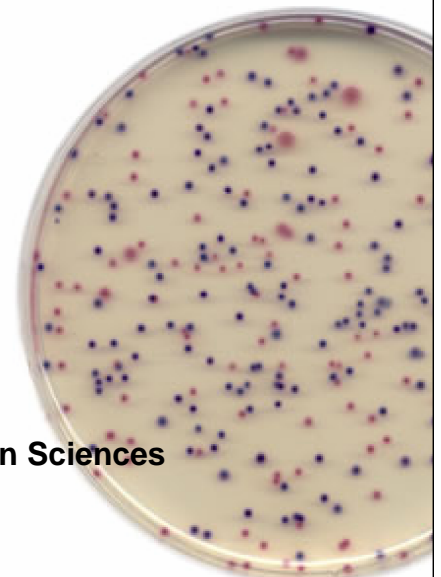


Université de Liège
Faculté des Sciences
Laboratoire des Macromolécules Biologiques
Prof. M. Galleni



Etude de la diversité enzymatique des microorganismes du sol par l'approche métagénomique



**Thèse présentée par
Renaud Berlemont
En vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Année académique 2008-2009**

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier le Professeur Moreno Galleni pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir témoigné sa confiance à de nombreuses reprises et enfin pour avoir continué d'y croire quand les problèmes s'accumulaient.

En outre, ce travail résulte pour une bonne part des contacts quasi quotidiens qui me lient aux membres du Centre d'Ingénierie des Protéines. A raison de huit heures par jours, ce sont deux années entières de ma vie que j'ai passé en leur compagnie !

Pour leurs conseils scientifiques et techniques, je tiens vivement à remercier Nicole, Pablo, Andy, Steph, Fabrice, Anne-Marie, Georges F., Moreno et le Professeur Jean-Marie Frère.

Mes pensées vont également à tous mes collègues qui ont su témoigner de l'intérêt pour mon travail :

Aux membres du « coffee-club » de la biochimie avec lesquels, pendant ces six ans, ce sont près 1200 tasses de cafés que j'ai englouties. Pour leurs discussions cinématographiques, journalistiques, ludiques, et rarement scientifiques ; merci à Fabienne, Florence, Oli, Fred, Etienne, René, Mr Gerday, Georges F., Georges M., Dédé et Salvino.

Aux membres du Laboratoire des Macromolécules Biologiques qui ont supporté, pendant six ans, mon humeur ; merci à Marylène, Marie-Eve, Delphine, Sophie, Astrid, Paola, Patricia, Carine, Adrien, Oli, Lio, JS, Sapu, Joseph, Etienne, JMF, Patrice, Nourredine et Gilles.

Aux personnes, étudiants et doctorants qui ont participé, au cours de ces six ans, à l'aventure métagénomique ; merci à Christophe, Fabrice, Gianluca, Maud, Delphine et Pablo. Merci au Professeur Rolf Daniel de l'Université de Göttingen et à son équipe pour m'avoir encadré lors de mes premiers pas dans le monde de l'écologie microbienne

Enfin, mes pensées vont aux membres de ma famille et à mes amis qui m'ont soutenus et encouragés tout au long de ce travail. Un grand merci à ma maman, qui a su si habilement faire semblant de comprendre ce que je faisais pendant ces années. Merci pour avoir pris la peine de relire ce manuscrit « pour le moins compliqué ».

Je remercie tout particulièrement Salima et Eliott d'être ce qu'ils sont et de faire de moi ce que suis.

Renaud

Abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	ADN environnemental
ARN	Acide ribonucléique
ARN _r 16S	ARN de la petite sous unité ribosomale (16S)
BAC	Chromosome artificiel bactérien
CBD	Carbohydrate Binding Domain
Cf	Concentration finale
CFU	Colony Forming Unit
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DSC	Digital Scanning Calorimetry
E.C.x.x.x.x	Classification enzymatique (www.expasy.org/enzyme/)
ED	Expression dépendante
EDTA	Ethylènediamine tétraacétate
EI	Expression indépendante
EFT	Expression en fusion transcriptionnelle
Gb	Gigabase (1000 Mb)
GH	Glycoside hydrolase
GPC	Gel Permeation Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
Mb	Mégabase (1000 kb)
OST	Organic Solvent Tolerant
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Protein DataBase
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PNPe	p-nitrophényl-ester
PNPA	p-nitrophényl-acétate
PNPB	p-nitrophényl-butyrate
PNPC	p-nitrophényl-caprilate
PNPD	p-nitrophényl-décanoate
PNPS	p-nitrophényl-stéarate
PP1	Banque métagénomique PP1 (voir chapitre 3 et 7)
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RB1	Banque métagénomique RB1 (voir chapitres 3 et 5)
RBS	Ribosome Binding Site
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEM	Scanning Electron Microscopy
TLC	Thin Layer Chromatography

