

PURIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UNE SUBÉRINASE
POTENTIELLE (SUB1) SÉCRÉTÉE PAR
STREPTOMYCES SCABIES EF-35

par

Raoudha Jablouné

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2018

Le 16 mai 2018

*Le jury a accepté le mémoire de Madame Raoudha Jablouné
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Carole Beaulieu

Directrice de recherche

Département de biologie

Professeur Ryszard Brzezinski

Codirecteur de recherche

Département de biologie

M. Benoît Leblanc

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur François Malouin

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

La gale commune est une maladie bactérienne qui affecte les tubercules de pomme de terre. Cette maladie se manifeste sous forme de lésions superficielles, plus ou moins subérisées, sur les tubercules. Les agents pathogènes responsables de la gale commune sont des bactéries appartenant au genre de *Streptomyces* dont l'espèce dominante demeure *Streptomyces scabies*. *S. scabies* est une bactérie filamenteuse, Gram positive, saprophyte du sol ayant la capacité de sécréter plusieurs enzymes hydrolytiques extracellulaires. Notre groupe de recherche a émis l'hypothèse que certaines de ces enzymes pouvaient dégrader la couche protectrice du tubercule de pomme de terre, composée essentiellement de subérine, afin de pénétrer à l'intérieur de la plante hôte et de causer l'infection. Notre groupe a également mis en évidence le gène *sub1* codant pour une estérase homologue à des cutinases dont l'expression est induite spécifiquement par la subérine. Il pourrait donc s'agir de la première description d'un gène bactérien codant pour une cutinase/subérinase.

L'objectif général de ce projet est de purifier et caractériser la protéine codée par le gène *sub1*. Pour ce faire, une surexpression hétérologue du gène *sub1* a été faite dans une souche de *E. coli*. Ensuite, la protéine codée par ce gène a été purifiée. Nos résultats ont révélé que le poids moléculaire estimé à partir du gel SDS-PAGE de la protéine Sub1 recombinante sécrétée par *E. coli*-pET était au voisinage de 25 KDa. Finalement, l'activité de l'enzyme Sub1 sur divers substrats dont un polymère synthétique (PET) et des biopolymères comme la subérine et la cutine a été testé. L'enzyme Sub1 montrait plus de spécificité pour les acides gras à courtes chaînes carbonnées que pour ceux à longues chaînes aliphatiques. L'ajout du Triton X-100 améliorait l'efficacité de l'enzyme Sub1. L'étude de la cinétique de l'enzyme Sub1 a montré une courbe typique de Michaelis-Menten avec une V_{max} de $2361 \pm$

84,5 U/mg de protéine et une constante k_m de $570 \pm 0.04 \mu\text{M}$ du substrat *p*-nitrophényle butyrate. Notre étude démontre que Sub1 est bel et bien une cutinase/subérinase puisque des acides gras sont libérés de ces substrats en présence de l'enzyme. Sub1 hydrolysait aussi le polyester synthétique PET et pourrait donc être intéressante dans des applications biotechnologiques.

Mots clés: *Streptomyces scabies*, gale commune, subérine, cutine, polyéthylène téréphtalate, cutinases, subérinases.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à ma Directrice la Pr Carole Beaulieu pour m'avoir si bien accueillie au sein de son laboratoire de recherche, pour sa patience, ses précieux conseils, ainsi que pour son encadrement et son support financier tout au long de mes travaux de recherche.

J'adresse aussi mes remerciements et ma reconnaissance à mon codirecteur le Pr Ryszard Brzezinski et mes conseillers le Pr François Malouin et M. Benoît Leblanc pour avoir accepté de m'encadrer tout au long de ma maîtrise et pour leurs précieux conseils.

J'adresse toute ma gratitude à l'ancienne adjointe de recherche Mme Anne-Marie Simao-Beaunoir et à l'assistant de recherche M. Sylvain Lerat pour leur disponibilité, leurs conseils pertinents et pour le temps qu'ils m'ont consacré durant ma recherche.

Je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire pour leur collaboration, leur disponibilité et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant ce travail.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille et à mes amis pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 La gale commune de la pomme de terre	1
1.2 L'agent phytophagène <i>S. scabies</i>	2
1.2.1 Les caractéristiques du genre <i>Streptomyces</i>	2
1.2.2 <i>Streptomyces scabies</i>	3
1.2.3 Le cycle de la gale commune, maladie causée par l'agent pathogène <i>S. scabies</i> ..	4
1.2.4 Les métabolites secondaires	7
1.3 Les estérases	13
1.3.1 Définition.....	13

1.3.2	Comparaison entre les estérases et les lipases	14
1.3.3	Les cutinases.....	16
1.3.4	Les subérinases	19
1.4	La subérine.....	19
1.4.1	La structure de la subérine.....	20
1.4.2	La composition chimique de la subérine	21
1.5	La dégradation de la subérine et de la cutine.....	26
1.6	Le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> EF-35.....	27
1.6.1	Analyse de la séquence protéique de l'enzyme Sub1	27
1.6.2	Structure tridimensionnelle de Sub1 et sa ressemblance avec celles d'autres cutinases	30
1.7	Les objectifs du mémoire	32
CHAPITRE 2.....		34
MATÉRIEL ET MÉTHODES		34
2.1	Enrichissement en subérine du périoderme de pomme de terre	34
2.2	Préparation de la cutine.....	36
2.3	Les souches bactériennes et plasmides	36
2.3.1	Les bactéries	36

2.3.2	Les plasmides	38
2.4	Milieux et conditions de culture	40
2.5	Isolement d'ADN génomique et d'ADN plasmidique	42
2.6	Amplification du gène <i>sub1</i>	42
2.7	Clonage du gène <i>sub1</i> dans les vecteurs pFDES-D1-7 et pET -30a (+).....	44
2.8	Transformation de souches de <i>S. lividans</i>	44
2.8.1	Préparation des protoplastes	44
2.8.2	Transformation des protoplastes de <i>S. lividans</i>	45
2.9	Transformation dans <i>E. coli</i>	46
2.10	Obtention des extraits cytoplasmiques et extracellulaires	47
2.11	Purification de la protéine Sub1.....	48
2.12	Visualisation et quantification des protéines	49
2.13	Dosage de l'activité estérasique.....	50
2.14	V_{max} et K_m de la protéine Sub1 pour le substrat <i>p</i> -nitrophényl butyrate (PNB).....	51
2.15	L'action de la protéine Sub1 sur le polyéthylène téréphtalate (PET)	51
2.16	Action de l'estérase Sub1 sur la subérine contenue dans le périoderme de pomme de terre (PS ou PSS) et sur la cutine	52
CHAPITRE 3	53

