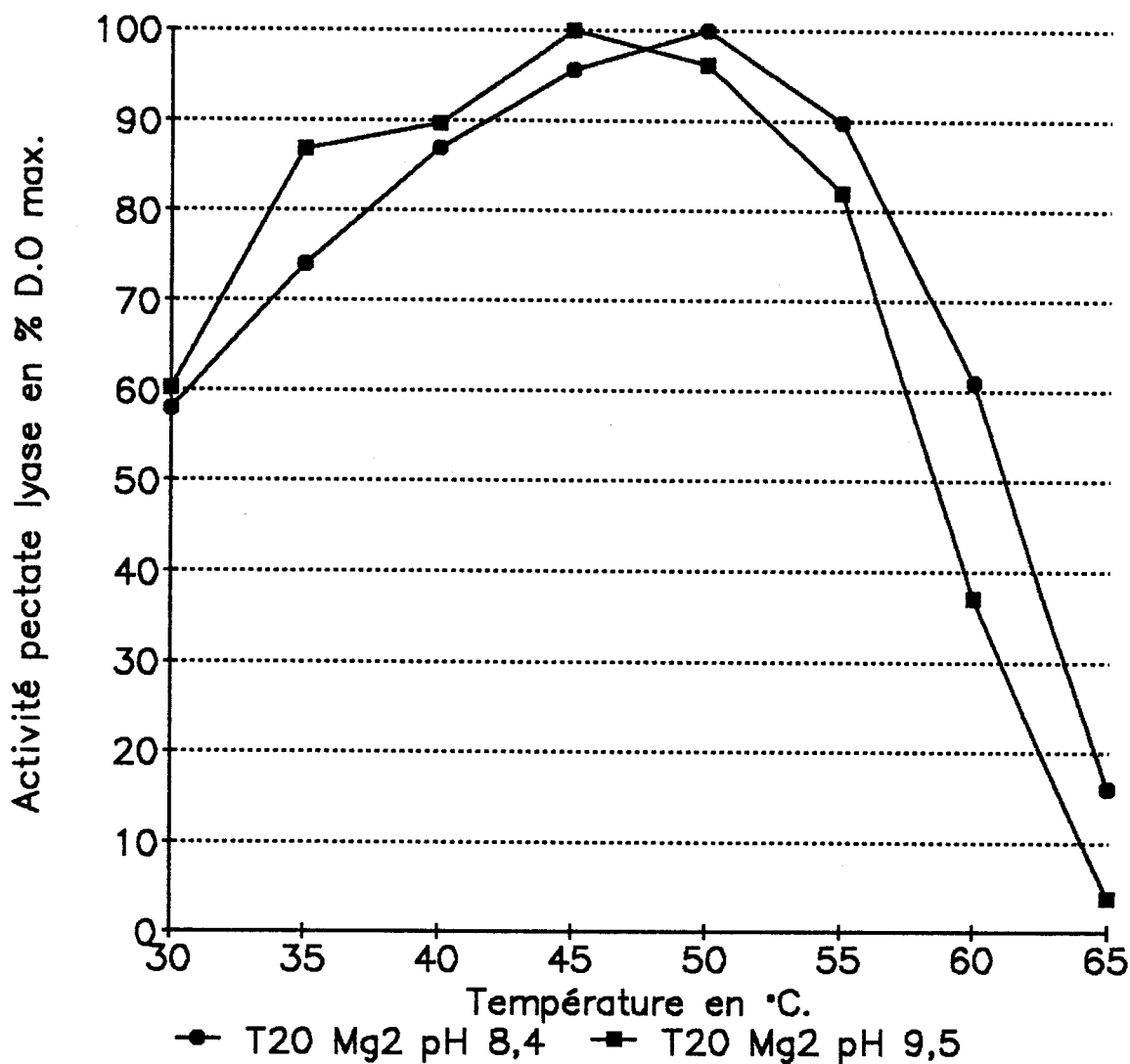


Figure 43. Températures optimales d'action de la pectate lyase présente au niveau de la fraction cyto-périplasmique de la souche d'*E. coli* PL⁺ (pBT5) mesurées dans les tampons T₂₀Mg₂ pH 8,4 ou 9,5.

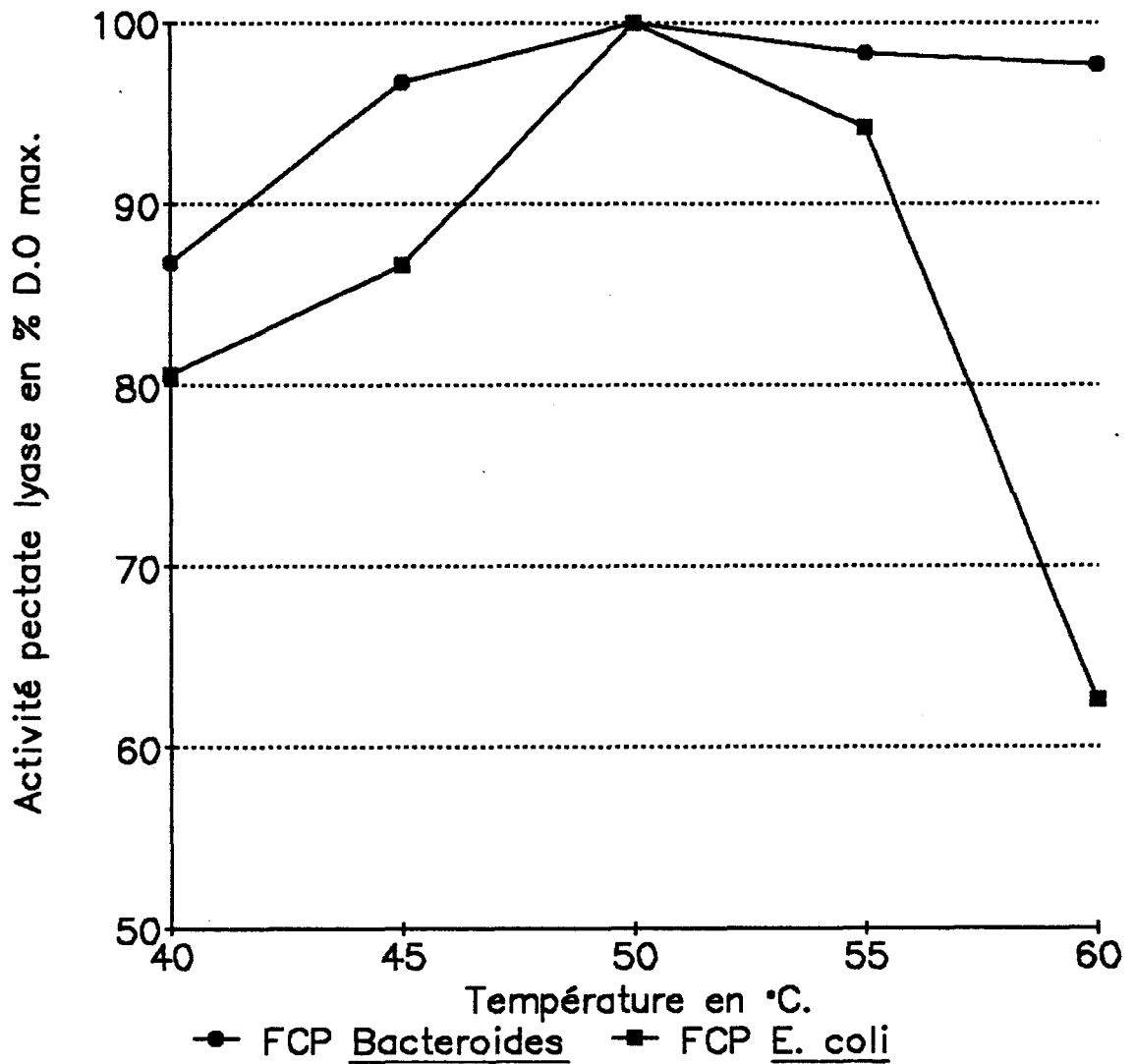


Figure 44. Température optimale de l'activité pectate lyase présente au niveau des fractions cyto-périplasmiques des souches de *B. thetaiotaomicron* 217 et d'*E. coli* PL⁺ (pBT5). Activité mesurée à 235 nm et dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4.

9.3 - THERMOSTABILITE A 50°C.

Évaluée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 à 37°C sur la fraction cyto-périplasmique pour des temps d'exposition à 50°C variant de 2 mn 30 s à 10 mn. Comme nous pouvons l'observer sur la courbe, la dénaturation thermique de l'enzyme est très rapide à 50°C avec une perte d'activité de 55% au bout de 2 mn 30 s d'exposition (Figure 45). L'enzyme synthétisée par *E. coli* n'est donc pas thermostable à 50°C contrairement à celle de *Bacteroides*.

9.4 - INFLUENCE DES IONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITE.

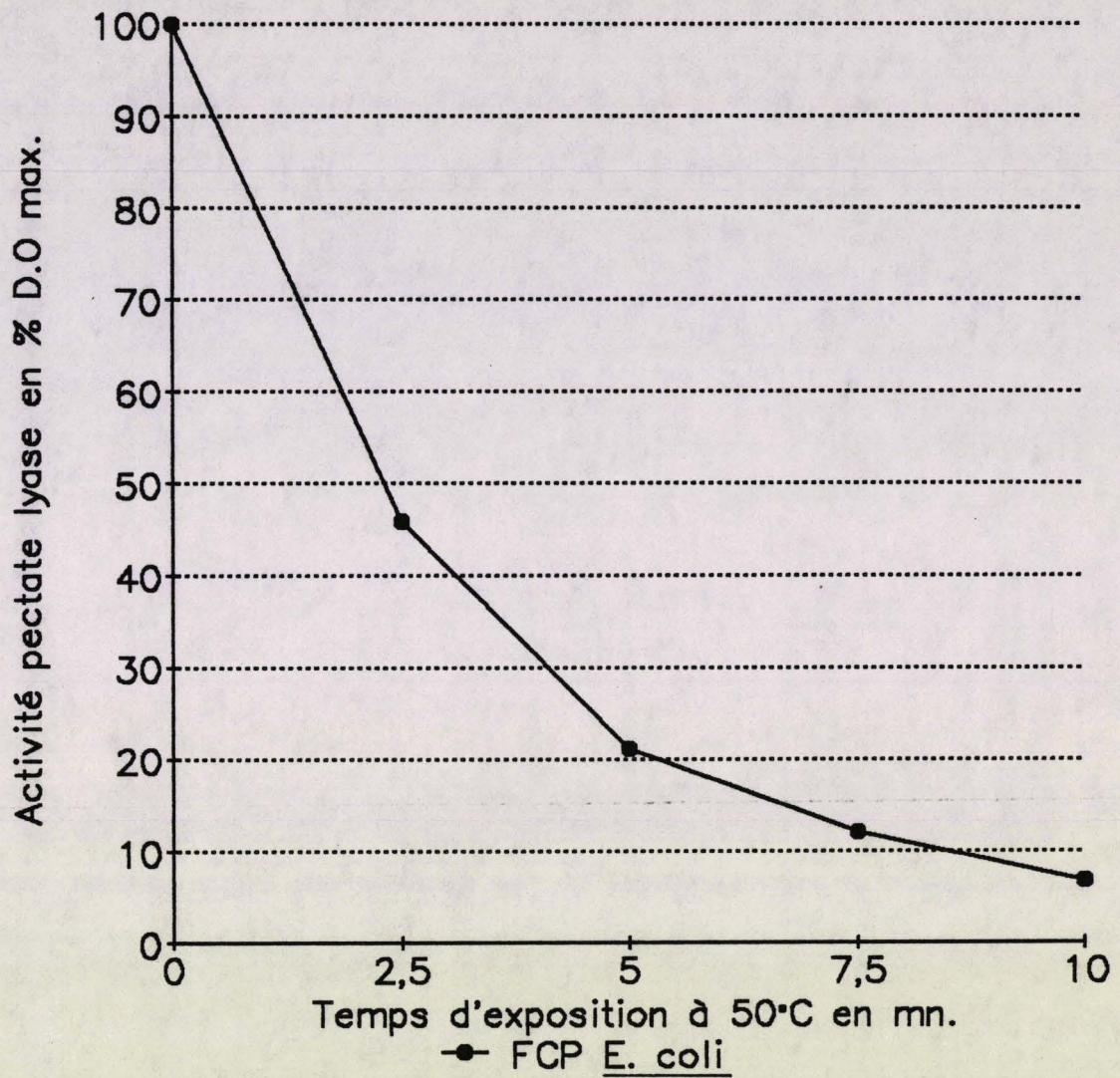
Cette influence a été testée sur les fractions cyto-périplasmique ou membranaire d'*E. coli* PL⁺ (pBT5), obtenues après lyse des bactéries à la presse de French, en utilisant le tampon T₂₀ pH 8,4 et avec des concentrations en ions divalents correspondant aux valeurs d'activation optimales pour la pectate lyase de *B. thetaiotaomicron* 217, c'est-à-dire CaCl₂ 0,2 mM ou MgSO₄ 2 mM.