Table des matières

Remerciements

Table des abréviations

Table des matières

Préambule 1

Chapitre 1 Introduction : La métagénomique 3

1. La métagénomique 5

1.1 Contexte général 5

1.2 Des microorganismes non cultivables 6

1.3 Les bactéries dans l'environnement 8

1.4 La « métagénomique » 11

1.4.1 Emergence de la métagénomique 11

1.4.2 La création de banques métagénomiques 12

1.4.3 La préparation de l'ADN environnemental 13

1.4.3.1 L'extraction de l'ADNe 13

1.4.3.2 La purification de l'ADNe 15

1.4.4 Le clonage de l'ADNe 16

1.4.4.1 La fragmentation de l'ADN 16

1.4.4.2 L'insertion des fragments d'ADN dans un vecteur adéquat 16

1.4.4.3 La transformation d'organismes cultivables 17

1.4.5 L'analyse et le criblage des banques métagénomiques 17

1.4.6 Le criblage d'activité (phénotype) 18

1.4.7 Le criblage de séquence 23

1.4.8 Le séquençage en masse 24

1.5 Affiliation phylogénétique des inserts 25

1.5.1 Exploitation des séquences nucléotidiques 26

1.5.2 Exploitation des séquences peptidiques 27

1.5.3 Exploitation de critères génomiques 27

1.6 Les autres « méta-approches » 28

Chapitre 2 Objectifs 31

Chapitre 3 Construction des banques métagénomiques RB1 et PP1 35

3. Construction des banques métagénomiques RB1 et PP1 37

3.1 La banque RB1 37

3.1.1 Echantillonnage et préparation de l'ADNe 37

3.1.2 Digestion et clonage de l'ADNe	38
3.1.3 Analyse de la banque et criblage	40
3.2 La banque PP1	41
3.2.1 Echantillonnage et préparation d l'ADNe	41
3.2.2 Digestion et clonage de l'ADNe	41
3.2.3 Analyse de la banque et criblage	42
3.2.4 Sélection de RBcell	44
Chapitre 4 Les lipases et les carboxylestérases	47
4 Les lipases et les carboxylestérases	49
4.1 Structure	50
4.2 Synthèse et hydrolyse de liaisons esters	52
4.3 Les OST enzymes	54
4.3.1 Les protéines dans les solvants organiques	54
Chapitre 5 L'estérase RBest1	57
Introduction du chapitre 5	58
5 Searching for Organic Solvent Tolerant Lipase/esterase by metagenomics	59
5.1 Abstract	59
5.2 Introduction	60
5.3 Materials and methods	62
5.3.1 DNA extraction and metagenomic library construction	62
5.3.2 Lipolytic activity screening	62
5.3.3 DNA sequencing and sequence analysis	63
5.3.4 Enzyme assays and organic solvent tolerance tests	63
5.4 Results	65
5.4.1 Screening for esterase /lipase activity from a metagenomic library	65
5.4.2 Sequence analysis	65
5.4.3 RBest1 production and substrate specificity	68
5.4.4 Organic solvent tolerance	69
5.5 Discussion	72
Chapitre 6 La cellulose et les cellulases	75
6 Cellulose et cellulase	77
6.1 La cellulose	77
6.2 Les cellulases	79
6.3 Les glycosides hydrolases	81

6.4 La synthèse de la cellulose	82
Chapitre 7 La cellulase RBcell	87
<hr/>	
Introduction du chapitre 7	88
7. Insights into the bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples	89
7.1 Abstract	89
7.2 Introduction	90
7.3 Materials and methods	92
7.3.1 Soil sample	92
7.3.2 Metagenomic library construction	92
7.3.3 Metagenomic library characterization and screening for hydrolytic activities	92
7.3.4 Subcloning and DNA sequencing	93
7.3.5 Expresson and purification of RBcell	93
7.3.6 Enzyme assay	94
7.3.7 Differential Scanning calorimetry	95
7.3.8 Thin layer chromatography	95
7.3.9 Viscomeric assay	96
7.3.10 Gel permeation chromatography (GPC) of polymerized samples	96
7.3.11 Scanning ectron microscopy (SEM)	96
7.4 Results	97
7.4.1 Metagenomic library characterization and screening	97
7.4.2 Sequence analysis	97
7.4.3 RBcell prouction and purification	102
7.4.4 pH and temperatue dependence of the cellulolytic activity	102
7.4.5 Stability on chamilical compounds	104
7.4.6 RBcell kinetic parameters and substrate specificity	104
7.4.7 Viscometric Assay	106
7.4.8 Analysisof polymerization product by gel permeation chromatography and scanning electron microscopy	107
7.4.9 Discussion	109
Chapitre 8 Conlusion et perspectives	113
<hr/>	
Bibliographie	
Annexe 1 : Uncultured bacterium organic solvent tolerent esterase gene, complete CDS	
Annexe 2 : Genomic DNA fragment from uncultured bacterium from Antarctica	

Functional metagenomic approach was performed using total environmental DNA extracted from a temperate forest soil sample and from an Antarctica soil sample. Searching for clones harbouring phenotypes related to the production of new hydrolytic enzyme allows the isolation of several new enzymes.

Amongst them, an esterase and a cellulase, named RBest1 and RBcel1 respectively, were characterized. By accurate description of their catalytic proprieties these two new enzymes appear to present interesting features.

The RBest1 esterase is an enzyme whose activity is stabilised or improved in presence of non water-miscible organic solvent. By sequence analysis, RBest1 is related to other organic solvent tolerant enzyme. Moreover, in aqueous buffer, RBest1 is highly specific for butyrate compound but surprisingly its specificity appears to be shifted in presence of organic solvent.

The RBcel1 cellulase, was thoroughly characterized for its involvement both in cellulose degradation and production. Our data highlight the requirement for such enzyme in the bacterial cellulose synthesis process.

According to our results, the mining of metagenomic libraries by functional screening associated to detailed description of the isolated enzymes gives hints for both ecological and microbiological questions.