RÉSULTATS	53
3.1 Clonage du gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> EF-35 dans pFDES-D1-7 et transformation des plasmides recombinants dans <i>S. lividans</i>	53
3.2 Clonage du gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> EF-35 dans le vecteur pET-30a (+) et transformation des plasmides recombinants dans <i>E. coli</i> Shuffle T7	55
3.3 Dosage de l'activité estérasique du surnageant et de l'extrait cytoplasmique des transformants de <i>S. lividans</i>	56
3.4 Dosage de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique des transformants d' <i>E. coli</i> Shuffle-T7	59
3.5 Purification de la protéine recombinante His6-Sub1	61
3.6 Action de la protéine Sub1 sur des dérivés <i>p</i> -nitrophényl d'esters d'acides gras	62
3.7 Détermination du V_{max} et k_m de l'estérase Sub1 pour le substrat <i>p</i> -nitrophényl-butyrates	65
3.8 Action de la protéine Sub1 sur le polyéthylène téréphtalate (PET)	66
3.9 Action de l'estérase Sub1 sur la subérine contenue dans le périoderme de pomme de terre (PS ou PSS) et sur la cutine	69
CHAPITRE 4.....	71
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MW: poids moléculaire

μmol: micromole

μL: microlitre

°C: degré Celsius

ADN: acide désoxyribonucléique

KDa: Kilo Dalton

MM: Milieu minimal

mM: millimolaire

PCR: réaction en chaîne par polymérisation

PNB: *p*-nitrophenyl butyrate

PNP: *para*-nitrophenol

RNA: acide ribonucléique

rpm: rotation par minute

SDS-PAGE: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium

SDS: Sodium dodecyl sulfate

RT-PCR: Réaction de polymérase en chaîne par transcription inverse

TSB: Bouillon de soja tryptique

U: Unité

w/w: masse par masse

v/v: volume par volume

w/v: masse par volume

HPLC: chromatographie en phase liquide à haute performance

TEM: Microscope électronique à transmission

Test LSD: test de différence significative minimale

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des bactéries utilisées dans ce travail et leurs principales caractéristiques	37
Tableau 2. Liste des plasmides utilisés et produits dans cette étude	39
Tableau 3. Les séquences des amorces utilisées pour les amplifications.....	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre montrant la structure du périoderme et d'une lenticelle (adaptée de Tyner <i>et al.</i> , 1997).....	6
Figure 2.	Cycle de la gale commune de la pomme de terre causée par l'agent pathogène <i>S. scabies</i> (adapté d'Agrios, 2005).....	7
Figure 3.	Structures de thaxtomines produites par des espèces phytopathogènes de <i>Streptomyces</i> (King et Calhoun, 2009).....	9
Figure 4.	La composition générale de l'îlot de pathogénicité (région toxicogénique) chez <i>S. turgidiscabies</i> et <i>S. scabies</i> 87.22 (Joshi <i>et al.</i> , 2007).....	10
Figure 5.	Mécanisme d'action de la subérine et de la cellulose sur la production de la thaxtomine chez <i>S. scabies</i> (Padilla-Reynaud <i>et al.</i> , 2015).....	12
Figure 6.	Réaction catalysée par une estérase.....	13
Figure 7.	Schéma de la structure (3D) des α/β hydrolases (Bornscheuer, 2002).....	15
Figure 8.	Modèle structural de la subérine de la pomme de terre (Bernards, 2002).....	23

Figure 9. Ultrastructure des parois cellulaires subérifiées du périderme de la pomme de terre, vues par MET (Graça, 2015)	24
Figure 10. Les principaux monomères de la partie aliphatique de la subérine (Graça, 2015)	25
Figure 11. Arbre phylogénétique de la protéine Sub1 et ces homologues.....	29
Figure 12. Structure tridimensionnelle de Sub1	31
Figure 13. Coupe du périderme de pomme de terre enrichi en subérine (PS) et de ce substrat incubé en présence de l'agent phytopathogène <i>S. scabies</i> EF-35 pendant 60 jours (PSS) observés en microscopie à transmission (Laboratoire de Carole Beaulieu)	35
Figure 14. La région d'expression y compris le site de clonage multiple du plasmide pET-30a (+) (Novagen)	40
Figure 15. Séparation sur gel SDS-PAGE des protéines extracellulaires et de l'extrait cytoplasmique de souches de <i>S. lividans</i> transformées avec un vecteur portant ou non le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i>	54
Figure 16. SDS-PAGE de l'extrait cytoplasmique d' <i>E. coli</i> Shuffle-T7 transformé avec le vecteur pET portant ou non le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> , obtenu après une induction avec différentes concentrations d'IPTG	56

Figure 17. Mesure de l'activité estérasique du surnageant de deux souches de <i>S. lividans</i> transformées avec des plasmides portant ou non le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i>	57
Figure 18. Mesure de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique de deux souches de <i>S. lividans</i> transformées avec des plasmides portant ou non le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i>	58
Figure 19. Mesure de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique d'une souches de <i>E. coli</i> Shuffle T7 transformées avec des plasmides portant ou non le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i>	60
Figure 20. SDS–PAGE des protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> Shuffle pET <i>sub1</i> après fractionnement sur la colonne d'affinité (IMAC).....	62
Figure 21. Effet de la longueur de la chaîne carbonnée du substrat et de la présence d'un surfactant sur l'activité estérasique de l'enzyme Sub1	64
Figure 22. Effet de la concentration du substrat (PNB) sur la vitesse initiale (V_i) de la réaction d'hydrolyse par l'estérase Sub1	65
Figure 23. Mesure de la quantité d'acide téréphtalique (TA) libéré par hydrolyse du polyéthylène téréphtalate (PET) sous l'action de l'enzyme Sub1	67

Figure 24. Mesure de la concentration de l'acide téréphtalique (TA) libéré par hydrolyse du polyéthylène téréphtalate (granules broyées) sous l'action de l'enzyme Sub1	68
Figure 25. Dosage colorimétrique des acides gras libérés à partir des biopolymères exposés à l'estérase Sub1 pendant 20 jours d'incubation à température de la pièce.....	70

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 La gale commune de la pomme de terre

La gale commune est une maladie bactérienne des plantes. Le principal hôte de cette maladie est la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) qui constitue la quatrième culture vivrière en importance dans le monde après le maïs, le blé et le riz. Toutefois, cette maladie peut affecter d'autres cultures telles que le radis, le panais, la betterave et la carotte (Lehtonen *et al.*, 2004). Les agents pathogènes responsables de la gale commune sont des bactéries appartenant au genre de *Streptomyces* comme *S. scabies*, *S. europaeiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. bottropensis*. *S. scabies* demeure le plus virulent agent causal de cette maladie sur la pomme de terre (Wanner, 2007).

