

Méthodes microbiologiques Milieu de culture

1.1.1 Milieu minimum salin extrait de levure (MMSYE)

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des souches est le milieu minéral salin additionné d'extrait de levure (MMSYE) et d'un substrat carboné qui constitue la source de carbone et d'énergie. Ce milieu a la composition décrite par (Bouchez *et al.*, 1995b) à l'exception de l'ajout de vitamines qui est remplacé par 100 mg.L⁻¹ d'extrait de levure.

Le détail de la composition est le suivant :

- Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	4,5 g.L ⁻¹
- NH ₄ NO ₃	1 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	680 mg.L ⁻¹
- MgSO ₄ , 7 H ₂ O	100 mg.L ⁻¹
- FeSO ₄	1 mg.L ⁻¹
- Extrait de levure	100 mg.L ⁻¹
- Solution d'oligo-éléments	1 ml.L ⁻¹

Composition de la solution d'oligo-éléments (conservée à 4°C):

- MnSO ₄ , H ₂ O	100 mg.L ⁻¹
- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- NaB ₄ O ₇ , 10 H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- Co(NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- CuCl ₂	25 mg.L ⁻¹
- ZnCl ₂	25 mg.L ⁻¹
- NH ₄ VO ₃	25 mg.L ⁻¹

La source de carbone est introduite soit avant l'autoclavage (succinate de sodium à 4 g.L⁻¹, acétate de sodium à 4 g.L⁻¹, glycérol à 2.5 g.L⁻¹, Tween80 à 2,5 g.L⁻¹), soit au moment de l'ensemencement (2-EHN, *n*-octane, iso-octane, éthanol à 1 g.L⁻¹ ou glucose à 2 g.L⁻¹).

Pour les cultures en phase vapeur de 2-EHN sur milieu gélosé en boîtes de Petri, le MMSYE est additionné de 20 g.L⁻¹ d'agar bactériologique et de 0,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure.

Les solutions sont stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 mn.

1.1.2 Milieu complet

Il s'agit du milieu Luria-Bertani modifié qui est utilisé aussi bien pour certaines cultures en milieu liquide ou en milieu solide, sur boîtes de Petri.

Il a la composition suivante :

- Biotrycase	10 g.L ⁻¹
- Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
- NaCl	5 g.L ⁻¹
- Glucose	1 g.L ⁻¹
- Agar-agar	20 g.L ⁻¹ (ajouté pour préparer les milieux gélosés)

1.1.3 Milieu Middlebrook 7H9 et 7H10, pour la culture des *mycobactéries*

(Middlebrook *et al.*, 1954; Middlebrook & Cohn, 1958)

	7H9	7H10 + Agar
- (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	1,0 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹
- Na ₂ HPO ₄	2,5 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹
- Citrate-Na ₃	0,1 g.L ⁻¹	0,4 g.L ⁻¹
- MgSO ₄ (7H ₂ O)	50 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
- CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
- ZnSO ₄ (7H ₂ O)	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- CuSO ₄ (5H ₂ O)	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- Acide L-glutamique	0,5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
- Fe(III)(NH ₄)citrate	40 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹
- Pyridoxine	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- Biotine	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
- Glycérol	0,2% (p/v)	0,5% (p/v)
- Malachite Green	-	0,25 mg.L ⁻¹
- Bacto Agar	-	15 g.L ⁻¹
- pH (à vérifier)	6,6 +/- 0,2	6,6 +/- 0,2

Après autoclavage, le supplément d'enrichissement ADC, stérilisé par filtration est ajouté à raison de 10% du volume total. La composition est la suivante :

- BSA, Fractio, V	50 g.L ⁻¹
- D-Glucose	20 g.L ⁻¹
- Catalase	0,03 g.L ⁻¹

0,05% de Tween 80 peut être additionné dans certains cas dans le milieu (Goldstone *et al.*, 2008)

1.1.4 Milieu PTYG : Peptone-Tryptone-Yeast extract-Glucose medium

(Shen *et al.*, 1998)

- D-Glucose	10 g.L ⁻¹
- Extrait de levure Difco®	10 g.L ⁻¹
- Bacto Peptone	5 g.L ⁻¹
- Tryptone Biokar®	5 g.L ⁻¹
- CaCl ₂ (2H ₂ O)	70 mg.L ⁻¹
- MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,3 g.L ⁻¹

Le milieu PTYG₂ est dilué au demi avec de l'eau. Le milieu PTYG₂₀ est dilué au 1/20^{ème} avec de l'eau et 15 g.L⁻¹ d'agar y sont ajoutés.

1.2 Souches et plasmides

1.2.1 Microorganismes

Les microflores proviennent de boues de station d'épuration urbaines ou de raffinerie. Elles sont inoculées à raison de 100 mg.L⁻¹ dans le milieu de culture.

Les souches utilisées appartiennent à la famille des bactéries dites CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*). Elles ont été sélectionnées pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures, en particulier les *n*-alcane. La plupart de ces souches possèdent une mono-oxygénase. Le **tableau 3.1** présente les souches utilisées ainsi que les hydrocarbures qu'elles sont capables de dégrader. Le **tableau 3.2** représente les souches utilisés pour le clonage et l'expression de gènes.

Tableau 3.1: Souches utilisées lors des tests de biodégradation du 2-EHN

Souche	Substrats de croissance usuels	Références
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009	C6, C8, C12, C14	(Béguin <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	MTBE	(Francois <i>et al.</i> , 2002)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2015	MTBE	(Lopes-Ferreira <i>et al.</i> , 2006)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	Isooctane	(Solano-Serena <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. austroafricanum</i> ATCC 29678	Hexane, 2-Méthylpentane	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	C12, C14	(Poupin <i>et al.</i> , 1999)
<i>M. austroafricanum</i> C6	Pyrène	(Jouanneau <i>et al.</i> , 2005)
<i>M. austroafricanum</i> Spyr_Ge_1	Pyrène	(Willison J., communication personnelle)
<i>M. austroafricanum</i> BHF 004	Pyrène	(Willison J., communication personnelle)
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	Pyrène	(Moody <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1	Pyrène	(Krivobok <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. ruber</i> IFP 2006	Éthanol	(Chauvaux <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. ruber</i> IFP 2007	Éthanol	(Chauvaux <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. citronellolis</i> ATCC13674	Citronellol, terpènes	(Fall <i>et al.</i> , 1979)
<i>P. putida</i> Gpo1	C6, C8, C12, C14	(Smith & Hyman, 2004)

Les souches sont conservées à -80°C à DO₆₀₀ de 12 dans du MMSYE avec 40 % de glycérol dans des tubes cryogéniques (Nalgene). Elles ont été au préalable cultivées sur MMSYE avec 2.5 g.L⁻¹ de Tween 80. Ces tubes servent systématiquement à l'ensemencement des précultures pour effectuer des tests de biodégradation du 2-EHN.

Tableau 3.2: Souches utilisées pour le clonage et l'expression de gènes

Souche	Références
<i>Escherichia coli</i> DH5α	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	Novagen, Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	(Snapper <i>et al.</i> , 1990)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 4517	(Goldstone <i>et al.</i> , 2008)

1.2.2 Plasmides utilisés

Deux types de vecteurs ont été utilisés, des vecteurs de clonage et des vecteurs d'expression. La liste et la description de ces derniers figurent dans le **tableau 3.3**.