Il en résulte que les ions Ca⁺⁺ n'exercent plus d'effet activateur sur la pectate lyase synthétisée par *E. coli* contrairement à celle de *B. thetaiotaomicron*, puisqu'en présence de CaCl₂ 0,2 mM, on observe une variation de D.O à 235 nm identique à celle du témoin (tampon T₂₀ pH 8,4). Par contre, les ions Mg⁺⁺, à la concentration de 2 mM, exercent un effet activateur très important sur la pectate lyase synthétisée par *E. coli* puisqu'on observe un niveau d'activité environ 10 fois plus élevé par rapport au T₂₀ ou T₂₀ Ca_{0,2} pH 8,4 (Figure 46).

On a également étudié l'influence de la concentration en MgSO₄ (comprise entre 1 et 5 mM) sur l'activité pectate lyase présente dans la fraction cyto-périplasmique (FCP) d'*E. coli*, en utilisant le tampon T₂₀ pH 8,4. Comme nous pouvons le voir sur la courbe, la concentration optimale en MgSO₄ est de 3 mM pour la pectate lyase présente dans la FCP d'*E. coli* contre 2 mM pour celle de *Bacteroides* (Figure 47). Les concentrations optimales d'activation pour les ions Mg⁺⁺ sont donc très proches dans les deux cas.

9.5 - MODE D'ACTION.

Déterminé par mesure de la diminution de viscosité d'une solution de PGA à 1% préparée dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4, à partir de la fraction cyto-périplasmique de la souche d'*E. coli* recombinante pour l'activité pectate lyase (souche portant le pBT5). On incube l'équivalent d'une unité d'activité pectate lyase (50 µl de fraction) dans 15 ml de tampon à 37°C et on



Courbe de dénaturation thermique à 50°C

Figure 45. Thermostabilité à 50°C de la pectate lyase associée à la fraction cytopériplasmique de la souche d'*E. coli* pBT5.

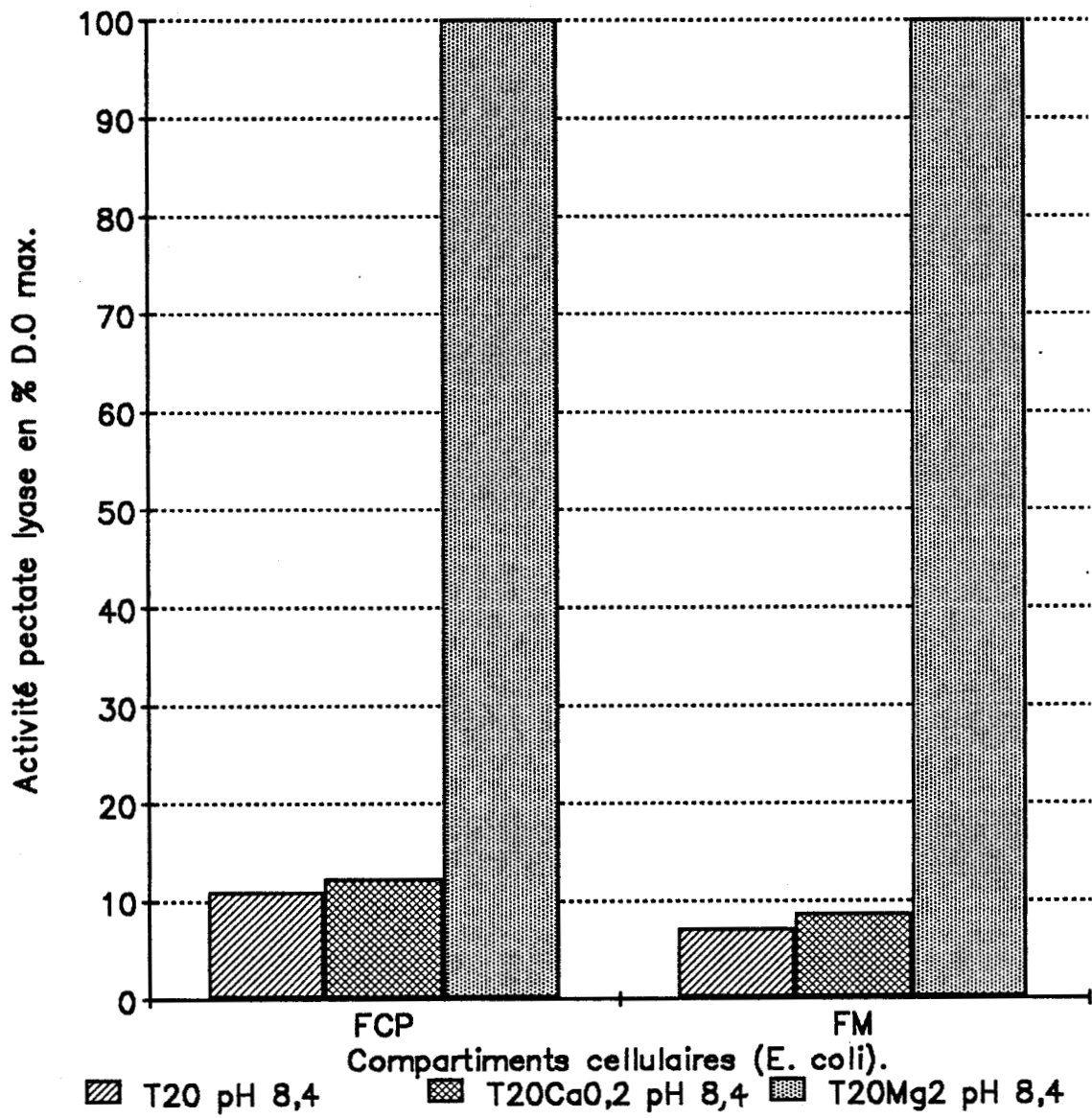


Figure 46. Effet activateur des ions Mg^{++} sur l'activité pectate lyase présente au niveau des fractions cyto-périplasmique et membranaire de la souche d'*E. coli* pBT5 (PL⁺), activité mesurée à 235 nm.

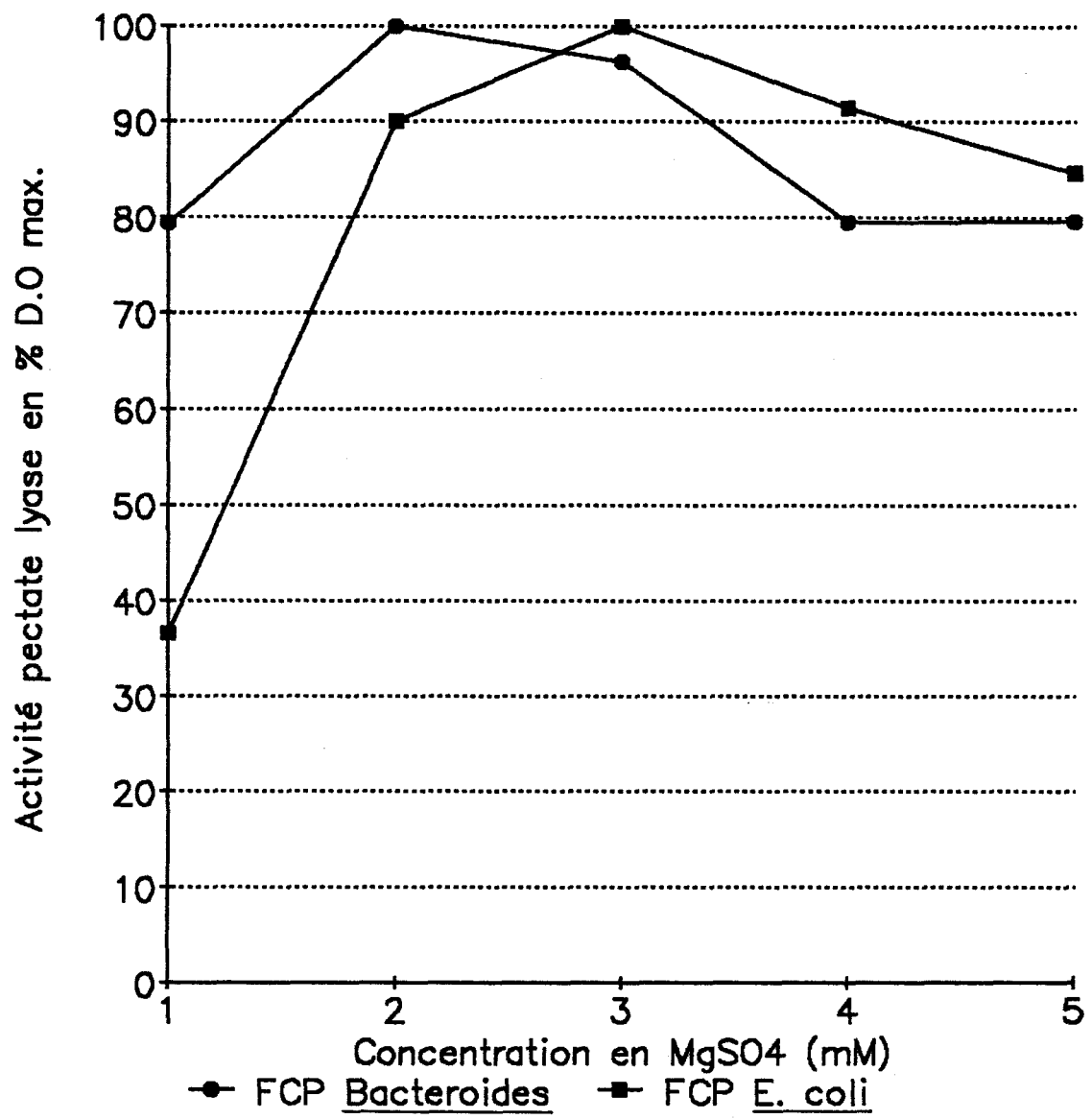


Figure 47. Influence des ions Mg^{++} sur l'activité pectate lyase associée aux fractions cyto-périplasmiques des souches de *B. thetaiotaomicron* 217 et d'*E. coli* PL⁺ (pBT5). Activité mesurée à 235 nm et dans le tampon T₂₀ pH 8,4.

mesure la variation de viscosité toutes les 5 mn. Cette variation est très rapide puisqu'au bout de 20 mn, on enregistre une chute d'environ 50% de la viscosité (temps d'écoulement de 33 s contre 43 s pour le temps initial), ce qui correspond à la formation de 170 μg de sucres réducteurs par ml de milieu réactionnel. Pour une diminution de viscosité de 100%, on a 2000 $\mu\text{g/ml}$ de sucres réducteurs formés, ce qui nous donne un rapport de 8,5% (quantité de sucres réducteurs formés à 50% de chute de viscosité sur quantité de sucres réducteurs formés à 100% de chute de viscosité). On peut donc en conclure qu'il s'agit toujours d'une activité endo chez *E. coli*. Ce chiffre a été confirmé par le rapport des sucres insaturés à 235 nm formés à 50% et 100% de diminution de viscosité, il est de 0,08/0,95 soit 8,4%.

9.6 - CONSERVATION A -20°C.

Excellente puisqu'aucune perte d'activité n'a pu être mise en évidence après 6 mois de stockage à -20°C.

9.7 - CONCLUSION.

La pectate lyase synthétisée par *E. coli* possède des propriétés biochimiques sensiblement identiques à celle produite par *B. thetaiotaomicron* 217. Cependant, on constate un certain nombre de divergences concernant notamment les niveaux d'activité, la localisation, la stabilité à 50°C, l'influence des ions Ca^{++} ainsi que le pH optimum (Tableau 18).

	<i>BACTEROIDES</i>	<i>E. COLI</i>
Localisation	cyto-périplasmique	membrane externe
Mode d'action	type endo	type endo
Inductibilité	+++	-
Niveau d'activité* :		
FM	1,8 U/mg	26,8 U/mg
FCP	3,3 U/mg	5,6 U/mg
pH optimum	8,4	9,5
T° optimale	50°C	50°C
Thermorésistance à 50°C	+++	-
Effet Ca ⁺⁺	activateur	aucun
Effet Mg ⁺⁺	activateur (2mM)	activateur (3mM)

Tableau 18. Comparaison des propriétés biochimiques des pectate lyases synthétisées par *E. coli* pBT5 et *B. thetaiotaomicron* 217. *FCP : Fraction cyto-périplasmique et FM : Fraction membranaire.

10 - MISE EN EVIDENCE SUR MILIEU DE CULTURE GELOSE DES CLONES D'E. COLI RECOMBINANTS POUR LES ACTIVITES PECTINE METHYLESTERASE ET PECTATE LYASE.