La gale commune est une maladie cosmopolite qui affecte les tubercules de pomme de terre partout où elles sont cultivées (Wanner, 2009). Elle se caractérise par des lésions de liège plus ou moins profondes sur les tubercules de pomme de terre. La taille et la couleur de ces lésions sont assez variables (Lerat *et al.*, 2009). Malgré que la maladie n'affecte pas le rendement des cultures et ne présente aucun danger pour la consommation humaine, ces lésions dévalorisent la qualité marchande des tubercules infectés causant des pertes économiques importantes. Par exemple, au Canada, la perte économique totale due à la gale commune de pomme de terre était estimée entre 15,3 et 17,3 millions de dollars canadiens pour l'année 2002 et c'est le Québec qui a été la province la plus affectée par cette maladie (Lazarovits *et al.* 2007).

1.2 L'agent phytophagène *S. scabies*

1.2.1 Les caractéristiques du genre *Streptomyces*

Les bactéries du genre *Streptomyces* appartiennent à l'ordre des *Actinomycétales* qui est une division de la classe des actinobactéries. Ce sont des bactéries filamenteuses, à Gram positif qui se caractérisent par un génome très riche en G-C. Les streptomycètes sont des bactéries strictement aérobies, saprophytes, ubiquitaires et abondantes dans le sol (Wanner, 2009). Elles sont des décomposeurs importants de la matière organique grâce à leur capacité de produire de nombreuses enzymes extracellulaires (Loria *et al.*, 2003). Les actinobactéries et particulièrement les streptomycètes sont aussi prolifiques pour la production de métabolites secondaires. Les actinobactéries vivant dans le sol sont de très importants producteurs d'antibiotiques. En effet, en 2002 le nombre d'antibiotiques découverts à partir d'actinobactéries était estimé à 8700. À titre de comparaison, les bactéries appartenant à d'autres taxons produisent 2900 antibiotiques connus alors que les champignons en produisent 4900 (Bérdy, 2005). Il y a plus de 400 espèces de *Streptomyces* répertoriées, mais peu sont phytopathogènes (Wanner, 2007). La maladie végétale la plus importante du point de vue économique est la gale commune (Hill et Lazarovits, 2005).

Dans le sol ou sur un milieu solide, le cycle de vie d'une colonie de *Streptomyces* commence par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire ramifié, formé d'hyphes non septés et plurinucléés. Ce mycélium se développe et se prolonge dans le milieu. Cette phase de croissance est dite végétative. Par la suite, le mycélium végétatif s'arrête de croître et forme des hyphes aériens non ramifiés. Les extrémités de ces hyphes se cloisonnent

et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées. Cette deuxième phase de croissance est nommée reproductive ou aérienne (Agrios, 2005). Les *Streptomyces* vivent dans le sol sous forme végétative ou sous forme de spores qui constituent la forme de résistance de la bactérie (Stackebrandt *et al.* 1997). Les spores de *S. scabies* sont très résistantes et peuvent survivre dans le sol durant une longue période (plus de 10 ans) même en absence de leur hôte (Ensign, 1978).

1.2.2 *Streptomyces scabies*

Plusieurs espèces de *Streptomyces* sont connues par leur capacité de causer la gale commune de la pomme de terre, mais *S. scabies* reste le premier agent causal de cette maladie et le plus répandu en Amérique (Lambert et Loria, 1989b). Outre *S. scabies*, les espèces phytopathogènes *S. acidiscabies* (Lambert et Loria, 1989a), *S. turgidiscabies* (Miyajima *et al.*, 1998) et *S. europaeiscabiei* (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000) ont aussi été bien caractérisées.

Le premier organisme causant la gale commune a été isolé en 1890 par Thaxter (1914) qui l'a nommé *Oosporascabies*. Cette espèce se caractérisait par sa production de mélanine et ses chaînes de spores grises disposées dans des hyphes spiralées. Par la suite, cette espèce a été renommée *Actinomyces scabies* par Güssow (1914) puis *Streptomyces scabies* par Waksman et Henrici en 1948 (Lambert et Loria, 1989 b).

La souche néotype de *S. scabies* est RL-34 (ATCC49173). Cette souche a été isolée en 1984 puis caractérisée par (Lambert et Loria, 1989b). La souche néotype de *S. scabies* se caractérise

par la coloration grise du mycélium et des chaînes de spores. Les spores sont grises, lisses, cylindriques et de taille entre 0,5 et 1 µm. Les spores se disposent sous forme de chaînes spiralées. Toutes les souches de *S. scabies* produisent de la mélanine dans un milieu agar avec tyrosine (Lambert et Loria, 1989b).

Les souches de *S. scabies* dégradent généralement le xylane et la pectine (Lambert et Loria, 1989b) de même que la cellulose (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015) qui sont des composants de la paroi des cellules végétales.

1.2.3 Le cycle de la gale commune, maladie causée par l'agent pathogène *S. scabies*

La dissémination de l'agent pathogène (spores ou fragments de mycélium) se fait par le vent, le ruissellement de l'eau, ainsi que par les activités agricoles. Dans les sols infectés, *S. scabies* peut survivre sous forme végétative à partir de la dégradation des matières organiques du sol grâce à de nombreuses enzymes hydrolytiques extracellulaires, ou sous forme de spores qui constituent la forme de résistance de la bactérie (Stackebrandt *et al.* 1997). Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, les spores qui se trouvent en contact avec les tubercules de la pomme de terre germent et l'infection se fait à travers les ouvertures naturelles comme les lenticelles, les blessures ou bien par pénétration directe des cellules du périoderme pour les jeunes tubercules (Loria *et al.*, 2003). Le périoderme de pomme de terre est constitué de trois tissus: le phellème (suber ou liège), le phellogène et le phelloderme (Tyner *et al.*, 1997). Le phellogène est la zone génératrice du phellème vers l'extérieur, et du phelloderme vers l'intérieur (Lulai et Freeman, 2001). Au fur et à mesure que les cellules du phellème se développent, elles se subérisent et meurent, formant ainsi une couche protectrice riche en subérine, appelée suber ou liège (Sabba et Lulai, 2002). La figure 1 illustre la

structure du périoderme de pomme de terre. La structure chimique de la subérine est décrite en détail à la section 1.4. Après l'infection, l'agent pathogène colonise les cellules des couches superficielles du tubercule et cause leur mort. Pour se protéger de l'invasion de l'agent pathogène, la plante produit de la subérine au niveau des cellules sous-jacentes à l'infection et forme ainsi une couche épaisse de liège autour du foyer de l'infection. La couche de liège pousse la zone infectée vers l'extérieur, ce qui peut causer des fissures au niveau du périoderme. Plus l'agent pathogène se développe, plus de couches de liège se superposent au niveau de l'infection, ce qui donne les lésions caractéristiques de la gale commune sur les tubercules de pomme de terre (Agrios, 2005). La figure 2 résume le cycle de la maladie.