Tableau 3.3 a : Plasmides utilisés

Plasmide	Description	Résistance *	Promoteur / Origine de répllication (Ori)	Références
pDrive	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰ K anamycine ²⁰	T7-SP6 Ori pUC	Qiagen
TOPO	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰ K anamycine ²⁰	T7-SP6 Ori f1 et pUC	Invitrogen
pUC18	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰	Pas de promoteur Ori rep pUC	Fermentas
pUC19	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰	Pas de promoteur Ori rep pUC	Fermentas
pET9a	Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i>	Kanamycine ²⁰	T7	Novagen
pET15b	Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i> avec un marquage His Tag en N-terminal	Ampicilline ¹⁰⁰	T7	Novagen
pHLD69	Vecteur navette <i>Mycobacterium - E. coli</i>	Kanamycine ²⁰	Pas de promoteur Ori <i>E coli</i> et <i>Mycobacterium</i> T7	(Pagnout <i>et al.</i> , 2007)
pUYB1062	Vecteur navette d'expression <i>Mycobacterium -E. coli</i>	Hygromycine ⁵⁰	Ori <i>E coli</i> et <i>Mycobacterium</i>	(Goldstone <i>et al.</i> , 2008)
pGEc47ΔB - pCom8-PFR1500	Vecteur contenant le <i>cyp153</i> isolé par Van Beilen	Tetracycline ^{12,5} Gentamycine ¹⁰⁰	pAlkB (Eggink <i>et al.</i> , 1987) OriT et MCS	(van Beilen & Funhoff, 2005)

* Les concentrations en antibiotiques sont exprimées en exposant en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 3.3 b : Plasmides utilisés issus de cette étude

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Gènes introduits dans le plasmide	Taille des gènes introduits	Résistance*
pEN01	pDrive	<i>alkB1</i>	1272 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN02	pDrive	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN03	pDrive	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN04	pET9a	<i>alkB1</i>	1272 pb	Kanamycine ²⁰
pEN05	pET15b	<i>alkB1</i>	1272 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN06	pET9a	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Kanamycine ²⁰
pEN07	pET15b	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN08	pET9a	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Kanamycine ²⁰
pEN09	pET15b	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN10	pUC18	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> + séquence promotrice	2448 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN11	pUC18	<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> + séquence promotrice	3063 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN12	pHLD69	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> + séquence promotrice	2448 pb	Kanamycine ²⁰
pEN13	pHLD69	<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> + séquence promotrice	3063 pb	Kanamycine ²⁰
pEN14	pDrive	<i>alkB2</i>	1185 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Gènes introduits dans le plasmide	Taille des gènes introduits	Résistance*
pEN15	pET15b	<i>alkB2</i>	1185 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN16	pET9a	<i>alkB2</i>	1185 pb	Kanamycine ²⁰
pEN17	pDrive	<i>alkB2</i> + séquence promotrice	1667 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN18	pDrive	<i>alkB2-scd</i> + séquence promotrice	2600 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN19	pHLD69	<i>alkB2</i> + séquence promotrice	1667 pb	Kanamycine ²⁰
pEN20	pHLD69	<i>alkB2-scd</i> + séquence promotrice	2600 pb	Kanamycine ²⁰
pEN21	pDrive	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN22	pET15b	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN23	pET9a	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Kanamycine ²⁰
pEN26	pUYB1062	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Hygromycine ⁵⁰

* Les concentrations en antibiotiques sont exprimées en exposant en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

1.3 Tests de biodégradation aérobie

1.3.1 Mise en œuvre du test

Les essais sont réalisés dans des fioles de pénicilline de 120 mL. Pour chaque souche, quatre essais contenant 10 mL de milieu de culture (MMSYE), 0,5 mL de HMN et 5 μL de 2-EHN (soit 487 mg.L^{-1}) sont mis en œuvre. Deux témoins abiotiques, additionnés de chlorure mercurique à $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ et deux témoins endogènes (absence de 2-EHN et présence de HMN dans le milieu de culture), sont réalisés. Deux fioles d'essais et de témoins endogènes sont aussi mises en œuvre dans les mêmes conditions afin de vérifier si la souche est capable de croissance en l'absence de HMN. Une foisensemencées à $\text{D.O.}_{600} = 0,2$ les fioles sont incubées à 30°C , sous agitation. Au cours de l'incubation, le CO_2 est régulièrement dosé dans le ciel gazeux de l'une des fioles d'essai ainsi que de l'une des fioles témoin sans substrat, avec ou sans HMN. A l'issue de 28 jours d'incubation (temps de dégradation préconisé dans les normes ISO 14593), les milieux de culture sont acidifiés avec 1 mL d'HCl 17,5%. Les fioles sont agitées pendant une nuit, puis le CO_2 est dosé afin d'en déterminer la quantité finale. Le 2-EHN résiduel est alors extrait pendant 30 mn sous agitation, (volume à volume) par du MTBE contenant de décahydronaphtalène 5% (v/v) utilisé comme standard interne. Les fioles sont alors refroidies au minimum 1h à 4°C puis 2 mL de la phase organique sont prélevés et dosés par CPG/FID. Pour tous les calculs relatifs aux tests de biodégradation, la respiration endogène mesurée dans les fioles sans 2-EHN est systématiquement déduite de celle mesurée dans les essais. Chaque test est réalisé en triplicata. Les résultats sont exprimés en faisant la moyenne et l'écart type des trois essais.

1.3.2 Expression des résultats

1.3.2.1 Taux de recouvrement abiotique

Le taux de recouvrement abiotique correspond à la quantité de substrat dosé par CPG-FID dans les témoins abiotiques en fin de culture par rapport à la quantité de substrat introduit déterminé par le calcul (masse volumique du substrat multipliée par le volume introduit).

Ce calcul permet de vérifier l'étanchéité des fioles utilisées ainsi que de valider les calculs du taux de dégradation et du rendement de minéralisation qui prennent en compte les valeurs des concentrations en substrat résiduel.

1.3.2.2 Taux de dégradation

Le taux de dégradation est déterminé grâce aux analyses CPG/FID par le rapport entre la quantité de substrat consommé dans les essais et celle présente dans les témoins abiotiques à la fin de la période d'incubation.

1.3.2.3 Rendement de minéralisation

Le rendement de minéralisation est le rapport entre le nombre de moles de carbone dégagées sous forme de CO₂ (dosé par CPG à détection catharométrique après acidification en tenant compte du CO₂ dissous) et le nombre de moles de carbone du substrat consommé (déterminé par la différence entre le substrat introduit initialement et le substrat résiduel présent dans les essais et dosé par CPG/FID), en tenant compte du rendement d'extraction (taux de recouvrement). Le nombre de mole de CO₂ dégagé dans les fioles témoins sans substrat (respiration endogène) est déduit de la quantité de CO₂ déterminée dans les essais.

1.3.3 Suivi cinétique de la consommation d'oxygène par respirométrie

Le Sapromat est un appareil de respirométrie qui mesure de manière indirecte la consommation d'oxygène (Sapromat D12-S, Voith, Allemagne). Il est composé de 12 postes dont le principe de fonctionnement est le suivant (**Figure 3.1**) :

Une fiole d'essai de 500 mL en communication directe avec un générateur d'oxygène, est séparée d'un compartiment de référence par un manomètre. L'ensemble, placé dans un bain marie à 30°C sous agitation magnétique, est indépendant des variations de pression atmosphérique et de température extérieure. L'activité des microorganismes crée une consommation d'oxygène et une production de CO₂. Le CO₂ est piégé par de la chaux sodée en excès. Toute activité métabolique génère donc une dépression. Cette dernière crée un contact entre les deux électrodes du manomètre, qui entraîne alors une production d'oxygène par voie électrolytique. Lorsque l'équilibre de pression est rétabli, le contact manométrique

ainsi que la production d'oxygène cessent. La mesure de consommation d'oxygène est fournie par celle de la quantité d'électricité consommée par le générateur électrolytique. L'unité de stimulation du générateur (86 mA pendant 36 s) représente 0,25 mg d'oxygène produit. Les données sont analysées par le logiciel informatique fourni par le constructeur (Sapromat).