Les clones d'*E. coli* portant les plasmides recombinants pBT4 (PME⁺) et pBT5 (PL⁺) ont été repiqués sur milieu de Luria gélosé additionné de pectine ou de PGA à la concentration finale de 0,5%. Au bout de 3 jours d'incubation à 37°C, les colonies ont été traitées par différents agents révélateurs des activités de dégradation des pectines à savoir : le bromure de cétyle triméthylammonium à 1% (Figure 48), le rouge de ruthénium à 0,04% (Figure 49) ou encore l'acétate de cuivre à 10% (Figure 50). Les résultats obtenus figurent sur le tableau 19. Dans tous les cas, le Luria gélosé additionné de pectine s'avère être le milieu de détection de choix puisqu'il permet de mettre en évidence les deux activités. D'autre part, les résultats les plus nets ont été obtenus avec le CTAB. Ce détergent entraîne une lyse des bactéries et une libération massive des activités clonées. Ces activités paraissent insensibles à l'action du détergent (elles sont faiblement inhibées par le SDS à 1%) puisque les halos observés initialement se renforcent voire s'agrandissent au cours du temps. Enfin, on observe une dépression autour des clones d'*E. coli* recombinants pour l'activité pectine méthylestérase, dépression due vraisemblablement à la libération de méthanol.

Ces résultats montrent que la pectate lyase synthétisée par *E. coli* et *a fortiori* par la souche *B. thetaiotaomicron* 217, est capable de dégrader une pectine faiblement méthylée (degré d'estérification de 46% pour la pectine de citron utilisée) sans l'aide de la pectine méthylestérase, puisqu'un halo de clarification est observé sur Luria gélosé additionné de pectine à 0,5%, pour le clone d'*E. coli* pBT5 (PL⁺).

De façon à déterminer plus précisément l'efficacité d'action de la pectate lyase synthétisée par *E. coli*, nous avons incubé 20 μ l de fraction cyto-périplasmique correspondant à 1 unité d'activité pectate lyase, dans le tampon T₂₀ Mg₂ pH 8,4 en présence de pectine de citron à 0,1% ou de PGA à 0,1% (témoin) et avons suivi l'évolution de la D.O à 235 nm au cours du temps. Il en résulte que la variation de D.O est très lente, de l'ordre de 0,1 unité d'absorbance par mn dans le tampon contenant la pectine contre 0,9 U/mn dans le tampon contenant le PGA (Figure 51). Autrement dit, bien que la pectate lyase soit capable de dégrader la pectine de citron, la vitesse de dégradation du substrat est 9 x plus lente sur pectine de D.E égal à 46% que sur polygalacturonate.

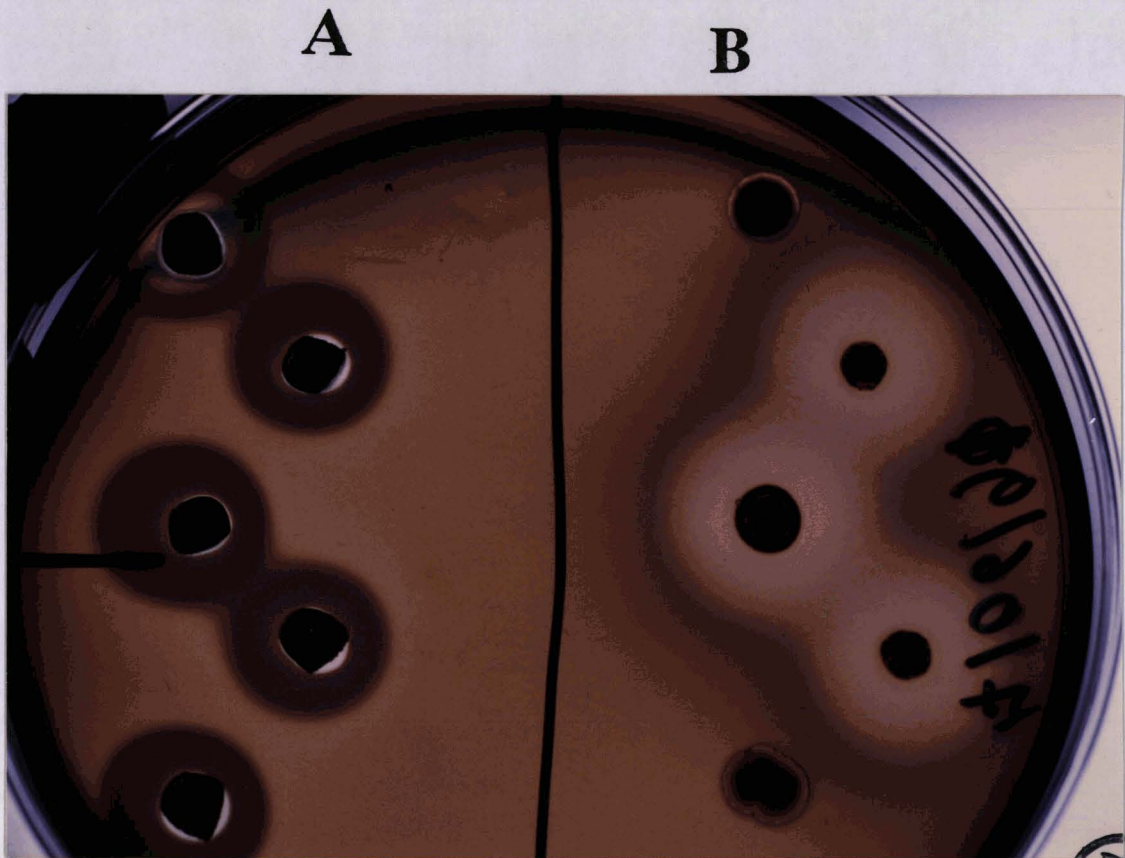


Figure 48. A: Halos d'opacification présents autour des clones d'*E.coli* PME⁺ (pBT4) et B: Halos de clarification présents autour des clones d'*E.coli* PL⁺ (pBT5) observés après précipitation au CTAB, en milieu de Luria additionné de pectine à 0,5%.

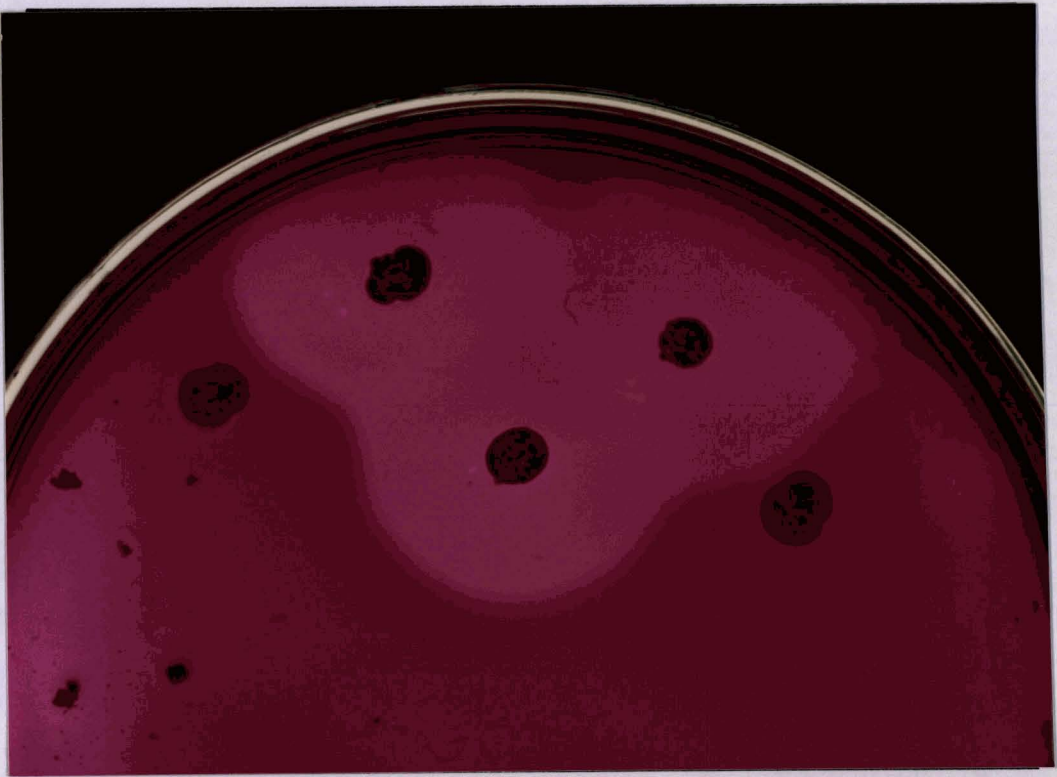
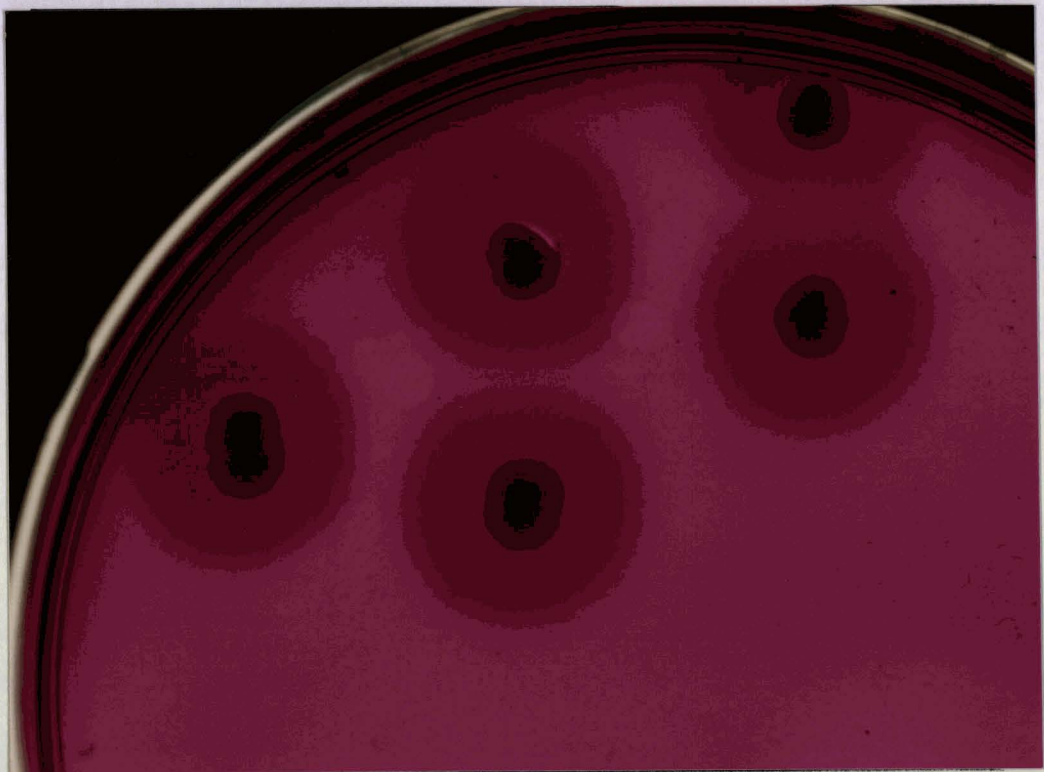
A**B**

Figure 49. A: Halos de décoloration présents autour des clones d'*E.coli* PL⁺ (pBT5); et B: Halos rouges foncés présents autour des clones d'*E.coli* PME⁺ (pBT4) observés après révélation au rouge de ruthénium à 0,05%, en milieu de Luria additionné de pectine à 0,5%.