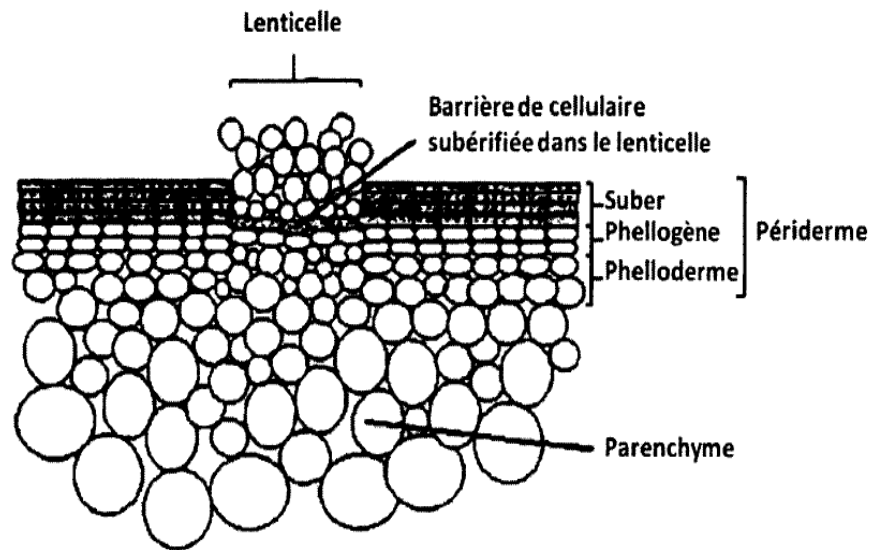


Figure 1. Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre montrant la structure du périoderme et d'une lenticelle (adaptée de Tyner *et al.*, 1997).

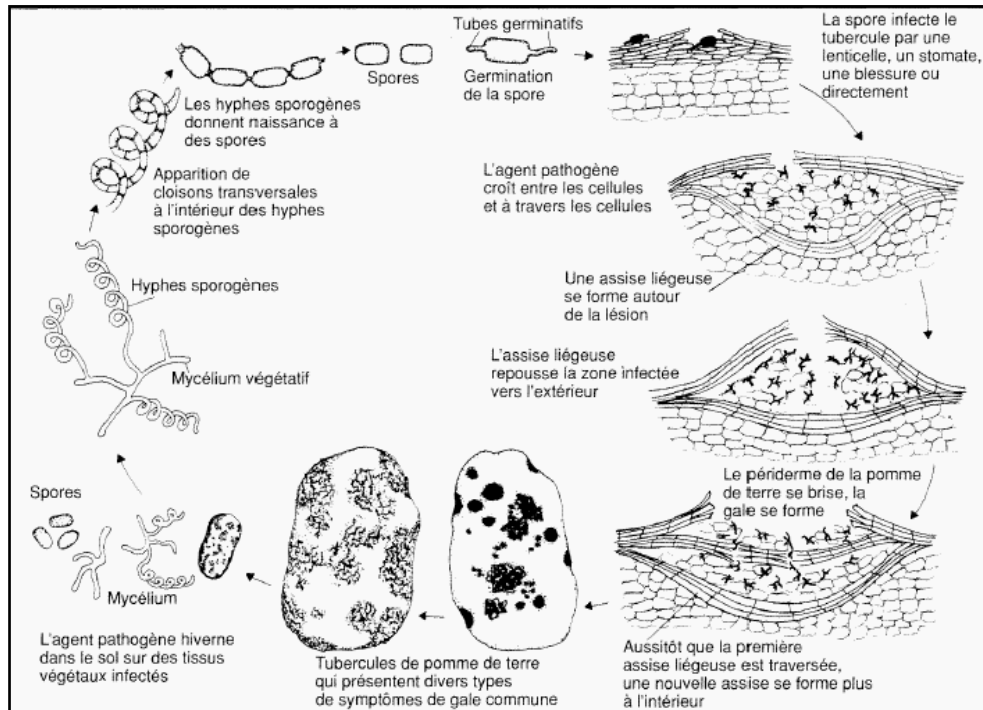


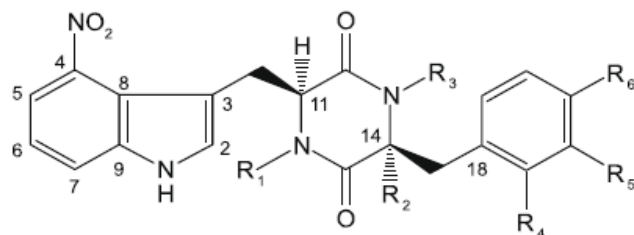
Figure 2. Cycle de la gale commune de la pomme de terre causée par l'agent pathogène *S. scabies* (adapté d'Agrios, 2005).

1.2.4 Les métabolites secondaires

Comme l'ensemble des streptomycètes, les *Streptomyces* phytopathogènes sont productrices de métabolites secondaires. Dans le cas des agents causant la gale commune, la capacité de sécréter des toxines contre les cellules végétales et surtout la thaxtomine A est bien documentée (King et Calhoun, 2009; King *et al.*, 1989; Loria *et al.*, 1997).

1.2.4.1 Les toxines tuant les cellules végétales

La possibilité de l'implication des toxines dans la maladie de la gale commune de la pomme de terre a été proposée par (Fellows, 1926). Ce n'est toutefois qu'en 1989, que deux toxines directement associées à la gale commune de pomme de terre ont été isolées et caractérisées pour la première fois à partir de lésions de gale sur des tubercules de pomme de terre infectés par *S. scabies* (King *et al.*, 1989). Ces toxines ont été nommées thaxtomine A et thaxtomine B. De plus, d'autres dérivés ont été isolés (Hiltunen *et al.*, 2006; King et Calhoun, 2009; Loria *et al.*, 1997) mais la thaxtomine A est la principale toxine produite par *S. scabies* (Hiltunen *et al.*, 2006; King *et al.*, 1989; Loria *et al.*, 1997). La thaxtomine A est le dérivé le plus toxique auprès de la pomme de terre (Hiltunen *et al.*, 2006). Les thaxtomines sont des dipeptides cycliques (2,5-dicétopipérazines) dérivés de la L-phénylalanine et du L-tryptophane et contiennent un fragment 4-nitroindole qui est essentiel à la phytotoxicité de ces composés (King et Calhoun, 2009). Les thaxtomines diffèrent par la présence ou l'absence de groupes N-méthyle et hydroxyle et leurs sites de substitution respectifs. La figure 3 illustre la structure générale des thaxtomines produites par des espèces phytopathogènes de *Streptomyces* et montre les différentes substitutions des groupes N-méthyle et hydroxyle de ces toxines.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	Me	OH	Me	H	OH	H
2	Me	OH	Me	OH	H	H
3	Me	H	H	H	H	H
4	Me	OH	Me	H	H	H
5	Me	H	Me	H	H	H
6	Me	OH	H	H	H	H
7	Me	OH	Me	H	H	OH
8	Me	OH	Me	H	OH	OH
9	Me	OH	H	H	OH	H
10	H	OH	Me	H	OH	H
11	H	H	H	H	H	H