Après croissance en MSMYE sur Tween 80 ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), les cellules sont centrifugées à 10 000 g pendant 10 mn puis lavées une fois en MMSYE sans substrat carboné. Le culot cellulaire est repris dans 250 mL de milieu de culture (MMSYE) avec ou non 5% de HMN (Sigma) ou 5% d'huile de silicone (47V20, Prolabo, France) de façon à obtenir une D.O.₆₀₀ initiale proche de 0,1. Les fioles sont alors introduites dans l'appareil Sapromat.

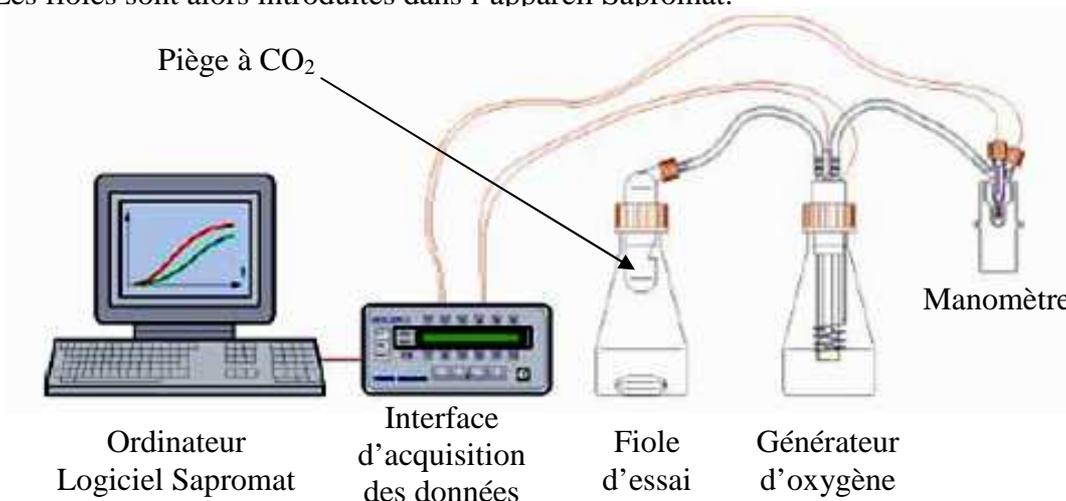


Figure 3.1 : Détail des connexions de l'appareil Sapromat

2 Méthodes d'analyses physicochimiques

2.1 Méthodes chromatographiques

2.1.1 CO₂

La teneur en CO₂ du ciel gazeux des fioles de pénicilline est mesurée par CPG à détection catharométrique (Varian 3800). L'échantillon gazeux (250 μL) est injecté à l'aide d'une seringue à gaz de 250 μL de capacité et munie d'un système de vanne ouverture/fermeture étanche (Hamilton) sur une colonne inox de 2 m de longueur et de 2 mm de diamètre interne, remplie de phase Porapak Q (80/100 mesh) (Chrompack). Le gaz vecteur est l'hélium. La pression en tête de colonne est de 24,6 psi, qui correspond à un débit de 30 mL.mn^{-1} en sortie de colonne. La température du four est de 100°C. L'analyse s'effectue en isotherme. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130 °C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180 °C, ce qui se traduit par un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée en conséquence pour obtenir une

réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur positif pour l'analyse de CO₂. L'acquisition des données se fait par le logiciel Borwin (JMBS développement).

2.1.2 2-EHN

Le dosage du 2-EHN est réalisé par CPG avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les différentes étapes de la méthode sont illustrées par la **figure 3.2** :

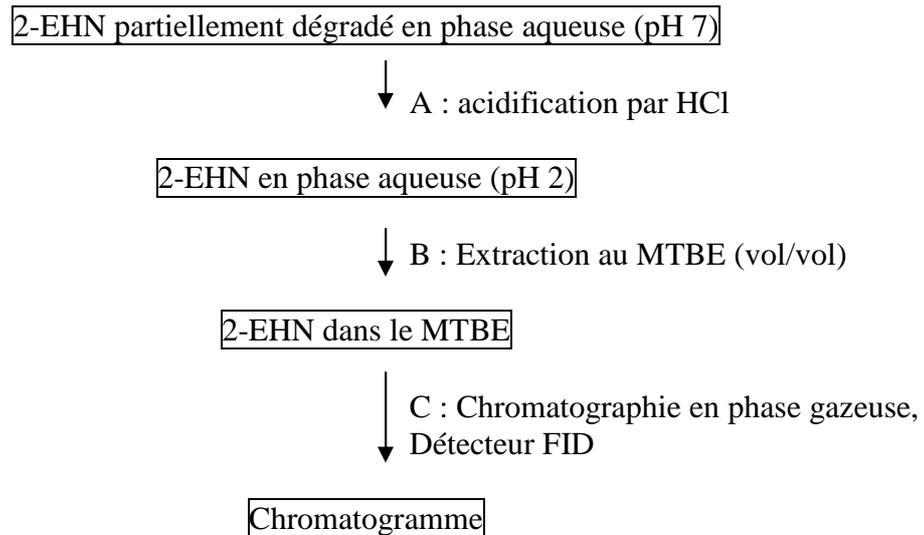


Figure 3.2 : Principe de la méthode de dosage du 2-EHN

Les conditions chromatographiques sont détaillées dans le **tableau 3.4**. L'acquisition est réalisée par le logiciel Browin et la concentration dans le MTBE est calculée en tenant compte du standard interne, la décaline sous forme *cis*- et *trans*-. Le rapport d'intégration de l'échantillon ainsi réalisé et focalisé sur 3 pics (deux pour la décaline, Tr = 14,2 et 15,7 mn et un pour le 2-EHN, Tr = 16,7 mn) est transféré dans un fichier Excel pour calculer la concentration selon la méthode du standard interne.

Tableau 3.4: Conditions chromatographiques pour l'analyse du 2-EHN résiduel par CPG/FID.

	Paramètres du chromatographe	Valeurs
	Colonne	Pona (équivalent DB1)
	Longueur	50 m
	Diamètre intérieur	0.2 mm
	Phase	Crosslinked methyl siloxane
	Épaisseur de la phase	0.5 μm
Méthode colonne :	1 ^{er} palier	
	Température initiale	100 °C
	Température finale	150 °C
	Pente	4 °C.mn ⁻¹
	2 ^{ème} palier	
	Température initiale	150 °C
	Température finale	259 °C
	Pente	20 °C.mn ⁻¹
Détecteur	Température	280 °C
Injecteur (Non programmé)	Température initiale	250 °C
	Split	30 mL.mn ⁻¹
Méthode d'injection	Volume	1 μL
	Vitesse	5 $\mu\text{L.s}^{-1}$
	Temps de séjour de l'aiguille	0 s
	Débit de fuite	0 $\mu\text{L.mn}^{-1}$
Gaz Vecteur (Hélium)	Pression d'entrée	26.5 psi
	Débit	0.8 mL.mn ⁻¹
Autres gaz	Make Up (N ₂)	23 mL.mn ⁻¹
	Air	290 mL.mn ⁻¹
	Hydrogène	35 mL.mn ⁻¹

2.1.3 GC-MS

L'identification des intermédiaires de dégradation est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les composés entrent directement dans le spectromètre de masse à leur sortie de colonne sans passer par un autre détecteur. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celles utilisées lors du dosage du 2-EHN (§ 2.1.2). Un autre mode d'injection a été testé, il s'agit de l'espace de tête statique à partir d'un échantillon aqueux. Les composés vaporisés et séparés à la sortie de la colonne de chromatographie entrent dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse, enceinte dans laquelle les molécules sont ionisées. L'ionisation de la molécule est obtenue par le bombardement de celle-ci par un faisceau d'électrons émis à partir d'un filament parcouru par un courant électrique. Les ions positifs sont accélérés par une série de champs électrostatiques, séparés et analysés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectre de masse est l'enregistrement de l'ensemble des fragments (ions) caractéristiques d'une molécule. Ces fragments sont caractérisés par une valeur particulière du rapport de leur masse sur leur charge (m/z), et par leur intensité comparée à l'intensité du fragment le plus abondant de la molécule auquel on donne la valeur 100. La référence à une banque de spectres de masse permet d'identifier les composés analysés.