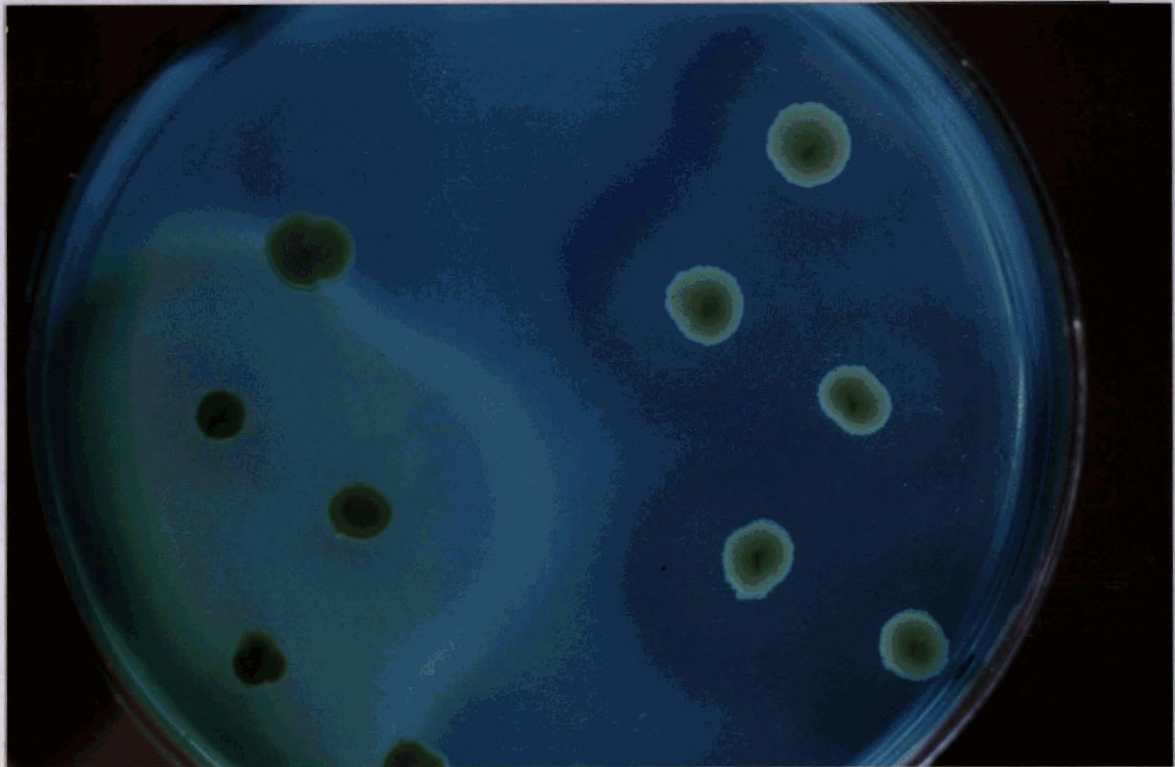
A**B**

Figure 50. A: Halos d'opacification présents autour des clones d'*E. coli* PL⁺ (pBT5) et B: Halos de clarification présents autour des clones d'*E. coli* PME⁺ (pBT4) observés après précipitation à l'acétate de cuivre à 10%, en milieu de Luria additionné de pectine à 0,5%.

	<i>E. coli</i> PME ⁺	<i>E. coli</i> PL ⁺
LB + PGA (1)	Rien	Halo clair
LB + Pectine (1)	Halo opaque + Dépression	Halo clair
LB + PGA (2)	Rien	Halo rose sur fond rouge
LB + Pectine (2)	Halo rouge foncé sur fond rouge + dépression	Halo rose sur fond rouge
LB + PGA (3)	Rien	Opacification
LB + Pectine (3)	Halo clair + dépression	Opacification plus nette

Tableau 19. Phénotype pectinolytique sur milieu de Luria gélosé additionné de PGA ou de pectine à 0,5%, des souches d'*E. coli* recombinantes pour les activités pectine méthylestérase et pectate lyase. (1) : précipitation par le bromure de cétyle triméthylammonium à 1%, (2) : coloration au rouge de ruthénium à 0,05% et (3) : précipitation par l'acétate de cuivre à 10%.

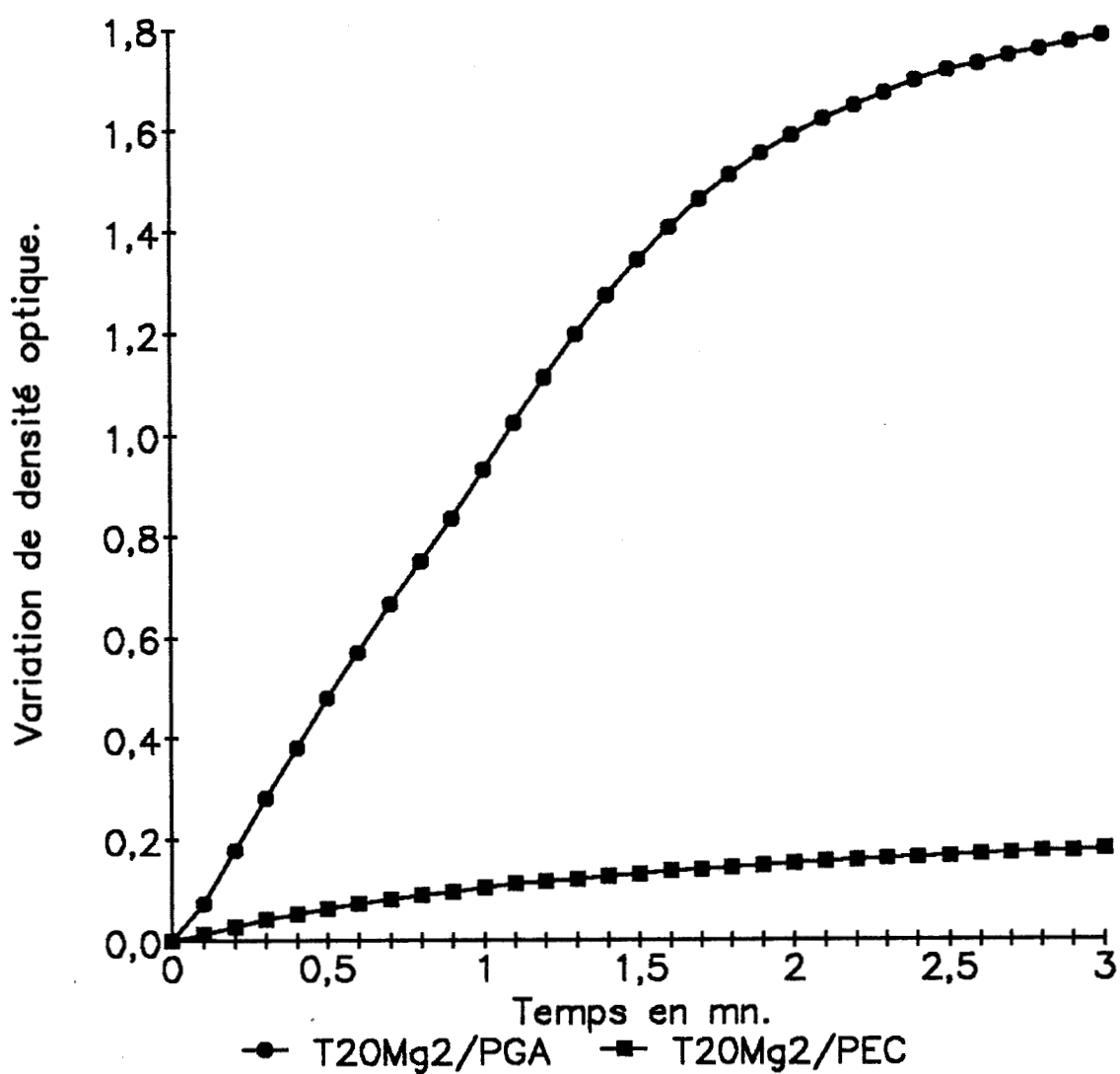


Figure 51. Cinétiques de dégradation de la pectine de citron (T₂₀Mg₂/PEC) et du PGA (T₂₀Mg₂/PGA) par la pectate lyase associée à la fraction cyto-périplasmique de la souche d'*E. coli* PL⁺ (pBT5).

CONCLUSION

Trois paramètres interviennent de façon essentielle dans la réalisation d'une banque d'ADN et dans le criblage des clones recombinants, autrement dit dans le clonage d'un gène particulier : la souche, le vecteur et le milieu de détection. Nous avons donc été amenés à effectuer une série de choix qui nous ont permis, après un certain nombre d'essais infructueux, de cloner avec succès des gènes dont les produits sont impliqués dans la dégradation des pectines. Ceci afin d'étudier leur expression chez *E. coli* et la façon dont ils sont organisés et régulés chez *Bacteroides*.

Le travail préliminaire au clonage a permis de montrer que sur la collection de 56 souches appartenant au genre *Bacteroides*, seules 9 souches étaient capables de dégrader les pectines. Ces souches appartiennent aux espèces *thetaiotaomicron*, *fragilis*, *distasonis* et *ruminicola*. Cinq souches parmi ces 9 sont capables de se développer rapidement en milieu minimum additionné de pectine, ces souches (4 sur 5) appartiennent essentiellement à l'espèce *thetaiotaomicron*. C'est donc cette espèce qui a été retenue pour la suite des travaux et plus précisément la souche 217 qui présentait une taille importante de halo de dégradation de la pectine ainsi qu'une activité pectate lyase spécifique apparente élevée au niveau du surnageant de culture.

Les caractéristiques biochimiques des polygalacturonase et pectate lyase ont été précisées en ce qui concerne leur mode d'action, leur pH optimum, leur température optimale, leur thermostabilité à 50°C et 60°C et l'effet des ions divalents sur les activités. D'autre part, leur localisation a été déterminée et des tests d'induction de ces activités réalisés, ce qui a permis de mettre en évidence que seuls le PGA et la pectine sont inducteurs pour les trois activités. Les résultats obtenus étant en accord avec les travaux effectués précédemment sur les enzymes pectinolytiques de l'espèce *thetaiotaomicron* (154,155) sauf en ce qui concerne le mode d'action de la polygalacturonase et l'influence des ions Mn^{++} et Mg^{++} sur l'activité pectate lyase.

En ce qui concerne le clonage proprement dit, un résultat positif a été obtenu seulement avec la banque d'ADN génomique réalisée dans le vecteur phagique lambda EMBL3, bien que la probabilité d'avoir cloné une séquence d'ADN particulière était de 95% dans le cas du pBR322 et de 98,6% dans le cas du pHC79, considérant le nombre de clones recombinants testés et la taille des fragments d'ADN insérés sur ces vecteurs. L'avantage du vecteur phagique étant qu'à l'issue du cycle lytique les bactéries infectées sont lysées entraînant de ce fait, une libération massive de ou des activités clonées, ce qui facilite leur détection. Cependant, lors de travaux réalisés ultérieurement, concernant en particulier le sous-clonage des fragments *EcoRI* de 3,7 et 4,5 kb au niveau du pBR325, les activités de déméthylation et de dépolymérisation sont clairement mises en évidence au bout de 3 jours d'incubation après précipitation par le CTAB pour les clones recombinants d'*E. coli* cultivés sur milieu riche gélosé additionné de

pectine à 0,5%. Ce qui signifie que l'activité clonée chez *E. coli* est libérée en quantité suffisante pour rendre sa détection possible sans devoir recourir à une lyse massive des colonies. Donc les résultats négatifs obtenus avec les vecteurs pBR322 et pH79 étaient vraisemblablement dus au milieu de détection qui était inapproprié, plutôt qu'aux vecteurs employés. De plus, ces vecteurs ont été utilisés avec succès pour cloner un certain nombre de gènes codant pour des pectinases provenant de genres bactériens divers (43,124,198,260,278,285).

Dans le cas du bactériophage, il fallait mettre au point un test de détection permettant une mise en évidence directe des activités clonées. Les seuls tests de détection directe décrits dans la littérature et qui avaient été utilisés avec succès pour cloner des enzymes pectinolytiques à action dépolymérisante, étaient basés sur la formation d'une dépression sur gel de polygalacturonate de calcium (27,43,260,278,282). Or, les plages de lyses obtenues sur ce type de gel étaient de très petite taille en comparaison avec un gel témoin à 0,7% sans CaCl₂. De plus, en présence de NaCl à 0,25% et pour une concentration en CaCl₂ suffisante pour former un gel en présence de PGA à 2%, la prise en gel était instantanée et non homogène. En outre, le CaCl₂ devenait inhibiteur pour l'activité pectate lyase quand il se trouvait à concentration supérieure à 0,5 mM contrairement aux ions Mg⁺⁺ qui restaient activateurs à fortes concentrations. Nous avons en conséquence, mis au point un milieu de détection à base d'ions Mg⁺⁺, permettant d'obtenir un gel de polygalacturonate, tout en ayant des plages de lyse de taille suffisante, et qui ne soit pas inhibiteur pour l'activité pectate lyase. Il a donc été nécessaire de trouver le bon rapport PGA/Mg⁺⁺ puisque le PGA aussi bien en présence d'ions Ca⁺⁺ que d'ions Mg⁺⁺ limite le nombre et la taille des plages de lyses. En effet, le PGA acquiert une structure réticulée en présence d'ions divalents, ce qui limite la propagation du phage au niveau du tapis bactérien.

Le bactériophage recombinant pectinolytique a ensuite été purifié, amplifié et le stock ainsi obtenu a servi à infecter une culture d'*E. coli* LE392 en milieu liquide. Les tests d'activités effectués au niveau du surnageant de lyse ont permis de révéler la présence de deux activités complémentaires de dégradation des pectines : activités pectine méthylestérase (PME) et pectate lyase (PL). Les gènes de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 codant pour les activités PME et PL s'expriment donc correctement chez *E. coli* et sont proches l'un de l'autre sur le chromosome puisque présents sur le même insert.

La taille de l'insert a été estimée à 13,2 kb après digestion du vecteur recombinant par *SaII*, et la carte de restriction de l'insert a été établie, ce qui a permis de déterminer plus précisément l'emplacement des gènes responsables des activités PME (gène *pme*) et PL (gène *pel*) par sous-clonage des fragments *SaII* dans les vecteurs pDR720 et pBR322, et *EcoRI* dans le vecteur pBR325.