Figure 3. Structures de thaxtomines produites par des espèces phytopathogènes de *Streptomyces*. Le composé 1 représente la thaxtomine A et le composé 4 correspond à la thaxtomine B (King et Calhoun, 2009).

Les thaxtomines sont capables d'engendrer des lésions sur des tubercules de pomme de terre immatures ressemblant à celles associées à la gale commune (Kers *et al.*, 2005; King *et al.*, 1989). Goyer *et al.* (1998) ont mis en évidence l'implication de la thaxtomine A dans le pouvoir pathogène de la souche *S. scabies* EF-35. Elles ont démontré que la capacité de la souche à produire cette toxine déterminait son degré de virulence. Par ailleurs, la rupture des gènes de biosynthèse de la thaxtomine se traduit par une perte de pouvoir pathogène, démontrant l'importance de ces toxines dans le cycle de la maladie (King *et al.* 1991). Les gènes impliqués dans la pathogénicité se trouvent généralement regroupés au sein d'un îlot de pathogénicité (PAI) dans le chromosome bactérien (Chapleau *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2007; Kers *et al.*, 2005). Contrairement à *S. turgidiscabies*, dont les gènes impliqués au pouvoir

pathogène se trouvent regroupés tous ensemble sur un îlot de pathogénicité (PAI), *S. scabies*, a les gènes de pouvoir pathogène regroupés en deux régions : la région toxicogène (TR) qui comprend tous les gènes impliqués dans la synthèse de la thaxtominine comme *txtA*, *txtB*, *txtC*, *txtR* et *nos* et la région de colonisation qui comprend les gènes *necl* et *tomA* qui ne sont pas essentiels à la pathogénicité, mais qui jouent un rôle important dans la virulence. (Chapleau *et al.*, 2016; Lerat *et al.*, 2009). La figure 4 montre la composition générale de l'îlot de pathogénicité chez *S. turgidiscabies* et *S. scabies* 87.22 (Joshi *et al.*, 2007). La région toxicogène a été étudiée plus en détail avec Chapleau *et al.* (2016).

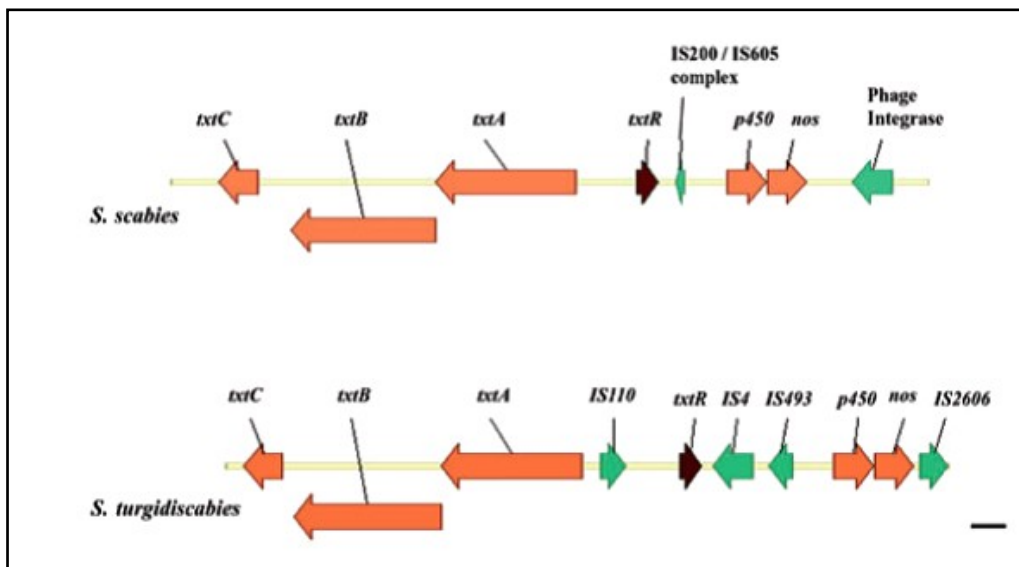


Figure 4. La composition générale de l'îlot de pathogénicité (région toxicogénique) chez *S. turgidiscabies* et *S. scabies* 87.22. Les gènes biosynthétiques de la thaxtominine A sont colorés en orange; certains éléments impliqués dans la mobilité sont en verts. Le gène *txtR*, qui code pour un régulateur transrationnel est en rouge (Joshi *et al.*, 2007).

Par un mécanisme de transfert horizontal interspécifique, l'îlot peut se transmettre à des espèces non pathogènes (Chapleau *et al.*, 2016; Kers *et al.*, 2005) ce qui pourrait expliquer l'apparition des nouvelles espèces de *Streptomyces* pathogènes qui ont été caractérisées au cours des deux dernières décennies (Loria et Kers, 2006).

La production de la thaxtomine par *S. scabies* est induite par l'ajout de subérine dans un milieu de culture (Beauséjour *et al.*, 1999; Lerat *et al.*, 2012; Lerat *et al.*, 2010). Le mécanisme cellulaire responsable de cette induction reste toutefois à clarifier. Autre que la subérine, le cellobiose (disaccharide végétal résultant de l'hydrolyse de la cellulose) agit aussi sur la production de la thaxtomine (Lerat *et al.*, 2010; Padilla-Reynaud *et al.*, 2015). La présence de ces deux sources de carbone (cellobiose et subérine) dans le milieu de culture de *S. scabies* induit cependant beaucoup mieux la production de cette toxine que chacun des composés isolés (Lerat *et al.*, 2010; Padilla-Reynaud *et al.*, 2015). Padilla-Reynaud *et al.* (2015), ont proposé un modèle pouvant expliquer l'effet de la subérine et du cellobiose sur la production de la thaxtomine chez *S. scabies*. En effet, le cellobiose seul, résultant de l'hydrolyse de la cellulose par des cellulases, va induire l'expression des gènes biosynthétiques de la thaxtomine en liant TxtR, l'activateur de transcription des gènes de biosynthèse de la thaxtomine. En même temps, le cellobiose ou la cellulose bloquerait la culture de *S. scabies* dans le métabolisme primaire, éventuellement par induction de la production d'un inhibiteur de protéase de type subtilase, en provoquant comme conséquence, une diminution de la production de métabolites secondaires tels que les thaxtomines. La subérine seule va induire la différenciation cellulaire et le métabolisme secondaire comme il a été démontré par Lerat *et al.* (2012) et ainsi la production de métabolites secondaires y compris la thaxtomine. En présence de la subérine et de la cellulose, les gènes biosynthétiques de thaxtomine vont être fortement exprimés. En effet, une forte production de cellulases, résultant d'une double induction des gènes biosynthétiques des cellulases par la subérine et la cellulose, va mener à une grande production de cellobiose. Cette grande quantité de cellobiose