2.1.4 HPLC couplée à un détecteur MS/MS

Les analyses d'ionisation chimique et les spectres MS/MS ont été réalisés par Mr Lucien KERHOAS à l'INRA de Versailles. Les conditions chromatographiques en HPLC sont les suivantes :

Le couplage (Quattro LC, Waters) comprend une chaîne HPLC intégrée avec un détecteur UV-visible Waters 2487 à deux longueurs d'onde réglables et un spectromètre de masse triple quadripolaire. Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur à boucle. Les colonnes utilisées ont en général un diamètre interne de 2 mm et les débits sont compris entre 100 et 250 $\mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$.

Le spectromètre de masse est un tandem MS-MS de type quadripolaire. Il est doté d'une source d'ionisation « Z-spray » fonctionnant en mode electrospray.

Les réglages standards des paramètres de la source electrospray sont les suivants :

- capillaire (Vcap) : - 3 kV (mode négatif) et + 3,25 kV (mode positif),
- cône de prélèvement : de 10 à 100 volts selon le cas et les objectifs de fragmentation visés,
- cône d'extraction : 1 à 2 volts,
- tension RF de l'hexapôle de transfert (Rf lens) : compris entre 0,1 et 0,5 V,
- gaz de désolvatation : 450 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ d'azote (valeur moyenne),
- gaz de nébulisation : fixé par le constructeur à 70-90 L/h d'azote.
- gaz de cône : 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ d'azote,
- températures : bloc source 120 °C, gaz de désolvatation 400 °C.

Les études CID (décomposition d'ions activés par collision) sont réalisées avec l'argon à la pression moyenne de $3.5 \cdot 10^{-3}$ torr. L'énergie de collision est réglable entre 0 et 200 eV (les valeurs usuelles dépassent rarement 75-100 eV).

Le pilotage de l'instrument (HPLC et MS), l'acquisition et l'analyse des données sont assurés par le logiciel MassLynx (version 4.0).

2.2 Dosage du carbone organique dissous

L'analyse globale du carbone organique total/dissous est réalisée à l'aide d'un appareil SHIMADZU TOC-5050A selon une méthode adaptée de la norme NF EN 1484.

La méthode consiste à doser le carbone organique total (COT) en soustrayant le carbone inorganique (IC) du carbone total (TC).

La teneur en carbone organique dissous (COD) est obtenue après filtration de l'échantillon aqueux sur un filtre PTFE présentant un seuil de filtration à 0.22 μm . La gamme de concentration de l'analyse du COT/COD par cette méthode varie de 0 à 3000 mg.L^{-1} . La gamme de mesure du carbone inorganique est comprise entre 3 et 50 mg.L^{-1} . La limite de quantification du COT/COD est de $3 \pm 0.6 \text{ mg.L}^{-1}$.

2.3 Méthodes de dérivation

2.3.1 Préparation de l'échantillon

L'échantillon à dériver est dans une phase aqueuse. Afin d'être dérivé, il doit être anhydre. C'est la raison pour laquelle l'échantillon est au préalable soit extrait par un solvant (cyclohexane ou MTBE) puis évaporé sous azote, soit lyophilisé. Afin d'hydrolyser un éventuel ester une saponification sans chauffage du milieu aqueux est réalisée, puis l'échantillon est lyophilisé.

2.3.2 Estérification

2.3.2.1 En milieu acide

Dans un tube à vis de 10 mL, 2 mL de méthanol contenant 1% de H_2SO_4 et 1 mL de toluène sont ajoutés à l'échantillon. Ce dernier est soit sous forme de dépôt dans le fond du tube suite à l'évaporation du solvant, soit sous forme de poudre séchée suite à la lyophilisation. Après 1h30 à 100°C dans un bain sec ou une étuve, 3 mL d' H_2O contenant 50 g.L^{-1} de NaCl sont ajoutés et l'échantillon est vigoureusement vortexé. 5 mL de cyclohexane sont alors ajoutés afin d'extraire l'échantillon estérifié et de l'analyser par CPG/FID.

2.3.2.2 En milieu alcalin

Dans un tube à vis de 20 mL, 1 mL de méthoxyde de sodium dans le méthanol est ajouté à l'échantillon à estérifier qui se trouve dans le cyclohexane. Le mélange est incubé pendant 1h à 4°C sous agitation. Afin de déshydrater l'échantillon, 5 μL d'acide acétique anhydre et 1 g de CaCl_2 sont ajoutés à l'échantillon. Après 1h à température ambiante, le tube est centrifugé 5000 g pendant 2 mn et le surnageant est alors analysé par CPG/FID.

2.3.3 Silylation

La silylation est réalisée à partir de 3 mL d'échantillon lyophilisé repris dans du cyclohexane, ou 3 mL d'échantillon extrait dans le solvant ou de l'échantillon préalablement

estérifié dans le solvant. A ces 3 mL de produit dans le solvant est ajouté 1 mL de mélange de HMDS (1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane) – TMCS (trimethylchlorosilane) –pyridine (3:1:9) (Supelco). Après 30 mn d'incubation à 30°C, 1 mL de H₂O est ajouté pour éliminer l'excès de pyridine. La phase organique est alors analysée par CPG/FID.

3 Méthodes de biologie moléculaire

3.1 Extraction d'ADN génomique de *Mycobacterium*

L'ADN génomique de *Mycobacterium* a été extrait selon le protocole décrit par Heiss *et al.* (Heiss-Blanquet *et al.*, 2005).

3.2 Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont dosés à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Thermo Fischer Scientific). 1 µL de préparation d'ADN ou d'ARN est déposé sur la lampe. Il n'est pas nécessaire de faire de dilution de l'échantillon l'absorbance lue à 260 nm peut être comprise entre 0,04 et 74. La concentration en acides nucléiques est calculée selon les formules suivantes : Concentration d'ADN = D.O.₂₆₀ x 50 ou d'ARN = D.O.₂₆₀ x 40.

3.3 Réactions d'amplification par PCR

Les réactions d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sont réalisées par la polymérase GoTaq® (Promega) en présence d'amorces spécifiques ou universelles (**tableau 3.5**) dans le milieu réactionnel suivant:

-Tampon PCR 5x :	10 µL
-DNA Taq polymerase	0,2 µL
-MgCl ₂ (25mM)	2 µL (concentration finale 1 mM)
-Oligonucléotides (100 µM)	0.5 µL (pour chacune des amorces : 1µM final)
-dNTPs (10 mM)	1 µL (ATP, TTP, GTP et CTP: 0.2 mM final)
-ADNg	0.5 µg
-Eau déminéralisée <i>q.s.p.</i>	50 µL

La polymérase « Platinum® High fidelity » (Invitrogen) a aussi été utilisée, selon les recommandations du kit. A la différence de la GoTaq®, elle amplifie l'ADN avec une fidélité accrue et forme des produits PCR avec des bouts francs. La température d'élongation est de 68°C au lieu de 72°C pour la GoTaq. Le programme d'amplification PCR est présenté sur la **figure 3.3**.