Le sous-clonage des inserts *EcoRI* de 3,7 et 4,5 kb dans le pBR325 réalisé chez *E. coli*, a permis d'étudier l'expression séparée des gènes *pme* et *pel* de *Bacteroides* et d'en déduire qu'ils possèdent leur propre promoteur et constituent très vraisemblablement des unités de transcription indépendantes comme chez *E. chrysanthemi* (106,130,186,191,192), et comme dans le cas des gènes codant pour les xylanase et xylosidase de *B. ovatus* (269). De plus, dans le cas de l'insert de 3,7 kb, une activité pectine méthylestérase est mise en évidence quelle que soit l'orientation de l'insert sur le vecteur, confirmant de ce fait que le gène *pme* est sous le contrôle de son propre promoteur. Cette constatation a également été faite en ce qui concerne le gène *pme* d'*E. chrysanthemi* (186) et des gènes codant pour les endoPLs d'*E. chrysanthemi* (43,56,57,124,125,190,282), ainsi que pour gènes codant pour les endo-glucanases de *F. succinogenes* (248), β -glucanase de *F. succinogenes* (109), xylanases de *P. ruminicola* (267) et de *F. succinogenes* (234).

Les produits des gènes synthétisés par *E. coli*, bien que parfaitement fonctionnels, possèdent des caractéristiques biochimiques quelque peu différentes de celles décrites pour *B. thetaiotaomicron* 217. En ce qui concerne la pectate lyase, les différences portent sur le pH optimum, la thermostabilité et l'influence des ions Ca^{++} sur l'activité (Tableau 18). En outre, les tests d'activités réalisés sur milieux gélosés à partir des clones recombinants d'*E. coli*, ont permis de montrer que la pectate lyase était capable de dégrader un substrat moyennement méthylé et qu'il était possible d'utiliser un seul milieu pour révéler deux activités différentes, en l'occurrence PME et PL.

Le fait que la souche d'*E. coli* recombinante pour l'activité pectate lyase (pBT5) soit incapable de se développer en milieu minimum additionné de pectine ou de PGA s'explique par le fait qu'il lui manque l'enzyme permettant de dégrader les oligogalacturonates en galacturonate, en l'occurrence l'oligogalacturonate lyase.

D'autre part, chez *E. coli*, la localisation des activités est différente par rapport à celle observée chez *Bacteroides* : cytoplasmique pour la pectine méthylestérase, constatation qui a également été faite par Spok *et al.* pour la pectine méthylestérase de *P. solanacearum* (241); et associée aux membranes externes pour la pectate lyase, observation qui a également été faite par Guthrie *et al.* au sujet de la chondroïtine lyase II de *B. thetaiotaomicron* (87). Cependant, en ce qui concerne les gènes codant pour les pectate lyases d'*Erwinia*, dans la plupart des cas; la localisation est périplasmique chez *E. coli* (12,43,124,125,135,185,190,255,285).

De plus, les activités qui étaient inductibles par la pectine ou le PGA chez *Bacteroides*, deviennent constitutives chez *E. coli*, constatation faite à propos des pectate lyases d'*E. chrysanthemi* (43,124,125), de la pectine lyase d'*E. carotovora* (157), de la xylanase de *P. ruminicola* (267) et de *F. succinogenes* (234).

En outre, le niveau d'activité pectate lyase est supérieur chez *E. coli*, respectivement 1,5 fois au niveau de la fraction cyto-périplasmique et 15 fois au niveau de la fraction membranaire. Aucune quantification d'activité n'ayant été réalisée pour la pectine méthylestérase que se soit chez *E. coli* ou chez *Bacteroides*.

Enfin, l'hybridation des vecteurs recombinants pBT4 (PME) et pBT5 (PL) en présence de l'ADN génomique de la souche *B. thetaiotaomicron* 217 a permis de confirmer l'origine de l'ADN sous-cloné.

En ce qui concerne les développements actuels et futurs, nous exploiterons essentiellement deux axes de recherches qui sont :

1/ La partie génétique, pour laquelle nous allons entreprendre le séquençage du fragment *EcoRI* de 4,5 kb, ainsi que l'étude de l'expression des gènes codant pour les pectine méthylestérase et pectate lyase chez d'autres souches de *Bacteroides* par sous-clonage dans le vecteur pRRI207. D'autre part, le séquençage du fragment *EcoRI* de 3,7 kb a été confié à l'équipe de H.J. Flint du Rowett Research Institute (Ecosse); et l'étude de l'expression chez *Bacillus*, du gène codant pour la pectine méthylestérase sera réalisée par l'équipe de D. Ehrlich de l'INRA 2000 de Jouy-en-Josas. Le séquençage des gènes *pme* et *pel* devrait permettre de préciser la structure de ces gènes, la façon dont ils sont régulés, de découvrir des régions homologues en effectuant des comparaisons de séquences avec les gènes *pel* et *pme* provenant d'autres genres bactériens déjà séquencés et de disposer de sondes *pel* et *pme* spécifiques permettant de rechercher la présence de ces gènes chez d'autres espèces de *Bacteroides* et chez d'autres genres bactériens tels que *Bacillus* ou *Ruminococcus*. En admettant que le gène *pel* de *Bacteroides* partage certaines homologues avec celui de *Bacillus subtilis*, la sonde *pel* permettrait de détecter la présence du gène *pel* de *B. subtilis* dans une banque d'ADN génomique. Ce qui permettrait de cloner ce gène *pel*, puisque jusqu'à présent les différentes banques d'ADN génomiques qui ont été construites chez *E. coli*, n'ont donné aucun résultat, suggérant de ce fait que le gène *pel* de *B. subtilis* ne s'exprimait pas chez *E. coli*, ou que son produit n'était pas stable ou pas mature chez *E. coli* (169).

2/ La partie biochimique, pour laquelle il sera nécessaire de purifier les enzymes produites par *E. coli* et *Bacteroides*, afin d'en étudier plus précisément certains paramètres biochimiques tels que les pI, PM et Km. De même, la mise en évidence des activités par transfert des protéines sur gel d'agarose tamponné, après migration sur gel de polyacrylamide en conditions non ou faiblement dénaturantes, devrait permettre de confirmer leur PM et de révéler la présence éventuelle d'isoenzymes. De plus, l'analyse des produits de dégradation des polygalacturonase et pectate lyase par chromatographie sur papier devrait permettre de préciser leur mode d'action. Le clonage des gènes responsables des activités polygalacturonase et

oligogalacturonate lyase (si elle existe chez *Bacteroides*) devrait permettre de connaître la façon dont ces gènes sont régulés, de préciser le rôle respectif qu'ils tiennent dans la dégradation des pectines et les relations qui les lient aux gènes *pel* et *pme*. Enfin, il serait intéressant d'étudier les propriétés biochimiques des pectinases produites par ~~certaines~~ espèces de *Bacteroides* telles que *B. distasonis* qui, pour le moment n'ont pas été caractérisées. → d'autres

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Albersheim, P. 1966. Pectin lyase from fungi enzyme of complex saccharide utilization. *Meth. Enzymol.* 8:628-631.
- 2 - Aldridge, K.E., C.V. Sanders, A. Janney, S. Faro, and R.L. Marier. 1984. Comparison of the activities of penicillin G and new β -lactam antibiotics against clinical isolates of *Bacteroides* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:410-413.
- 3 - Allen, C., Y. Huang, and L. Sequeira. 1991. Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 4:147-154.
- 4 - 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.
- 5 - Anderson, B.J., C.L. Kristo, J.R. Egerton, and J.S. Mattick. 1986. Variation in the structural subunit and basal protein antigens of *Bacteroides nodosus* fimbriae. *J. Bacteriol.* 166:453-460.
- 6 - 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.
- 7 - Anderson, K.L., and A.A. Salyers. 1989b. Genetic evidence that outer membrane binding of starch is required for starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* 171:3199-3204.
- 8 - Andro, T., J.P. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. Van Gijsegem, and A. Coleno. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacteriol.* 160:1199-1203.
- 9 - 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.
- 10 - Bailey, M.J., and E. Pessa. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.* 12:266-271.
- 11 - Baron, A., and J.F. Thibault. 1985. Les enzymes pectinolytiques. Hydrolases et dépolymérasés : enzymes d'intérêt industriel. A. Mouranche et C. Costes. *Biochimie appliquée*. Editions Gauthier-Villars, pp.143-164.
- 12 - Barras, F., K.K. Thurn, and A.K. Chatterjee. 1987. Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 209:319-325.
- 13 - Berg, J.O., L. Lindquist, and C.E. Nord. 1980. Purification of glycosides hydrolases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:40-47.

- 14 - Billington, S.J., M. Mitchison, B. Adler and J.I. Rood. 1990. Identification and genetic mapping of proteins encoded in the fimbrial subunit gene region of *Bacteroides nodosus*. *Vet. Microbiol.* **22**:53-68.
- 15 - 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.
- 16 - Boccara, M., and V. Chatain. 1989. Regulation and role in pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pectin methylesterase. *J. Bacteriol.* **171**:4085-4087.
- 17 - Bokkenheuser, V.D., C.H.L. Shackelton, and J. Winter. 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *J. Biochem.* **248**:953-956.
- 18 - Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
- 19 - Bolivar, F. 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI*-generated recombinant DNA molecules. *Gene* **4**:121-136.
- 20 - 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.
- 21 - Boyer, H.W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
- 22 - Breuil, J., C. Burnat, O. Patey, and A. Dublanchet. 1989. Survey of *Bacteroides fragilis* susceptibility patterns in France. *J. Antimicrob. Chem.* **24**:69-75.
- 23 - Brondz, I., and I. Olsen. 1991. Multivariate analyses of cellular fatty acids in *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella* and *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **29**:183-189.
- 24 - Brondz, I., I. Olsen, M. Haapasalo, and J.V. Winkelhoff. 1991. Multivariate analyses of fatty acid data from whole-cell methanolsates of *Prevotella*, *Bacteroides* and *Porphyromonas* spp. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1445-1452.
- 25 - Brook, I., J.C. Coolbaugh, and R.I. Walker. 1984. Pathogenicity of piliated and encapsulated *Bacteroides fragilis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **3**:207-209.
- 26 - Brook, I. 1989. Pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* group. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **19**:360-376.

- 27 - Brooks, A.D., S.Y. He, S. Gold, N.T. Keen, A. Collmer, and S.W. Hutcheson. 1990. Molecular cloning of the structural gene for exopolysaccharide lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product. J. Bacteriol. 172:6950-6958.
- 28 - Brown, E.M. 1984. The *in-vitro* susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group to amoxicillin-clavulanic acid. J. Antimicrob. Chemother. 14:367-372.
- 29 - Bryant, M.P., L.M. Robinson, C. Bouma, and A. Chu. 1958. *Bacteroides ruminicola* nov. sp. and the new genus and species *Succinimonas amylolytica* species of succinic acid producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. J. Bacteriol. 76:15-23.
- 30 - Caldwell, D.R., and C. Arcand. 1974. Inorganic and metal-organic growth requirements of the genus *Bacteroides*. J. Bacteriol. 120:322-333.
- 31 - Carlier, J.P. 1985. La chromatographie en phase gazeuse des produits de fermentation : son application dans le diagnostic des bactéries anaérobies. Bull. Inst. Pasteur 83:57-69.
- 32 - Caspari, O., and J.M. Macy. 1983. The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. Arch. Microbiol. 135:16-24.
- 33 - Cavicchioli, R., P.D. East, and K. Watson. 1991. *endAFS*, a novel family-E endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* AR1. J. Bacteriol. 173:3265-3268.
- 34 - Chatterjee, A.K., G.E. Buchanan, M.K. Behrens, and M.P. Starr. 1979. Synthesis and excretion of polygalacturonic acid transeliminase (PATE) in *Erwinia*, *Yersinia* and *Klebsiella* species. Can. J. Microbiol. 25:94-102.
- 35 - Chatterjee, A.K., K.K. Thurn, and D.J. Tyrell. 1985. Isolation and characterization of *Tn5* insertion mutants of *Erwinia chrysanthemi* that are deficient in polygalacturonate catabolic enzymes oligogalacturonate lyase and 3-deoxy-D-glycero-2,5-hexodiulosonic dehydrogenase. J. Bacteriol. 162:708-714.
- 36 - Chatterjee, A., J.L. McEvoy, J.P. Chambost, F. Blasco, and A.K. Chatterjee. 1991. Nucleotide sequence and molecular characterization of *pnlA*, the structural gene for damage-inducible pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*-71. J. Bacteriol. 173:1765-1769.
- 37 - Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria - Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114.
- 38 - Collins, M.D., H.N. Shah, and T. Mitsuoka. 1985. Reclassification of *Bacteroides microfus* (Kaneuchi and Mitsuoka) in a new genus *Rikenella*, as *Rikenella microfus* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6:79-81.
- 39 - 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.