va provoquer une forte induction des gènes de biosynthèse de la thaxtomine. En même temps, la subérine va déclencher la différenciation et la production de métabolites secondaires comme la thaxtomine, en surmontant ainsi les actions inhibitrices de la différenciation causées par la cellulose et le cellobiose. La figure 5 explique le mécanisme d'action de la subérine et de la cellulose sur la production de la thaxtomine (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015).

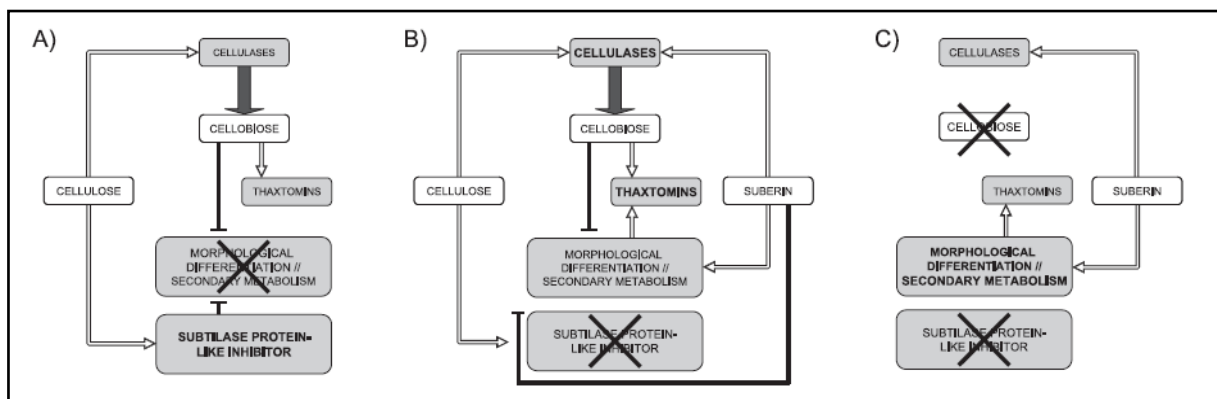


Figure 5. Mécanisme d'action de la subérine et de la cellulose sur la production de la thaxtomine chez *S. scabies* (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015).

1.2.4.2 Les enzymes hydrolytiques

L'agent pathogène *S. scabies* est doté de plusieurs enzymes hydrolytiques extracellulaires. Komeil *et al.* (2014) ont démontré que la présence de la subérine dans le milieu de croissance de *S. scabies* induisait la production d'une grande variété de glycosyl hydrolases, dont 81 protéines impliquées dans le métabolisme des glucides incluant 49 protéines identifiées comme des glycosyl hydrolases. Ces dernières pourraient être impliquées dans la dégradation des polysaccharides constituant la paroi cellulaire (cellulases, xylanases, pectinases, etc). Le

rôle de ces enzymes dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* n'a pas été démontré, mais Padilla-Reynaud *et al.* (2015) ont suggéré que les cellulases pourraient être importantes dans la pathogenèse en libérant du cellobiose nécessaire à l'induction des gènes de biosynthèse de la thaxtomine.

En plus de posséder la capacité à dégrader les polysaccharides de la paroi végétale, certaines études suggèrent que *S. scabies* possède une batterie enzymatique pour dégrader la subérine, reconnue pour être récalcitrante à la dégradation microbienne, (Komeil *et al.* 2013; McQueen et Schottel, 1987). La structure de la subérine est décrite plus en détail dans la section 1.4.

1.3 Les estérases :

1.3.1 Définition

Les estérases représentent un groupe diversifié d'hydrolases qui catalysent le clivage ainsi que l'établissement des liaisons esters. La figure 6 représente la réaction catalysée par une estérase.

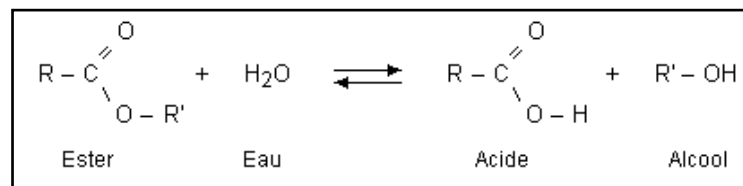


Figure 6. Réaction chimique catalysée par une estérase.

Chaque estérase est spécifique à la fraction alcool ou à la fraction acide du substrat, mais pas aux deux fractions (Fojan *et al.*, 2000). Une classification des estérases a été proposée par Whitaker (1972). Cette classification est basée sur la spécificité de l'enzyme pour la partie acide du substrat, comme les esters carboxyliques hydrolyses, les acétyles estérases, les cholines estérases et les cholestérols estérases (Fojan *et al.*, 2000; Whitaker, 1972). Autres que les estérases, les lipases peuvent aussi hydrolyser les liaisons ester.

1.3.2 Comparaison entre les estérases et les lipases

Les estérases et les lipases se trouvent dans tous les règnes des organismes vivants. Elles ont été identifiées dans un large éventail d'organismes et plusieurs d'entre elles ont été purifiées et caractérisées (Fojan *et al.*, 2000). Les estérases et les lipases sont de la famille des esters hydrolases. Quoique les lipases présentent une activité élevée à l'égard de l'état agrégé de leurs substrats, les estérases sont plus actives avec les substrats solubles dans l'eau (Fojan *et al.*, 2000). Les acides gras à longue chaîne sont généralement peu solubles et forment une émulsion dans l'eau, alors que les acides gras à courte chaîne sont solubles dans l'eau. Les estérases sont donc généralement plus actives pour les esters à courtes chaînes carboxyliques, tandis que les lipases sont capables d'hydrolyser des acides gras à longue chaîne carboxylique (Verger, 1997).