Tableau 3.5: Amorces utilisées pour la recherche et le clonage de gènes d'intérêt

Gène cible et tailles du produit PCR	Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Tm °C	Nombre de mers
ADNr 16S amorces universelles				
≈ 1600 pb	8-F	AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG	53	20
	1492-R	CGGTTACCTTGTTCACGACCT	53	20
ADNr16S partiel de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
501 pb	P16S-F	GGTCTAATACCGAATACACCCTTCT	60	25
	P16S-R	CCAGGAATTCCAGTCTCCC	59	19
<i>alkB1</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
301 pb	AlkB1F	CGTGATCATGGGTGCCTAC	62	19
	AlkB1R	CCAGAACGTCTCACCGAAG	62	19
<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> : clonage dans <i>pHLD69</i>				
2418 pb	*alkB1C-F	CCGAGCATTGCTGAAGGT	59	18
	*alkB1C1-R	CGCTTGTCTGGTGGAGAGG	60	18
3063 pb	*alkB1C2-R	GCGACCTTGTAGTCCAGACC	59	20
<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> : clonage dans <i>pET9a</i> et <i>pET15b</i>				
1272 pb	*NdeI_alkB1C-F	CGCATATGTCCTCAAGCCCGACGTCG	55	24
	*BamH_alkB1C-R	GGCCTAGGTCACGCCTTGCCCTCCTTGC	55	27
1446 pb	*BamH_rubA1C-R	GGCCTAGGTCACCTCTTAACCTCCCATCTC	52	29
1629 pb	*BamH_rubA2C-R	GGCCTAGGTCACGGCCGGGCGACTTC	57	26
<i>alkB2</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
≈ 208 pb	AlkB2-F	CCTGATGTTTCCTCGTGATCC	62	20
	AlkB2-R	CTTGTCGACGTGCGTTCATC	62	19
<i>alkB2-ssh</i> : clonage dans <i>pHLD69</i>				
1667 pb	AlkB2C-F	ATGGACGTCATCGAATCCAC	60	20
	AlkB2C-R	TGGTATCTGGAACGGCTCTC	60	20
2592 pb	AlkB2CBIS-R	CTGATTCGGACTCTGGTTCC	60	20
<i>alkB2</i> : clonage dans <i>pET19a</i> et <i>pET15b</i>				
1667 pb	NdeI_alkB2-F	CCCATATGCCGATTCAGCAGCGCTC	56	25
	BglSpe_alkB2-R	CTCTAGACTAGTCAGCCGTACCGCCGCAATA	56	31
Estérase putative de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
≈975 pb	Este-F	CATATGATGAGACTTCTTGACAGGATTCG		29
	Este-R	AGATCTTCAGAGAAGGTGCGCCTG		24
<i>cyp153</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
1261 pb	CYP153vB-F	GCATATGACCGAAATGACGGTG	50	21
	CYP153vB-R1	CGGATCCTCAGGCGTTGATGCGCAC	53	25
182 pb	CYP153d-F	ATHATGGCNGTNGARACNAAYCC	55	23
	CYP153d-R	TCCATNGTNGCNARRTTYTCNGG	55	23
<i>cyp153</i> amorces universelles (Van Beilen <i>et al.</i>, 2005)				
339 pb	P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	58	20
	P450rv3	GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA	58	24

Les sites de restrictions intégrés aux oligonucléotides sont soulignés. La légende figure ci-dessous, dans le sens 5' → 3' :

NdeI : CATATG BamHI : GGATCC BglIII : AGATCT SpeI : ACTAGT

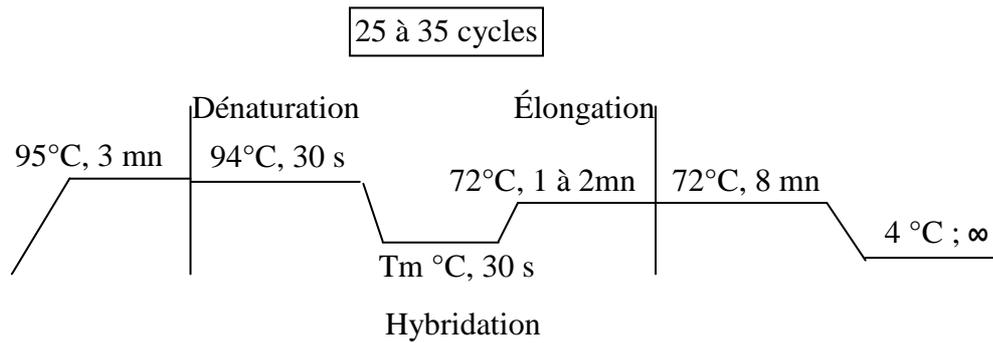


Figure 3.3 : Programme PCR d'amplification de l'ADNg

Pour analyser le produit de l'amplification, 10 μ L de chacune des réactions de PCR sont déposés sur gel d'agarose préparé dans du TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5X. La concentration d'agarose varie de 0,5 % pour les gros fragments (> à 3000 pb) à 2 % pour les très petits fragments (\approx 200 pb). Les marqueurs d'ADN GeneRuler™ 100 pb ou 1 kb (Fermentas) sont aussi déposés pour calibrer le gel. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et les bandes d'ADN révélées sous lampe U.V. à 254 nm. Le gel est photographié à l'aide d'une caméra (SYNGENE) reliée à un ordinateur avec un logiciel d'acquisition Gel Snap (SynGene, Cambridge, UK).

3.4 Clonage de fragments d'ADN

3.4.1 Purification de fragments d'ADN

L'insert est issu soit d'un produit PCR (§ 3.3), soit de la digestion d'un vecteur par des enzymes de restriction (Eurogentec, Fermentas ou Promega) dans le tampon adéquat pendant 1 à 3 h à 37°C. La réaction enzymatique de digestion est interrompue par 3 μ L pour 20 μ L de volume réactionnel d'une solution « stop » composée de 40 % de sucrose, d'EDTA 50 mM et de bleu de bromophénol. Le produit PCR ou de digestion est déposé sur gel d'agarose tel que décrit dans le §3.3. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et révélé aux U.V. à 254 nm sur un transilluminateur. L'insert est découpé à l'aide d'un scalpel et purifié avec le kit QIAEX II (Qiagen).

3.4.2 Préparation du vecteur de clonage

Pour l'utilisation du vecteur digéré, il est préférable de ne pas le déposer sur gel comme lors de la purification de fragments d'ADN (§ 3.4.1), mais de le purifier de ses sels et de ses enzymes directement avec le kit de purification QIAEX II (Qiagen).

3.4.3 Utilisation du kit de clonage pDrive

Lorsque la PCR a été réalisée avec une taq polymérase qui coupe les gènes avec des bouts francs (ce n'est pas le cas pour la GoTaq® (Promega), majoritairement utilisée), il est nécessaire de faire une addition d'adénosine aux extrémités des fragments de gène avant de l'insérer dans le plasmide pDrive. Le cas échéant, le kit Qiagen A-Addition est utilisé. La ligation est réalisée avec le kit de clonage pDrive (Qiagen) et la T4 ligase (Promega).

3.4.4 Ligation et clonage

3.4.4.1 Ligation

Les ligations vecteur-insert ont été réalisées à température ambiante à l'aide du kit « Rapid DNA ligation » (Fermentas) selon les recommandations du kit avec la T4 ligase (Promega). Un ratio molaire vecteur / insert variant de 1:1 à 1:5 a été utilisé.