- 40 - Collins, M.D., and H.N. Shah. 1986b. Reclassification of *Bacteroides praeacutus* Tissier (Holdeman and Moore) in a new genus *Tissierella*, as *Tissierella praeacutus* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **36**:461-463.
- 41 - Collins, M.D., and H.N. Shah. 1987. Recent advances in the taxonomy of the genus *Bacteroides*. In Recent Advances in Anaerobic Bacteriology, Edited by S.P. Borellio *et al.* Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp. 249-258.
- 42 - Collmer, A., C.H. Whalen, S.V. Beer, and D.F. Bateman. 1982. An exo-poly- α -D-galacturonosidase implicated in the regulation of extracellular pectate lyase production in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **149**:626-634.
- 43 - Collmer, A., C. Schoedel, D.L. Roeder, J.L. Ried, and J.F. Rissler. 1985. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase. J. Bacteriol. **161**:913-920.
- 44 - Collmer, A., and N.T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. **24**:383-409.
- 45 - Collmer, A., J.L. Ried, and M.S. Mount. 1988. Assay methods for pectic enzymes. Meth. Enzymol. **161**:329-334.
- 46 - Condemine, G., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy. 1984. An enzyme in the pectinolytic pathway of *Erwinia chrysanthemi* : 2 keto-3 deoxygluconate oxidoreductase. J. Gen. Microbiol. **130**:2839-2844.
- 47 - Condemine, G., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy. 1986. Isolation of *Erwinia chrysanthemi kduD* mutants altered in pectin degradation. J. Bacteriol. **165**:937-941.
- 48 - Cornick, N.A., G.J. Cuchural, D.R. Snyderman, N.V. Jacobus, P. Iannini, G. Hill, T. Cleary, J.P. O'Keefe, C. Pierson, and S.M. Finegold. 1990. The antimicrobial susceptibility patterns of the *Bacteroides fragilis* group in the United States, 1987. J. Antimicrob. Chemother. **25**:1011-1019.
- 49 - 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*. In S. Hasnain (ed.), Proc. 5th Can Bioenergy R. and D. Semin. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., Barking, England, pp. 573-576.
- 50 - Cruickshank, R.H., and G.C. Wade. 1980. Detection of pectic enzymes in pectin acrylamide gels. Anal. Biochem. **107**:177-181.
- 51 - Davé, B.A., and R.H. Vaughn. 1971. Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. J. Bacteriol. **108**:166-174.

- 52 - Dewhist, F.E., B.J. Paster, S. Lafontaine, and J.I. Rood.** 1990. Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage, 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov. Transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge, 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov. and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter* and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the gamma-division of *Proteobacteria* on the basis of 16S rRNA sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:426-433.
- 53 - 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.
- 54 - Dickinson, D.P., M.A. Kubinieć, 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.
- 55 - Dillon, J.A., A. Nasim, and E.R. Nestmann.** 1985. Transformation of *Enterobacteriaceae*. In *Recombinant DNA methodology*, John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 81-83.
- 56 - Diolez, A., and A. Coleno.** 1985. *Mu-lac* insertion-directed mutagenesis in a pectate lyase gene of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **163**:913-917.
- 57 - Diolez, A., F. Richaud, and A. Coleno.** 1986. Pectate lyase gene regulatory mutants of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **167**:400-403.
- 58 - Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**:584-588.
- 59 - Eley, A., and D. Greenwood.** 1986. Beta-lactamases of type culture strains of the *Bacteroides fragilis* group and of strains that hydrolyse cefoxitin, latamoxef and imipenem. *J. Med. Microbiol.* **21**:49-57.
- 60 - 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.
- 61 - Elleman, T.C., and P.A. Hoyne.** 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding pilin of *Bacteroides nodosus*, the causal organism of ovine footrot. *J. Bacteriol.* **160**:1184-1187.
- 62 - Elleman, T.C., P.A. Hoyne, D.L. Emery, D.J. Stewart, and B.L. Clark.** 1986. Expression of the pilin gene from *Bacteroides nodosus* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **51**:187-192.
- 63 - Elleman, T.C., P.A. Hoyne, N.M. McKern, and D.J. Stewart.** 1986. Nucleotide sequence of the gene encoding the two-subunit pilin of *Bacteroides nodosus* 265. *J. Bacteriol.* **167**:243-250.

- 64 - Elleman, T.C., P.A. Hoyne, D.J. Stewart, N. McKern, and J.E. Peterson. 1986. Expression of pili from *Bacteroides nodosus* in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 168:574-580.
- 65 - 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.
- 66 - Engelhard, E., and R. Mutters. 1991. Rapid differentiation of the species of the genus *Bacteroides sensu stricto* by capillary gas chromatography of cellular carbohydrates. J. Appl. Bacteriol. 70:216-220.
- 67 - Fayolle, F., G. Privitera, and M. Sebald. 1980. Tetracycline transport in *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 18:502-505.
- 68 - 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.
- 69 - Flint, H.J., C.A. McPherson, G. Avgustin, and C.S. Stewart. 1990. Use of a cellulase-encoding gene probe to reveal restriction fragment length polymorphisms among ruminal strains of *Bacteroides succinogenes*. Curr. Microbiol. 20:63-67.
- 70 - 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.
- 71 - Franklund, C.V., and T.L. Glass. 1987. Glucose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*. J. Bacteriol. 169:500-506.
- 72 - Frischauf, A.M., H. Lehrach, A.M. Poustka, and N. Murray. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170:827-842.
- 73 - Fujimura, S., and T. Nakamura. 1989. Multiple forms of proteases of *Bacteroides gingivalis* and their cellular location. Oral Microbiol. Immunol. 4:227-229.
- 74 - Garger, S.J., O.M. Griffith, and L.K. Grill. 1983. Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:835-842.
- 75 - Garibaldi, A., and D.F. Bateman. 1971. Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. Physiol. Plant Pathol. 1:25-40.
- 76 - 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.
- 77 - Gherardini, F.C., and A.A. Salyers. 1987a. Characterization of an outer membrane mannanase from *Bacteroides ovatus*. J. Bacteriol. 169:2031-2037.

- 78 - 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.
- 79 - Gibson, S.A., and G.T. Macfarlane.** 1988. Characterization of proteases formed by *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2231-2240.
- 80 - 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.
- 81 - Goodman, H.J.K., J.R. Parker, J.A. Southern, and D.R. Wood.** 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from *Bacteroides fragilis*. *Gene* **58**:265-271.
- 82 - 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.
- 83 - Grenier, D., and D. Mayrand.** 1987. Selected characteristics of pathogenic and non-pathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:738-740.
- 84 - Groleau, D., and C.W. Forsberg.** 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* **27**:517-530.
- 85 - Grosveld, F.G., T. Lund, E.J. Murray, A.L. Mellor, H.H.M. Dahl, and R.A. Flawell.** 1982. The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells. *Nucl. Acids Res.* **10**:6715-6728.
- 86 - Groves, D.J.** 1990. Nucleic acid probes for *Bacteroides* species. *In* Gene probes for bacteria. Academic Press Inc., pp. 233-254.
- 87 - 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.
- 88 - 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.
- 89 - 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.
- 90 - Hamilton, I.R., A.S. McKee, and G.H. Bowden.** 1989. Growth and metabolic properties of *Bacteroides intermedius* in anaerobic continuous culture. *Oral Microbiol. Immunol.* **4**:89-97.

- 91 - Han, Y.H., R.M. Smibert, and N.R. Krieg. 1991. *Wolinella recta*, *Wolinella curva*, *Bacteroides ureolyticus*, and *Bacteroides gracilis* are microaerophiles, not anaerobes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:218-222.
- 92 - Hatanaka, C., and J. Ozawa. 1972. Exopectic acid transeliminase of *Erwinia*. *Agric. Biol. Chem.* **36**:2307-2313.
- 93 - Heikinheimo, R., H. Heimilä, R. Pakkanen, and I. Palva. 1991. Production of pectin methylesterase from *Erwinia chrysanthemi* B374 in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Environ.* **35**:51-55.
- 94 - Heinrichova, K., M. Wojciechowicz, and A. Ziolecki. 1989. The pectinolytic enzyme of *Selenomonas ruminantium*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**:169-174.
- 95 - Hill, G.B., and O.M. Ayers. 1985. Antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from female genital tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:324-331.
- 96 - Hohn, B., and J. Collins. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**:291-298.
- 97 - Holdeman, L.V., and J.L. Johnson. 1977. *Bacteroides disiens* sp. nov. and *Bacteroides bivius* sp. nov. from human clinical infections. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**:337-345.
- 98 - Holdeman, L.V., and J.L. Johnson. 1982. Description of *Bacteroides loescheii* sp. nov. and emendation of the descriptions of *Bacteroides melaninogenicus* (Oliver and Wherry) Roy and Kelly 1939 and *Bacteroides denticola* Shah and Collins 1981. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:399-409.
- 99 - Holdeman, L.V., R.W. Kelley, and W.E.C. Moore. 1984. Family I. *Bacteroidaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 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, and J.T. Staley. Williams and Wilkins. Baltimore/London, pp. 602-662.
- 100 - Hoyne, 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.
- 101 - Huang, J., and M.A. Schell. 1990. DNA sequence analysis of *pglA* and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* **172**:3879-3887.
- 102 - Huang, L., and C.W. Forsberg. 1987. Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1034-1041.
- 103 - Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Y. Quesneau, and J. Robert-Baudouy. 1983. Aldohexonate transport system in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* **154**:663-668.
- 104 - Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy. 1987. Hexuronate catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **169**:1223-1231.

- 105 - Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy.** 1989a. Molecular cloning of *outI* gene involved in pectate lyase secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **3**:285-295.
- 106 - Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy.** 1989b. Isolation of *Erwinia chrysanthemi* mutants altered in pectinolytic enzyme production. *Mol. Microbiol.* **3**:1587-1597.
- 107 - 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.
- 108 - Hurlbut, S., G.J. Cuchural, and F.P. Tally.** 1990. Imipenem resistance in *Bacteroides distasonis* mediated by a novel β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:117-120.
- 109 - 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.
- 110 - Ish-Horowicz, D., and J.F. Burke.** 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**:2989-2998.
- 111 - Jacobs, M.R., S.K. Spangler, and P.C. Appelbaum.** 1990. Susceptibility of *Bacteroides non-fragilis* and Fusobacteria to amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**:417-421.
- 112 - Jauneau, A., O. Morvan, C. Morvan, M. Demarty, and G. Devauchelle.** 1986. Mise en évidence d'une activité pectine lyase chez *Bacillus subtilis*. *C.R. Acad. Sc., Sér. III*, **302**:641-646.
- 113 - Jayasankar, N.P., and P.H. Graham.** 1969. An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganisms. *Can. J. Microbiol.* **16**:1023.
- 114 - Jennings, P.A., M.M. Bills, D.O. Irving, and J.S. Mattick.** 1989. Fimbriae of *Bacteroides nodosus* : protein engineering of the structural subunit for the production of an exogenous peptide. *Prot. Engin.* **2**:365-369.
- 115 - Jensen, N.S., and E. Canale-Parola.** 1985. Nutritionally limited pectinolytic bacteria from the human intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:172-173.
- 116 - 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.
- 117 - Ji, J., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1987. Use of *Mu-lac* insertions to study the secretion of pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:793-802.

- 118 - Johnson, J.L., and L.V. Holdeman. 1983. *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bacteroides corporis* sp. nov. and *Bacteroides levii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:15-25.
- 119 - Johnson, J.L., and B. Harich. 1986. Ribosomal ribonucleic acid homology among species of the genus *Bacteroides*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36 :71-79.
- 120 - Johnson, J.L., W.E.C. Moore, and L.V.H. Moore. 1986b. *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov., and *Bacteroides stercoris* sp. nov. isolated from human feces. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:499-501.
- 121 - Jokipii, L., and A.M. Jokipii. 1985. Comparative evaluation of the 2-methyl-5-nitroimidazole compounds dimetridazole, metronidazole, secnidazole, ornidazole, tinidazole, carnidazole, and panidazole against *Bacteroides fragilis* and other bacteria of the *Bacteroides fragilis* group. Antimicrob. Agents Chemother. 28:561-564.
- 121a - Joncquiart, J.C., M. Béchet, Y. Tierny, J. Courtois, H.C. Dubourguier, and J.B. Guillaume. 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of dextranase genes from *Bacteroides thetaiotaomicron*. FEMS Microbiol. Lett., Accepted.
- 122 - Juven, B.J., P. Lindner, and H. Weisslowicz. 1985. Pectin degradation in plant material by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Appl. Bacteriol. 58:533-538.
- 123 - Kaiser, K., and N.E. Murray. 1985. The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic libraries. In DNA Cloning: a practical approach. Edited by D.M. Glover. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 1-48.
- 124 - Keen, N.T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz, and W. Belser. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 159:825-831.
- 125 - Keen, N.T., and S. Tamaki. 1986. Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 168:595-606.
- 126 - Kertesz, Z.I. 1955. Pectic enzymes: enzymes of carbohydrate metabolism. Meth. Enzymol. 1:158-166.
- 127 - King, P.V., and R.W. Blakesley. 1986. Optimizing DNA ligations for transformation. Focus 8:1-3.
- 127a - 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. 146:853-886.
- 128 - 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.