Au niveau de la structure spatiale de ces protéines, toutes les lipases ainsi que la majorité des estérases sont des α/β hydrolases (Fojan *et al.*, 2000). La majorité des lipases et des estérases ont des structures tridimensionnelles caractéristiques de celles de la famille des α/β hydrolases (Ollis *et al.*, 1992). La triade catalytique est composée de Ser-Asp-His (Glu au lieu de Asp pour certaines lipases) au niveau du site actif avec une séquence consensus Gly-x-Ser-x-Gly (où x représente un résidu d'acide aminé arbitraire) qui se trouve habituellement autour du résidu serine (Wei *et al.*, 1995).

La figure 7 est une présentation schématique de la structure (3D) de la famille α/β hydrolase. Les feuillets β (1-8) sont représentés par des flèches bleues, les hélices α (A-F) sont représentées par des colonnes rouges. Les positions relatives des acides aminés de la triade catalytique sont indiquées par des disques oranges (Bornscheuer, 2002).

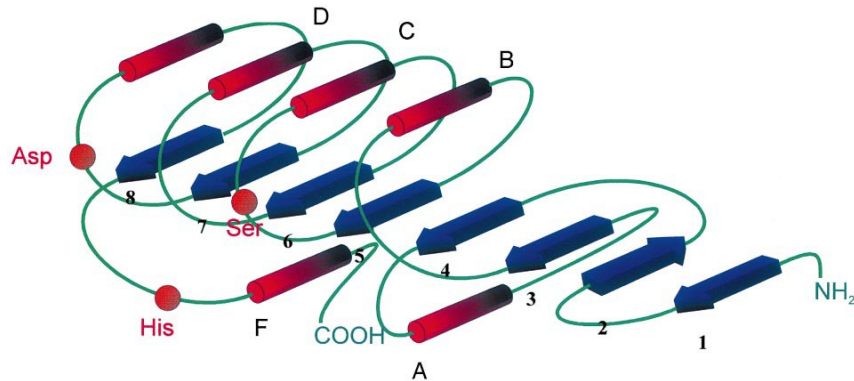


Figure 7. Schéma de la structure (3D) des α/β hydrolases (Bornscheuer, 2002).

La différence principale entre les lipases et les estérases se manifeste dans la structure des sites actifs de ces enzymes. En effet, les lipases montrent un domaine hydrophobe (couvercle) contrôlant l'accès au site actif. À l'interface lipide-eau, ce couvercle s'éloigne rendant le site actif accessible. Ce phénomène d'activation interfaciale, qui a été révélé seulement pour les lipases, n'existe pas chez les estérases qui ne possèdent pas de couvercles (Bornscheuer, 2002; Martinez *et al.*, 1994; Verger, 1997).

Le mécanisme d'hydrolyse d'un ester est essentiellement le même pour les lipases et les estérases. D'abord, le substrat est lié à la sérine active du site catalytique, donnant un intermédiaire tétraédrique stabilisé par les résidus catalytiques His et Asp. Ensuite, l'alcool est libéré et un complexe acyle-enzyme est formé. Par la suite, l'attaque d'un nucléophile (l'eau) forme une nouvelle intermédiaire tétraédrique, qui après résolution donne un acide et une enzyme libre (Bornscheuer et Kazlauskas, 2006).

Les estérases et les lipases diffèrent aussi au niveau de la cinétique enzymatique qui est influencée par la structure du site actif. En effet, les estérases obéissent à la cinétique classique de Michaelis-Menten, alors que les lipases ont besoin d'une concentration minimale de substrat pour l'activation interfaciale (Bornscheuer, 2002). Comme les lipases sont actives sur les substrats en état d'émulsion, leur activité est directement corrélée à la surface totale et non pas à la concentration du substrat. Au contraire, l'activité des estérases est en concordance avec la quantité de substrat soluble dans l'eau (Verger, 1997).

1.3.3 Les cutinases

Les cutinases sont des enzymes produites par différents microorganismes. Ce sont des sérine estérases qui appartiennent à la superfamille des α/β hydrolases. Elles possèdent une triade catalytique classique Ser-His-Asp avec une courte séquence consensus Gly-His/Tyr-Ser-Gln-Gly autour du résidu sérine active (Chen *et al.*, 2013; Kontkanen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 1992).

De point de vue fonctionnel, les cutinases peuvent catalyser des réactions d'hydrolyse, d'estérification, et de transestérification (Carvalho *et al.*, 1998). Les cutinases peuvent jouer un rôle important lors de l'interaction plante-agent pathogène, en contribuant à la fragilisation de la barrière cubulaire des plantes hôtes qui est une étape préliminaire au cours de l'infection (Dutta *et al.*, 2009). En effet, les cutinases hydrolysent la cuticule des plantes en clivant les liaisons esters des polymères de la cutine (Dutta *et al.*, 2009). En plus de l'activité cutinolytique des cutinases, leur capacité à dégrader la subérine a été prouvée chez certains champignons pathogènes, particulièrement *Coprinopsis cinerea* (Kontkanen *et al.*, 2009) qui produit la cutinase CcCUT1. La cutine et la subérine sont des polyesters dérivés des lipides (voir section 1.4), qui constituent les principaux composants structuraux des barrières extérieures des plantes (Kontkanen *et al.*, 2009).

Autre que *Coprinopsis cinerea*, les champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* pv. *pisi* et *Aspergillus oryzae* produisent les cutinases CutA, AAA33334.1 et BAA07428.1, respectivement (Liu *et al.* 2009; Martinez *et al.* 1992; van der Vlugt-Bergmans *et al.* 1997). On trouve aussi des cutinases bactériennes telles que les Tf-0883 et Tf-0882 de *Thermobifida fusca* (Chen *et al.* 2008; Su *et al.* 2013), la Thc-Cut1 de *Thermobifida cellulositica* (Ribitsch *et al.*, 2015) et la Tha-Cut1 de *Thermobifida alba* (Thumarat *et al.*, 2012).