3.4.4.2 Préparation des cellules compétentes

Les cellules d'*E. coli* DH5 α , BL21 DE3 ou Rosetta sont mises en culture dans un milieu Phi B, puis elles subissent un traitement avec des tampons riches en sels afin de rendre les membranes plus perméables. Le milieu de culture des cellules Phi B est composé de 20 g.L⁻¹ de Bactotryptone, 5 g.L⁻¹ de Bacto yeast extract avec un pH ajusté à 7,6. 20% de MgSO₄, 7H₂O stérile sont ajoutés juste avant l'utilisation du milieu. Après une préculture et une culture de 100 mL atteignant une D.O.₆₀₀ comprise entre 0,4 et 0,8, la culture est centrifugée à 5000 g à 4°C, et le culot repris dans du tampon RF1 composé de 30 mM d'acétate de potassium, 100 mM de KCl, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂ et de 15% (v/v) de glycérol. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est stérilisé par filtration. Après une centrifugation à 5000 g à 4°C le culot est alors mis en suspension dans du tampon RF2 composé de 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂ et 15% glycérol. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est stérilisé par filtration. Les cellules sont alors réparties par fractions aliquotes de 50 μ L dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL en veillant à bien laisser les tubes et les cellules dans la glace. Ces dernières sont conservées à -80°C.

3.4.4.3 Transformation des cellules compétentes

5 μ L de mélange de ligation sont ajoutés à 50 μ L de cellules chimiocompétentes d'*Escherichia coli* DH5 α ou BL21 DE3 ou Rosetta. Le mélange est incubé 30 mn sur la glace. Un choc thermique de 1 mn à 37 °C est réalisé puis 450 μ L de milieu LB sont ajoutés. Les cellules sont incubées 1 h à 37°C, puis 50 μ L de suspension sont étalés sur milieu gélosé LB contenant l'antibiotique approprié. Les boîtes de Petri sont incubées une nuit à 37°C.

3.4.4.4 Sélection des clones positifs par PCR sur colonie

Les clones sont repris dans 15 µL de H₂O dans des tubes de 0,5 mL. Puis 2 µL de suspension sont transférés dans un tube PCR auquel est ajouté 10 µL de mix PCR (comme décrit dans le § 3.3). Afin de faire éclater les cellules d'*E. coli* puis de dénaturer l'ADN, le programme PCR commence avec 5 mn d'incubation à 95°C au lieu de 3 mn classiquement. Après analyse sur d'agarose des produits PCR, un des clones ayant donné une réponse positive (fragment de PCR de la taille attendue) est mis en culture sur milieu LB, en présence de l'antibiotique de sélection la nuit à 37°C.

3.4.4.5 Extraction de plasmides

Après une culture de 30 à 200 mL sur milieu LB en présence d'antibiotique incubée à 37 °C sur la nuit, une partie des cellules contenant le plasmide et son insert sont centrifugées puis les plasmides sont extraits par le kit NucleoBond PC-100 (Macherey-Nagel).

3.4.4.6 Vérification de la présence de l'insert dans les plasmides par digestion

Une digestion (d'au minimum 100 ng de plasmide) avec les enzymes de restriction appropriées est réalisée pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Le produit digéré 1 h est alors déposé sur gel d'agarose (§ 3.3) avec un marqueur d'ADN GeneRuler™ 100 pb ou 1 kb (Fermentas). Après migration et coloration la taille des produits digérés est visualisée sur la photo du gel réalisée sur lampe UV. Si la taille du produit digéré est bonne, la souche ayant servi à la préparation du plasmide est stockée à – 80°C dans 40% de glycérol.

3.5 Transformation de *Mycobacterium smegmatis*

3.5.1 Préparation de cellules compétentes

Une culture de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 ou mc²4517 est préparée dans 200 mL de milieu 7H9 pendant environ 48 h à 30°C jusqu'à obtenir une DO₅₅₀ comprise entre 3 et 4. Les cellules bactériennes sont refroidies dans la glace pendant 50 mn en agitant toutes les 10 mn. La culture est répartie dans quatre tubes Falcon de 50 mL préalablement refroidis dans la glace. Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 mn à 4°C à 5000 g. Le surnageant est éliminé et deux lavages successifs à l'eau distillée stérile sont effectués en réduisant le volume de moitié à chaque lavage. Un dernier lavage est effectué avec 5 mL de glycérol 10%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans le volume minimum nécessaire à l'électroporation (Les cellules sont concentrées 100 à 500 fois par rapport au volume initial de la culture). Les cellules électrocompétentes peuvent être réparties en tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL à raison de 100 µL/tube, puis stockées à -80°C.

3.5.2 Transformation par électroporation et sélection des transformants

A 100 µL de suspension cellulaire, sont ajoutés 1 à 5 µL de plasmide (1 µg) dilué dans du tampon TE. Le mélange est vigoureusement vortexé puis laisse au repos 10 mn dans la glace. La solution est transférée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie (Eurogentec® 200 µl ; Ø = 2 mm). Cette dernière est placée dans la chambre de l'électroporateur (Eppendorf™ Electroporator 2510). Un pulse de 2500 V est appliqué puis les cellules sont immédiatement placées dans un tube Falcon 50 ml contenant 5 mL de milieu PTYG₂ pour *M. smegmatis* mc²155 ou 5 mL de milieu 7H9 pour *M. smegmatis* mc²4517 et incubées pendant 4 h à 30°C sous agitation (150 rpm) afin de permettre l'expression des gènes de résistance à l'antibiotique porté par le plasmide. 100 µl de suspension cellulaire sont étalés en triplicata sur boîte de Petri PTYG₂₀ pour *M. smegmatis* mc²155 ou sur boîte de Petri 7H10 pour *M. smegmatis* mc²4517 avec l'antibiotique sélectif du plasmide. Les boîtes de Petri sont incubées à 30°C environ 1 semaine.

3.6 PCR couplée à la transcription inversée

3.6.1 Méthode d'extraction des ARN totaux de souches de *Mycobacterium*

Pour les expériences d'extraction d'ARN, le matériel, les solutions et la vaisselle ont été préparés de manière à éviter la contamination par des RNases selon les procédures standards (Sambrook *et al.*, 1989).

L'ARN total de *Mycobacterium* est extrait à partir de 50 mL d'une culture à D.O._{600nm} de 0,7. Après incubation 30 mn sur glace, les cellules sont centrifugées (8000 g pendant 10 mn à 4°C) et conservées sur glace. Par la suite, le culot est repris dans un volume total de 200 µL dans du tampon Tris-HCl 20 mM – EDTA 5 mM pH 8 avec 1.5 mg.mL⁻¹ de lysozyme et 25 µg.mL⁻¹ de lysostaphine (Sigma). Le mélange est incubé à 37°C durant 30 mn. 700 µL de RNAwiz™ (Ambion) sont ajoutés par la suite et le mélange est vortexé pendant 15 s. Le mélange est ensuite fractionné dans des tubes de 1.5 mL (450 µL/tube) contenant 250 mg de billes de zirconium-silica (0,1 mm de diamètre). Les tubes sont placés dans un adaptateur pour vortex (Ambion) et vortexés pendant 10 mn. Le protocole du kit RiboPure™-Bacteria (Ambion) est suivi pour la fin de l'extraction. La quantité d'ARN est dosée sur 1 µL au Nanodrop (Nanodrop Technologies). L'ARN est alors traité à la TurboDNase (Ambion) selon le protocole du kit. L'ARN est précipité avec 1/10^{ème} volume d'acétate de sodium 3 M à pH=5.2 et 2 volumes d'éthanol à 95% à -80°C.

3.6.2 PCR couplée à la transcription inversée (RT-PCR)

Les expériences de RT-PCR ont été mises en œuvre selon le protocole du kit « One step RT-PCR » de PROMEGA (Madison, WI, USA) tel qu'il est décrit par le fabricant. 1 ng d'ARN a été utilisé à chaque tentative de RT-PCR avec, à chaque fois en parallèle, une amplification PCR contrôle positive (et négative) avec (ou sans) 1 ng d'ADNg de *M. austroafricanum* IFP 2173.