- 129 - 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.
- 130 - Kotoujansky, A., A. Diolez, M. Boccara, Y. Bertheau, T. Andro, and A. Coleno. 1985. Molecular cloning of *Erwinia chrysanthemi* pectinase and cellulase structural genes. EMBO J. **4**:781-785.
- 131 - Kuritza, A.P., C.E. Getty, P. Shaughnessy, R. Hesse, and A.A. Salyers. 1986. DNA probes for identification of clinically important *Bacteroides* species. J. Clin. Microbiol. **23**:343-349.
- 132 - 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.
- 133 - 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.
- 134 - Leder, P., D. Tiemeier, and L. Enquist. 1977. EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms : The lambda gtWES system. Science **196**:175
- 135 - Lei, S.P., H.C. Lin, L. Heffernan, and G. Wilcox. 1985. Cloning of the pectate lyase genes from *Erwinia carotovora* and their expression in *Escherichia coli*. Gene **35**:63-70.
- 136 - Lei, S.P., H.C. Lin, S.S. Wang, J. Callaway, and G. Wilcox. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase B. J. Bacteriol. **169**:4379-4383.
- 137 - Lei, S.P., H.C. Lin, S.S. Wang, and G. Wilcox. 1988. Characterization of the *Erwinia carotovora pelA* gene and its product pectate lyase A. Gene **62**:159-164.
- 138 - Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology **1**:190-206.
- 139 - Liao, C.H. 1991. Cloning of pectate lyase gene *pel* from *Pseudomonas fluorescens* and detection of sequences homologous to *pel* in *Pseudomonas viridiflava* and *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **173**:4386-4393.
- 140 - Lin, K.W., J.A. Patterson, and M.R. Ladisch. 1985. Anaerobic fermentation : microbes from ruminants. Enzyme Microb. Technol. **7**:98-107.
- 141 - 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.

- 142 - 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.
- 143 - Loesche, W.J., S.S. Socransky, and R.J. Gibbons. 1964. *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. *J. Bacteriol.* **88**:1329-1337.
- 144 - 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.
- 145 - Lund, B.M., and T.F. Brocklehurst. 1978. Pectic enzymes of pigmented strains of *Clostridium*. *J. Gen. Microbiol.* **104**:59-66.
- 146 - Luria, S.E., and J.W. Burrous. 1957. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* **74**:461-476.
- 147 - Macy, J.M., and I. Probst. 1979. The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**:561-594.
- 148 - Manulis, S., D.Y. Kobayashi, and N.T. Keen. 1988. Molecular cloning and sequencing of a pectate lyase gene from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* **170**:1825-1830.
- 149 - Marsh, P.D., A.S. McKee, and A.S. McDermid. 1988. Effect of haemin on enzyme activity and cytotoxin production by *Bacteroides gingivalis* W50. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**:87-92.
- 150 - Martinez-Suarez, J.V., F. Baquero, M. Reig, and J.C. Perez-Diaz. 1985. Transferable plasmid-linked chloramphenicol acetyltransferase conferring high-level resistance in *Bacteroides uniformis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:113-117.
- 151 - Mary, P., P. Pheulpin, M. Béchet, and J.B. Guillaume. 1986. Plasmids and antibiotic resistances in clinical isolates of *Bacteroides* spp. In *Biology of anaerobic bacteria* (Dubourguier, H.C., Albagnac, G., Montreuil, J., Romond, C., Sautière, P., and J.B. Guillaume, eds.). *Progress in Biotechnology*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 165-173.
- 152 - Matsushita, O., J.B. Russel, and D.B. Wilson. 1990. Cloning and sequencing of a *Bacteroides ruminicola* B₁4 endoglucanase gene. *J. Bacteriol.* **172**:3620-3630.
- 153 - Mayrand, D., and S.C. Holt. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* **52**:134-152.
- 154 - 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.
- 155 - 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.

- 156 - McCarthy, R.E., M. Pajeau, 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.
- 157 - McEvoy, J.L., H. Murata, and A.K. Chatterjee.** 1990. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. *J. Bacteriol.* **172**:3284-3289.
- 158 - McGuire, R.G., P. Rodriguez-Palenzuela, A. Collmer, and T.J. Burr.** 1991. Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:600-664.
- 159 - McMillan, J.D., and H.J. Phaff.** 1966. Exopolygalacturonate lyase from *Clostridium multifementans* : enzyme of complex saccharide utilization. *Meth. Enzymol.* **8**:632-635.
- 160 - Miyazaki, Y.** 1991. Purification and characterization of endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agric. Biol. Chem.* **55**:25-30.
- 161 - Montgomery, L., B. Flescher, 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.
- 162 - Moran, F., S. Nasuno, and M.P. Starr.** 1968a. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**:298-306.
- 163 - Moran, F., S. Nasuno, and M.P. Starr.** 1968b. Oligogalacturonide trans-eliminase of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**:734-741.
- 164 - 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.
- 165 - Murray, N.E., W.J. Brammar, and K. Murray.** 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**:53-61.
- 166 - 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.
- 167 - 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.
- 168 - Naito, Y., and R.J. Gibbons.** 1988. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J. Dent. Res.* **67**:1075-1080.
- 169 - Nasser, W., F. Chalet, and J. Robert-Baudouy.** 1990. Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **72**:689-695.
- 170 - Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**:375-380.

171 - Neu, H.C., and L.A. Heppel. 1964. The release of ribonuclease into the medium when *Escherichia coli* cells are converted to spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **239**:3893-3900.

172 - Neu, H.C., and L.A. Heppel. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**:3685-3692.

173 - Nishida, T., T. Suzuki, K. Ito, Y. Kamio, and K. Izaki. 1990. Cloning and expression of pectin lyase gene from *Erwinia carotovora* in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**:801-808.

174 - 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.

175 - Olsson-Liljequist, B., K. Dornbusch, and C.E. Nord. 1980. Characterization of three different β -Lactamases from the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**:220-225.

176 - 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.

177 - 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.

178 - Parini, C., M.G. Fortina, and P.L. Manachini. 1988. Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV10. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:477-483.

179 - Paster, B.J., W. Ludwig, W.G. Weisburg, E. Stackerbrandt, 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.

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

181 - 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.

182 - Perry, D.A. 1982. Pectolytic *Clostridium* spp. in soils and rhizospheres of carrot and other arable crops in east Scotland. *J. Appl. Bacteriol.* **52**:403-408.

183 - Phaff, H.J. 1966. α -1,4-polygalacturonide glycanohydrolase (endopolygalacturonase) from *Saccharomyces fragilis*. *Meth. Enzymol.* **8**:636-641.

- 184 - 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.
- 185 - Plastow, G.S., P.M. Border, J.C.D. Hinton, and G.P.C. Salmond.** 1986. Molecular cloning of pectinase genes from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(Strain SCRI193). Symbiosis **2**:115-122.
- 186 - Plastow, G.S.** 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectin methylesterase gene of *Erwinia chrysanthemi* B374. Mol. Microbiol. **2**:247-254.
- 187 - 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. University of Manitoba Press, Winnipeg, pp. 90-114.
- 188 - Rasmussen, B.A., Y. Gluzman, and F.P. Tally.** 1990. Cloning and sequencing of the class B β -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. Antimicrob. Agents Chemother. **34**:1590-1592.
- 189 - Ravelomanana, R., J.P. Guiraud, and P. Galzy.** 1986. Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa-beans. System. Appl. Microbiol. **8**:230-233.
- 190 - Reverchon, S., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1985. Cloning of genes encoding pectolytic enzymes from a genomic library of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. Gene **35**:121-130.
- 191 - Reverchon, S., F. Van Gijsegem, M. Rouve, A. Kotoujansky, and J. Robert-Baudouy.** 1986. Organization of a pectate lyase gene family in *Erwinia chrysanthemi*. Gene **49**:215-224.
- 192 - Reverchon, S., and J. Robert-Baudouy.** 1987a. Regulation of expression of pectate lyase genes *pelA*, *pelB*, and *pelE* in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **169**:2417-2423.
- 193 - Reverchon, S., and J. Robert-Baudouy.** 1987b. Molecular cloning of an *Erwinia chrysanthemi* oligogalacturonate lyase gene involved in pectin degradation. Gene **55**:125-133.
- 194 - Reverchon, S., Y. Huang, C. Bourson, and J. Robert-Baudouy.** 1989. Nucleotide sequences of the *Erwinia chrysanthemi* *ogl* and *pelE* genes negatively regulated by the *kdgR* gene product. Gene **85**:125-134.
- 195 - Rexová-Benková, L., and O. Markovic.** 1976. Pectic enzymes. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **33**:323-385.
- 196 - Ried, J.L., and A. Collmer.** 1985. Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and SDS polyacrylamide gels. Appl. Environ. Microbiol. **50**:615-622.

- 197 - Ried, J.L., and A. Collmer. 1986. Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Appl. Environ. Microbiol. 52:305-310.
- 198 - Roberts, P.D., P.M. Berman, C. Allen, V.K. Stromberg, G.H. Lacy, and M.S. Mount. 1986. *Erwinia carotovora* : molecular cloning of a 3.4 kilobase DNA fragment mediating production of pectate lyases. Can. J. Plant Pathol. 8:17-27.
- 199 - Roberts, P.D., T.P. Denny, and M.A. Schell. 1988. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in pathogenicity. J. Bacteriol. 170:1445-1451.
- 200 - Russell, D.R., and G.N. Bennett. 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *Escherichia coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene 20:231-243.
- 201 - 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.
- 202 - Rutkowski, E., R. Labitzke, N.Q. Khanh, F. Löffler, M. Gottschalk, and K.D. Jany. 1990. Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *Aspergillus niger* RH5344. Biochim. Biophys. Acta 1087:104-106.
- 203 - Sakellaris, G., S. Nikolaropoulos, and A.E. Evangelopoulos. 1988. Polygalacturonase biosynthesis by *Lactobacillus plantarum* : effect of cultural conditions on enzyme production. J. Appl. Bacteriol. 65:397-405.
- 204 - Sakellaris, G., S. Nikolaropoulos, and A.E. Evangelopoulos. 1989. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from *Lactobacillus plantarum* strain BA11. J. Appl. Bacteriol. 67:77-87.
- 205 - 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.
- 206 - Salyers, A.A., and M. O'Brien. 1980. Cellular location of enzymes involved in chondroitin sulfate breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 143:772-780.
- 207 - Salyers, A.A., and S.F. Kotarski. 1980. Induction of chondroitin sulfate lyase activity in *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 143:781-788.
- 207a - Salyers, A.A., F. Gheridini, and M. O'Brien. 1981. Utilization of xylan by two species of human colonic *Bacteroides*. Appl. Environ. Microbiol. 41:1065-1068.
- 208 - 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.

- 209 - Salyers, A.A. 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. Annu. Rev. Microbiol. 38:293-313.
- 210 - Salyers, A.A., N.B. Shoemaker, and E.P. Guthrie. 1987. Recent advances in *Bacteroides* genetics. CRC Crit. Rev. Microbiol. 14:49-70.
- 211 - Salyers, A.A., M. Pajeau, and R.E. McCarthy. 1988. Importance of mucopolysaccharides as substrates for *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in intestinal tracts of exgermfree mice. Appl. Environ. Microbiol. 54:1970-1976.
- 212 - Salyers, A.A., and M. Pajeau. 1989. Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. Appl. Environ. Microbiol. 55:2572-2578.
- 213 - Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 214 - Schell, M.A., D.P. Roberts, and T.P. Denny. 1988. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in pathogenicity. J. Bacteriol. 170:4501-4508.
- 215 - Scher, K.S. 1988. Emergence of antibiotic resistant strains of *Bacteroides fragilis*. Surg. Gynecol. Obstet. 167:175-179.
- 216 - Schink, B., and J.G. Zeikus. 1980. Microbial methanol formation : a major end product of pectin metabolism. Curr. Microbiol. 4:387-389.
- 217 - Schink, B., and J.G. Zeikus. 1982. Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. J. Gen. Microbiol. 128:393-404.
- 218 - Schlemmer, A.F., C.F. Ware, and N.T. Keen. 1987. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. J. Bacteriol. 169:4493-4498.
- 219 - Schoedel, C., and A. Collmer. 1986. Evidence of homology between the pectate lyase-encoding *pelB* and *pelC* genes in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 167:117-123.
- 219a - Scholle, R.R., H.E. Steffen, H.J.K. Goodman, and D.R. Woods. 1990. Expression and regulation of a *Bacteroides fragilis* sucrose utilization system cloned in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1944-1948.
- 220 - 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.
- 221 - Seyrig, J.A., S. Naveau, R. Gonzales, et R. Petit. 1983. Pectines. Mise au point. Gastroenterol. Clin. Biol. 7:1031-1037.