Les conditions de RT-PCR sont les suivantes :

- 1 Étape de reverse transcription : 45 mn à 45 °C
- 2 Cycle PCR : 25 à 35 cycles (variable en fonction de l'intensité du signal) :
 - 95 °C 30 s
 - 55-62 °C 30 s à 1 mn (en fonction du Tm des amorces et de la taille de l'amplicon)
 - 72 °C 1 mn
- 3 Extension finale : 72 °C 10 mn
- 4 Conservation des échantillons : ∞ à 4 °C

4 Méthodes biochimiques

4.1 Préparation des extraits protéiques

4.1.1 Extraits bruts

Des cultures de *M. austroafricanum* IFP 2173 sont réalisées sur le milieu MMSYE supplémenté avec l'une des sources de carbone suivantes : 2-EHN (500 mg.L⁻¹), acétate (4 g.L⁻¹), glucose (2 g.L⁻¹), succinate (4 g.L⁻¹), éthanol (1 g.L⁻¹) ou tween 80 (2,5 g.L⁻¹). Après croissance jusqu'à une D.O.₆₀₀ ~0,8, les cellules sont récoltées par centrifugation à 12 000 g pendant 15 mn à 4°C. L'extraction des protéines est faite autant que possible à 0-4°C.

Les culots cellulaires sont lavés deux fois par du tampon Tris 50 mM pH 8 additionné de EDTA 5 mM. Comme les cellules de *M. austroafricanum* IFP 2173 sont très hydrophobes, afin de perdre le moins de cellules possible, les culots sont congelés à -20°C puis décollés congelés à l'aide d'une spatule pour être placés dans un tube à fond conique en verre. Du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 additionné de 5 mM d'EDTA est alors ajouté dans le tube à raison de deux fois le volume du culot de cellules. Les cellules sont lysées par traitement 10 mn aux ultrasons avec la microsonde conique d'un appareil Vibra Cell (Bioblock Scientific) réglé à une amplitude de 20%, avec une alternance de séquences « on/off » de 5 s. Afin d'éviter l'échauffement, le tube est placé dans de la glace pendant toute la durée de la sonication. Un extrait brut de protéines est ensuite obtenu par centrifugation (13 000 g, 10 mn à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires.

4.1.2 Fractions soluble et membranaire

L'extrait brut est centrifugé pendant 1 h à 240 000 g à 4° C à l'aide d'une ultracentrifugeuse Optima TLX (Beckman). Le surnageant constitue alors la fraction soluble. Le culot de centrifugation est repris par du tampon HEPES 25 mM pH 7.5 contenant 10 % d'éthylène glycol, la solubilisation est effectuée par aspiration et refoulement successifs à l'aide d'une pipette.

4.1.3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de (Bradford, 1976). Une gamme d'étalonnage de 0 à 12.5 µg de BSA (bovin serum albumin) est réalisée. Un millilitre de colorant est ajouté. Après une homogénéisation par retournement et une incubation de 5 mn, la lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm. Les échantillons protéiques sont dosés de la même façon sur 1 à 10 µL d'extrait protéique.

4.1.4 Isolement rapide de protéines par chromatographie d'affinité de type IMAC

Grâce à l'extrémité polyHistidine (His-Tag) introduite en N-ter par construction, les protéines recombinantes surproduites avec le vecteur pET15b peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité sur résine polymérique sur laquelle sont fixés des métaux divalents comme le cobalt, le nickel, le zinc. Le protocole de purification utilisé emploie une résine d'affinité de type TALON (BD Biosciences Clontech) sur laquelle est fixée du cobalt. La résine est conservée dans de l'EtOH 20%. La résine (30 mg essorée) est placée sur un minifiltre SpinX de 0,45 µm (Costar), adaptable sur tube de centrifugation Eppendorf. L'équilibration de la résine est effectuée avec 400 µL de tampon A (Tris-HCl 25 mM pH 7,5 + NaCl 0,5 M + glycérol 5%). La résine est essorée par une centrifugation de 0,5 s à 10 000 rpm. L'extrait protéique (≈ 50 à 200 µL), dialysé le cas échéant pour éliminer l'EDTA (chélateur des métaux incompatible avec la résine), est déposé dans le réservoir du filtre. Après 5 mn d'agitation à température ambiante, le surnageant est éliminé par centrifugation. Deux lavages sont alors effectués avec 500 µL de tampon A et un troisième avec 500 µL de tampon A contenant 10 mM d'imidazole. La faible concentration d'imidazole permet d'éliminer les protéines faiblement retenues sur la colonne. L'élution est réalisée avec 30 µL de tampon C, composé de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glycérol 5% et 0,15 M d'imidazole. L'éluat protéique est dénaturé avec 10 µL de SDS mix 4X et analysé par SDS-PAGE sur 10 µL.

4.2 Analyse des protéines par électrophorèse

4.2.1 Gels SDS PAGE

4.2.1.1 Gels Glycine-SDS-PAGE

Les protéines présentes dans les extraits bruts sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gels de polyacrylamide contenant 12.5% d'acrylamide / bisacrylamide (37,5:1) et réalisés selon (Laemmli, 1970).

Les protéines solubles sont dénaturées pendant 3 mn à 100°C en présence de 1 % de SDS, 10 % de glycérol, 2,5 % de β -mercaptoéthanol 0,001 % de bleu de Bromophénol dans du Tris-HCl 12,5 mM pH 6,8. Une fraction aliquote de protéines contenant de 5 à 50 μ g de protéines est déposée dans chaque puits ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Protein Ladder, 10-200 kDa, Fermentas). La séparation des différentes polypeptides est effectuée par électrophorèse à ampérage constant (A = 30 mA). Le tampon de migration est composé de 25 mM de Tris, 200 mM de Glycine et de 0,1 % de SDS.

4.2.1.2 Gel Tricine-SDS-PAGE

Ces gels ont servi à analyser des protéines membranaires, car ils offrent une meilleure résolution des protéines hydrophobes. Les protéines membranaires sont dénaturées pendant 15 mn à 1 h à 37°C dans un mélange de SDS (4 %), β -mercaptoéthanol (10 %) glycérol (40%) Bleu de Bromophénol (0,004%) et Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 dilué dans 3 volumes de mélange protéique. Les gels ont été réalisés selon le protocole décrit par Schagger (2006).

4.2.2 Electrophorèse bidimensionnelle

4.2.2.1 Préparation des échantillons pour la première dimension

4.2.2.1.1 Dialyse des extraits solubles de protéines

Les boudins de dialyse, contenant les fractions solubles de protéines additionnées de benzonase (Merck) (1 μ L pour 100 μ L), sont trempés 2 à 5 h dans du tampon phosphate 5 mM pH 7,5 et MgCl₂ 1 mM à 4 °C, puis toute la nuit dans de l'eau milliQ à 4 °C. Le boudin de dialyse a un seuil de coupure de 3500 Da (Spectra/Por®). Les extraits dialysés sont concentrés par lyophilisation si la teneur en protéines est jugée trop faible pour l'analyse sur gel.

4.2.2.1.2 Hydratation des bandelettes avec l'extrait protéique

La quantité de protéines à déposer sur la bandelette doit être de 200 à 250 μ g pour une coloration à l'argent ou de 400 μ g pour une coloration au bleu de Coomassie.