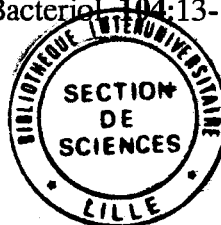
- 222 - Shah, H.N., and M.D. Collins. 1981. *Bacteroides buccalis*, sp. nov., *Bacteroides denticola*, sp. nov., *Bacteroides pentosaceus*, sp. nov., new species of the genus *Bacteroides* from the oral cavity. Zbl. Bakt. Paras. Infekt. Hyg. Abt. Orig. C2:235-241.
- 223 - Shah, H.N., and M.D. Collins. 1982a. Reclassification of *Bacteroides hypermegas* (Harrisson and Hansen) in a new genus *Megamonas*, as *Megamonas hypermegas* comb. nov. Zbl. Bakt. Paras. Infekt. Hyg. Abt. Orig. C3:394-399.
- 224 - 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. Zbl. Bakt. Paras. Infekt. Hyg. Abt. Orig. C3:491-494.
- 225 - Shah, H.N., and M.D. Collins. 1983. Genus *Bacteroides*, a chemotaxonomical perspective. J. Appl. Bacteriol. 55:403-416.
- 226 - Shah, H.N., M.D. Collins., J. Watabe, and T. Mitsuoka. 1985. *Bacteroides oulorum* sp. nov., a non-pigmented saccharolytic species from the oral cavity. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:193-197.
- 227 - 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.
- 227a - Shah, H.N., and R.A.D. Williams. 1987. Utilization of glucose and amino acids by *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides gingivalis*. Curr. Microbiol. 15:241-246.
- 228 - 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.
- 229 - 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.
- 230 - 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.
- 231 - Sheiman, M.I., J.O. McMillan, L. Miller, and J.R. Chase. 1976. Coordinated action of pectinesterase and polygalacturonate lyase complex of *Clostridium multif fermentans*. Eur. J. Biochem. 64:565-572.
- 232 - Sherwood, R.T. 1965. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathol. 56:279-286.
- 233 - Shoemaker, N.B., R.D. Barber, and A.A. Salyers. 1989. Cloning and characterization of a *Bacteroides* conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector. J. Bacteriol. 171:1294-1302.

- 234 - 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.
- 235 - Smith, K.A., and A.A Salyers. 1989. Cell-associated pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: cloning, characterization, and insertional mutagenesis to determine its role in pullulan utilization. J. Bacteriol. **171**:2116-2123.
- 236 - Smith, K.A. and A.A. Salyers. 1991. Characterization of a neopullulanase and an alpha-glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1. J. Bacteriol. **173**:2962-2968.
- 237 - Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**:503-517.
- 238 - Southern, J.A., J.R. Parker, and D.R. Wood. 1986. Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. J. Gen. Microbiol. **132**:2827-2835.
- 239 - Southern, J.A., J.R. Parker, and D.R. Wood. 1987. Novel structure, properties and inactivation of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. J. Gen. Microbiol. **133**:2437-2446.
- 240 - Sperry, J.F., M.D. Appelman, and T.D. Wilkins. 1977. Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. Appl. Environ. Microbiol. **34**:386-390.
- 241 - Spok, A., G. Stubenrauch, K. Schorgendorfer, and H. Schwab. 1991. Molecular cloning and sequencing of a pectinesterase gene from *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol. **137**:131-140.
- 242 - Stackebrandt, E., and H. Hippe. 1986. Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter amylophilus* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. **8**:204-207.
- 243 - Starr, M.P., A.K. Chatterjee, P.B. Starr, and G.E. Buchanan. 1977. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures. J. Clin. Microbiol. **6**:379-386.
- 244 - Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranases from *Bacteroides oralis* Ig4a. Microbiol. Immunol. **26**:375-386.
- 245 - Takahashi, N., Y. Satoh, and K. Takamori. 1985. Subcellular location of D-glucanases in *Bacteroides oralis* Ig4a. J. Gen. Microbiol. **131**:1077-1082.
- 246 - Tamaki, S.J., S. Gold, M. Robeson, S. Manulis, and N.T. Keen. 1988. Structure and organization of the *pel* genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16. J. Bacteriol. **170**:3468-3478.
- 247 - Taniguchi, H., S. Fujimura, K. Takeuchi, and T. Nakamura. 1983. Purification and characterization of mucopolysaccharidase from an oral strain of *Bacteroides* sp. Appl. Environ. Microbiol. **46**:1252-1257.

- 248 - 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.
- 249 - Teather, R.M., and J.D. Erfle.** 1990. DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage β -glucanase (1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase) gene. *J. Bacteriol.* **172**:3837-3841.
- 250 - Thibault, J.F., et R. Petit.** 1979. Les substances pectiques généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. *Ind. Alim. Agric.* **12**:1231-1240.
- 251 - Thompson, J.S., and M.H. Malamy.** 1990. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase II. *J. Bacteriol.* **172**:2584-2593.
- 252 - Thurn, K.K., and A.K. Chatterjee.** 1985. Single-site chromosomal Tn5 insertions affect the export of pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:894-898.
- 253 - Tsuyumu, S.** 1979. Self-catabolite repression of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* **137**:1035-1036.
- 254 - Van der Auwera, P., M. Labbe, W.R. Mayberry, K.P. Ferguson, and D.W. Lambe.** 1986. Identification of *Bacteroides* by cellular fatty acid profiles : application to the routine microbiological laboratory. *J. Microbiol. Meth.* **4**:267-275.
- 255 - Van Gijsegem, F., A. Toussaint, and E. Schoonejans.** 1985. *In vivo* cloning of the pectate lyase and cellulase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *EMBO J.* **4**:787-792.
- 256 - Van Gijsegem, F.** 1986. Analysis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:617-624.
- 257 - Van Steenberg, T.J.M. and J. De Graaff.** 1986. Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:219-222.
- 258 - Van Winkelhoff, A.J., T.J.M. Van Steenberg, N. Kippuw, and J. De Graaff.** 1986. Oxygen tolerance of oral and non-oral black-pigmented *Bacteroides* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:215-218.
- 259 - Varel, V.H., and M.P. Bryant.** 1974. Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Appl. Microbiol.* **18**:251-257.
- 260 - Walker, M.J., E.C. Wynne, K.S. Gobius, and J.M. Pemberton.** 1986. Cloning of cellulase, amylase, and pectinase genes and their expression in a range of Gram-negative bacteria. *In Proc. IV. ISME Perspectives in microbial ecology.* F. Megusar and M. Gantar. SSM, pp.516-521.

- 261 - 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.
- 262 - Weber, F.H., and E. Canale-Parola. 1984. Pectinolytic enzymes of oral spirochetes from humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:61-67.
- 263 - Weinberg, M., R. Nativelle, and A.R. Prévot. 1937. *Les microbes anaérobies*. Masson and Co., Paris.
- 264 - Weisburg, W.G., Y. Oyaizu, H. Oyaizu, and C.R. Woese. 1985. Natural relationships between *Bacteroides* and *Flavobacteria*. *J. Bacteriol.* **164**:230-236.
- 265 - Werner, H., W.R. Heizmann, G. Freuer, N. Mitinis, and F. Heilmann. 1989. Efficacy of clavulanate-potentiated antibiotics against *Bacteroides* species and artificially associated cultures of aerobes and anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**:55-61.
- 266 - Wexler, H.M. 1991. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: myth, magic or method? *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:470-484.
- 267 - 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.
- 268 - 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.
- 269 - 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.
- 269a - Whitehead, T.R., and D.A. Lee. 1991. Cloning and comparison of xylanase genes from ruminal and colonic *Bacteroides* species. *Curr. Microbiol.* **23**:15-19.
- 270 - Williams, A.G., and S.E. Witters. 1985. Formation of polysaccharide depolymerase and glycosides hydrolase enzymes by *Bacteroides ruminicola* subsp. *ruminicola* grown in batch and continuous culture. *Curr. Microbiol.* **12**:79-84.
- 271 - Wojciechowicz, M. 1971. Partial purification of pectinolytic enzymes of *Bacteroides ruminicola* isolated from the rumen of a sheep. *Acta Microbiol. Polon.* **3**:45-55.
- 272 - Wojciechowicz, M. 1972. Comparison of the action of *Bacteroides ruminicola* polygalacturonic lyase and of pectinase on lower oligogalacturonides. *Acta Microbiol. Polon.* **4**:189-196.
- 273 - Wojciechowicz, M., and A. Ziolecki. 1979. Pectinolytic enzymes of large rumen treponemes. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:136-142.

- 274 - Wojciechowicz, M., K. Heinrichova, and A. Ziolecki. 1980. A polygalacturonase produced by *Lachnospira multiparus* isolated from the bovine rumen. J. Gen. Microbiol. 117:193-199.
- 275 - Wojciechowicz, M., K. Heinrichova, and A. Ziolecki. 1982. An exopectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. J. Gen. Microbiol. 128:2661-2665.
- 276 - Wojciechowicz, M., and A. Ziolecki. 1984. A note on the pectinolytic enzyme of *Streptococcus bovis*. J. Appl. Bacteriol. 56:515-518.
- 277 - 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.
- 278 - Wynne, E.C., and J.M. Pemberton. 1986. Cloning of a gene cluster from *Cellvibrio mixtus* which codes for cellulase, chitinase, amylase and pectinase. Appl. Environ. Microbiol. 52:1362-1367.
- 279 - Xu, P., S.A. Leong, and L. Sequeira. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 170:617-622.
- 280 - Yamamoto, I., A. Atsuko, S. Hiroyuki and I. Makoto. 1984. The pathway of ammonia assimilation in *Bacteroides fragilis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 30:499-508.
- 281 - Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne, and G. Triber. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. Virology 40:734.
- 282 - Yankovsky, N.K., N.O. Bukanov, V.V. Gritzenko, A.N. Evtushenkov, M.Y. Fonstein, and V.G. Debabov. 1989. Cloning and analysis of structural and regulatory pectate lyase genes of *Erwinia chrysanthemi* ENA49. Gene 81:211-218.
- 283 - Yoshida, A., K. Ito, Y. Kamio, and K. Izaki. 1991. Purification and properties of pectate lyase III of *Erwinia carotovora* Er. Agric. Biol. Chem. 55:601-602.
- 284 - Zimmerman, R.E. 1978. A rapid assay for pectinesterase activity which can be used as a prescreen for pectinesterase inhibitors. Anal. Biochem. 85:219-223.
- 285 - Zink, R.T., and A.K. Chatterjee. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Appl. Environ. Microbiol. 49:714-717.
- 286 - Zink, R.T., J.K. Engwall, J.L. McEvoy, and A.K. Chatterjee. 1985. *recA* is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Bacteriol. 164:390-396.
- 287 - Zucker, M., and L. Hankin. 1970. Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 104:13-18.



RESUME

Bacteroides thetaiotaomicron est une bactérie à Gram-négatif, anaérobie stricte, vivant dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et capable de dégrader plusieurs polysaccharides complexes tels que les dextrans et pectines.

Afin de mieux connaître la structure et la régulation des gènes dont les produits sont impliqués dans la dégradation des pectines, nous avons réalisé une banque d'ADN génomique de la souche de *B. thetaiotaomicron* 217 dans le vecteur phagique lambda EMBL3. Un clone pectinase-positif a été mis en évidence sur gel de polygalacturonate de magnésium par formation d'une dépression autour de la plage de lyse sur environ 2000 clones testés. Le bactériophage recombinant pectinolytique a ensuite été purifié, amplifié et le stock ainsi obtenu a servi à infecter une culture d'*Escherichia coli* LE392. Les tests d'activités effectués au niveau du surnageant de lyse ont permis de révéler la présence des activités pectine méthylestérase et pectate lyase qui jouent un rôle complémentaire dans la dégradation des pectines.

Une carte de restriction détaillée de l'insert de 13,2 kb présent au niveau du vecteur hybride a été établie, ce qui a permis, par sous-clonage des fragments *Sal*I dans les vecteurs pDR720 et pBR322, ainsi que des fragments *Eco*RI dans le vecteur pBR325, de préciser l'emplacement des gènes *pme* et *pel* et de les isoler afin d'étudier leur expression séparée chez *E. coli*. Les activités clonées y ont été localisées et une étude préliminaire concernant les caractéristiques biochimiques de la pectate lyase a été effectuée.

Le séquençage ultérieur des gènes *pme* et *pel* devrait permettre de préciser leur structure et la façon dont ils sont régulés. Le transfert et l'expression hétérologue de ces gènes chez d'autres espèces de *Bacteroides* et chez des souches sécrétrices de *Bacillus* devrait conduire à des niveaux d'activités supérieurs, et à des enzymes si possible extracellulaires.