Les protéines sont mélangées dans une solution contenant de l'urée (9M), du CHAPS (2%), du DTT (0,15 %) du bleu de Bromophénol (0,02 %) et des Pharmalites (pH 3-10, Sigma) (2 %). Le volume total de mélange doit être de 450 µL. Afin de bien homogénéiser le mélange et dissoudre l'urée, les échantillons sont agités dans un bain sec à 30°C. Puis ils sont centrifugés 5 mn à 14 000 g pour éliminer la fraction insoluble. Les bandelettes ReadyStrips™ (18 cm - pH 4-7, Biorad) sont réhydratées pendant 5 à 6 h à température ambiante avec la préparation protéique, au préalable centrifugée, dans le compartiment de la cuve de réhydratation en la répartissant sur toute la longueur. La bandelette est glissée dans le compartiment côté gel en dessous en veillant à ne pas faire de bulles. De l'huile de paraffine recouvre le tout pour éviter la déshydratation au cours du gonflement de la bandelette.

4.2.2.2 Isoelectrofocalisation (IEF)

Les bandelettes sont placées dans la cuve de l'appareil d'isofocalisation (LKB Multiphore II, Pharmacia) en respectant la polarité. Des ponts de papier imbibés d'eau assurent la continuité électrique entre les bandelettes et les électrodes placées sur les ponts. L'ensemble est recouvert d'huile de paraffine et maintenu à température constante par un circuit d'eau de refroidissement. L'électrophorèse se fait dans les conditions suivantes :

150 V	3 h	0.2 mA	10W
300 V	2 h	0.2 mA	10W
700 V	1 h	0.2 mA	10W
1500 V	1 h	0.2 mA	10W
3500 V	20 h	0.2 mA	10W

L'isofocalisation complète des protéines requiert un total de 70 000 V.h. A la fin de l'IEF, les bandelettes sont stockées à -20°C dans des tubes en verre bouchés.

4.2.2.3 Equilibration des bandelettes pour la deuxième dimension

La solution d'équilibration est composée d'urée (6 M) de Tris (50 mM), de glycérol (30 %), de SDS (1 %) et de bleu de bromophénol (0,01 %). Le pH est ajusté à 8,8.

2,5 g.L⁻¹ de DTT sont ajoutés extemporanément à la solution d'équilibration. Les bandelettes sont incubées avec 5 mL de solution d'équilibration 30 mn à température ambiante avec agitation.

4.2.2.4 Deuxième dimension

De grands gels (200 x 200 x 1 mm) contenant 12,5 % d'acrylamide sont réalisés en tampon Tris-glycine-SDS. Le mélange d'acrylamide est soumis à un dégazage sous vide pendant 10 mn pour favoriser la polymérisation avant l'ajout de persulfate. Il n'y a pas de gel de concentration, la bandelette est directement placée sur le gel de résolution et recouverte

d'agarose à 1 % (dans le tampon de migration). L'ampérage est réglé à 15 mA en début d'électrophorèse pendant 20 mn. puis à 40 mA par gel jusqu'à la fin (soit environ 4-5 h).

4.2.3 Coloration au bleu colloïdal

Après démoulage du gel, les protéines sont fixées par trempage dans un mélange de 30 % d'éthanol, 2 % d'acide orthophosphorique 85 % (3 à 4 fois 30 mn ou pendant la nuit). Le gel est alors rincé par 2% d'acide orthophosphorique 85 % (3 fois 15 mn). Enfin, le gel est coloré dans une solution qui contient (dans l'ordre) : 2% d'acide orthophosphorique 85%, 12,5% de sulfate d'ammonium, 20 % d'éthanol et 5 mL.L⁻¹ de Bleu G-250 à 2% (préparé dans l'eau chaude). Le gel est conservé dans de l'eau contenant 2% de glycérol, photographié, et parfois séché au four (Easy Breeze gel Dryer, Hoefer Scientific Instrument) entre deux feuilles de papier cellophane.

4.2.4 Découpage des gels d'électrophorèse

Les spots ou bandes colorées correspondant aux protéines d'intérêt séparées par électrophorèse 1D ou 2D sont découpées du gel à l'aide d'un scalpel ou d'un emporte pièce sur une plaque de verre préalablement nettoyée au savon et à l'eau chaude puis à l'alcool pour éliminer toute trace de kératine. Les spots ou bandes sont placées dans des tubes « Biopur » (Eppendorf) de 0,5 mL avec 5% d'éthanol.

4.3 Analyse LC-MS-MS des spots

Ces analyses ont été effectuées par Mathilde Louwagie et Laurianne Kuhn du laboratoire d'Etude et de Dynamique des Protéomes du CEA de Grenoble.

4.4 Activité sur gel d'électrophorèse

Afin de visualiser une activité estérase ou peroxydase sur gel, les échantillons protéiques à analyser sont séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes. Pour ce faire, l'extrait protéique est mélangé à quelques mg de sucrose et de bleu de bromophénol avant le dépôt sur un gel d'acrylamide à 12,5%. Le gel est préparé en tampon Tris-Borate 0,1 M, pH 9.

4.4.1 Activité estérase

L'activité estérase est mise en évidence par une coloration spécifique au Fast Blue RR (Sigma) en présence d' α -naphtyl acétate (Sigma) Après migration à ampérage constant 30 mA, le gel est coloré dans un tampon phosphate 0,1M pH 6.2 contenant 2% d' α -naphtyl

acétate et 5 % de Fast Blue RR. La lecture est effectuée après 15 mn d'incubation. L'apparition d'une coloration noire est révélatrice de l'activité.

4.4.2 Activité peroxydase

La présence d'un cytochrome P450 peut être mise en évidence par une coloration au TMBZ (3,3',5,5' tétraméthyl benzydine, Sigma). Après séparation électrophorétique, le gel est immergé à l'abri de la lumière dans une solution de TMBZ (450 mg.L⁻¹) dans une solution d'acétate de sodium 25 mM, pH 5 contenant du méthanol (30%). Après une heure d'incubation, du peroxyde d'hydrogène est ajouté à raison de 0,1 % final. Après 15 mn d'incubation avec une agitation, une coloration bleue témoigne de l'activité peroxydase.

4.5 Western Blot

Cette méthode a pour objectif de vérifier la présence de protéines recombinantes obtenues avec le vecteur pET15b ayant une étiquette poly-histidine par détection immunoenzymatique dite de Western Blot.

2 µg de protéine purifiée ou 20 à 100 µg d'extrait protéique total sont séparés sur un gel SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Optitran BAS83) sous l'effet d'un champ électrique (Fast-Blot B33, Biometra. 150V pendant 20mn). Une coloration rapide de la membrane au rouge Ponceau-S (1% dans l'acide acétique 5% (v/v)) permet de vérifier le transfert de protéines et de découper la bande du marqueur. Après rinçage dans du PBS-Tween (NaCl 0,14 M ; KCl 2,7 M ; KH₂PO₄ 1,5 mM ; Na₂HPO₄ 8,1 mM et Tween 20 0,5% (v/v)), la membrane est incubée avec de la BSA (3% p/v) dans du PBS-Tween pendant 30 mn à 1 h. La membrane est ensuite incubée avec des anticorps anti-His-Tag couplés à la peroxydase Sigma (d = 1/3000) dans du PBS-Tween pendant 1 h. Après 5 lavages de 2 mn dans du PBS-Tween, la membrane est essorée légèrement avec un papier absorbant puis recouverte de réactifs ECLTM (Amersham) pendant 1 mn. La membrane est égouttée et placée dans une cassette contre un film photographique ECLTM. Après une durée d'exposition de 10 s à quelques mn selon l'intensité du signal, le film est révélé selon un procédé photographique classique.

5 Outils bioinformatiques

Les séquences de nucléotidiques ou peptidiques ont été alignées par le logiciel ClustalX. Les arbres phylogéniques ont été réalisés selon la méthode du Neighbour Joining et visualisés avec le logiciel TreeView. Ces logiciels sont téléchargeables gratuitement sur le site suivant : http://mybiopack.ifrance.com/mybiopack_en.html.