En plus de leur implication dans les interactions microorganismes-plantes, les cutinases peuvent avoir des intérêts industriels. Par exemple, la cutinase de *Fusarium solani* pv. *pisi* a montré une capacité d'hydrolyser des polyesters synthétiques tels que la polycaprolactone (Murphy *et al.* 1996). La dégradation du polyester PET par d'autres cutinases a été aussi mise en évidence à plusieurs reprises (Eberl *et al.*, 2009; Ribitsch *et al.*, 2015; Vertommen *et al.*, 2005). Les cutinases ont été largement utilisées dans l'industrie laitière pour l'hydrolyse des matières grasses du lait (Dutta *et al.*, 2009). Elles ont été aussi utilisées pour la production de biodiesel à partir d'esters produits par transestérification d'huiles végétales ou de graisses animales (Dutta *et al.*, 2009). En effet, les cutinases ont été utilisées pour l'estérification de méthyle-esters et d'éthyle-esters d'acides gras à chaîne longue pour enrichir les carburants diesel (Ejikeme *et al.*, 2010; Ghaly *et al.*, 2010). En outre, ces enzymes présentent une importante alternative pour la fabrication des détergents vu leur stabilité dans la gamme de température de 20-50 °C, ce qui convient aux conditions de nettoyage. Elles sont aussi stables et actives à des pHs entre 8-11 où la plupart des produits de nettoyage sont utilisés. Les cutinases sont également stables en présence d'autres enzymes comme les protéases, elles sont donc idéales pour un mélange d'enzymes. Pour tous ces avantages, certaines cutinases ont été plus privilégiées que des lipases commerciales dans la fabrication de détergents domestiques pour la dégradation de la graisse et d'huile sur les tissus et la vaisselle (Dutta *et al.*, 2009).

De point de vue structural, toutes les cutinases contiennent au moins un pont disulfure, qui assure la stabilisation de leur structure. Toutefois, la thermostabilité ne dépend pas du nombre

de ponts disulfures. Par exemple, la cutinase Tha_cut1 de *Thermobifida alba* contient une seule liaison disulfure et elle est beaucoup plus thermostable que la cutinase AAA33334.1 de *Fusarium. solani pisi* (Martinez *et al.*, 1992) ou celle d'*Aspergillus oryzae* (BAA07428.1) (Liu *et al.*, 2009), qui ont deux ou trois ponts disulfures, respectivement. La thermostabilité de la cutinase Tha_cut1 est renforcée en présence de Ca²⁺ (Thumarat *et al.*, 2012). Selon la théorie proposée par Suzuki *et al.* (1991) il existe une relation entre le nombre de résidus proline et la thermostabilité de l'enzyme.

Contrairement aux lipases et comme les autres estérases, les cutinases ne possèdent pas le couvercle hydrophobe qui couvre le site actif. Ce dernier est accessible au solvant et au substrat. Ceci explique pourquoi les cutinases ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces (Martinez *et al.*, 1992). Le site actif des cutinases est suffisamment large pour accueillir de gros substrats comme la cutine et certains polyesters synthétiques. En outre, les cutinases sont capables d'hydrolyser une plus grande variété de substrats, notamment les esters de faibles poids moléculaires qui sont solubles dans l'eau, ainsi que les triacylglycols de courte et de longue chaîne carboxylique (Chen *et al.*, 2013). Autre que l'activation interfaciale typique des lipases, les cutinases peuvent être distinguées par leur capacité d'hydrolyser des substrats solubles dans l'eau, alors que les lipases ont une préférence pour les substrats insolubles. (Fett *et al.*, 1999). Les cutinases se distinguent de la majorité des estérases par leur capacité d'hydrolyser des polyesters de haut poids moléculaire et des substrats insolubles dans l'eau (Chen *et al.*, 2013). Comme elles sont actives aussi bien en solution qu'en système biphasique (émulsion), les cutinases font en quelque sorte le lien entre les estérases et les lipases (Martinez *et al.*, 1992).

1.3.4 Les subérinases

Les subérinases sont des polyesterases, capables de dégrader ou de dépolymériser partiellement la subérine (Kontkanen *et al.*, 2009). Quelques cutinases de champignons phytopathogènes ont montré une activité subérinase (Kontkanen *et al.* 2009; Ofong et Pearce, 1994; Zimmermann et Eemüller, 1984). La cutinase CcCUT1 de *Coprinopsis cinerea* qui a une activité subérinase a été purifiée et caractérisée par Kontkanen *et al.* (2009), l'enzyme CcCUT1 est une serine estérase avec la triade catalytique Ser-Asp-His et une séquence consensus Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly incluant la serine du site active. CcCUT1 contient quatre cystéines conservées, formant les deux ponts disulfures essentiels pour le repliement correct de la protéine. La séquence prédite de cette enzyme montre qu'il contient un peptide signal N-terminal pour une sécrétion extracellulaire.

1.4 La subérine

La subérine fait partie des polymères naturels les plus abondants après la cellulose. Ce polymère est le constituant principal des lièges des plantes (Graça et Santos, 2007; Kontkanen *et al.*, 2009). La subérine est un constituant majeur des parois cellulaires des tissus végétaux externes, à savoir les péridermes de croissance secondaire ainsi que les tissus intérieurs qui fonctionnent comme des barrières d'isolement (Kolattukudy, 1980) comme les tissus vasculaires où le contrôle de l'écoulement de l'eau est nécessaire (Graça et Santos, 2007; Schreiber, 2010). Les tubercules de pomme de terre sont enveloppés de multicouches de cellules subérisées qui élaborent le périderme. La subérisation enrichit le périderme de la pomme de terre en subérine qui est une substance cireuse imperméable à l'eau, ce qui

augmente l'imperméabilité des cellules du périoderme et limite l'évaporation (Kolattukudy, 1980).

La subérine n'est pas qu'un élément structural, sa synthèse peut être induite par des facteurs extérieurs comme les blessures ou l'attaque d'un agent pathogène. Les cellules subérifiées forment une couche d'étanchéité qui conduit à l'abscision des feuilles, ainsi que la cicatrisation des plaies après des blessures physiques (Van Doom et Stead, 1997). En effet, lorsque les tubercules de pommes de terre sont sectionnés, un tissu d'étanchéité formé de cellules subérifiées se forme en quelques jours, formant un « périoderme de la plaie » (Lulai et Corsini, 1998). La subérine forme un obstacle structural à l'ingression des agents pathogènes. Cette substance cireuse forme une barrière à la diffusion des toxines et des enzymes produites par les agents pathogènes (Kolattukudy, 1984).

1.4.1 La structure de la subérine

Du point de vue structural, la subérine de la pomme de terre est une macromolécule formée de deux domaines spatialement et chimiquement séparés. Un domaine aliphatique formé d'acides gras estérifiés et un domaine aromatique élaboré de composés phénoliques. Ces deux domaines sont liés de manière covalente (Bernards, 2002; Graça et Santos, 2007; Kolattukudy, 1981) (Fig. 8).

L'observation en microscopie électronique en transmission (TEM) de la subérine montre une ultrastructure lamellaire fine formée de bandes denses, opaques en alternance avec des bandes translucides. Cette partie lamellaire constitue le domaine polyaliphatique qui existe entre la paroi cellulaire primaire et la membrane plasmique (Bernards, 2002; Graça et Santos, 2007).

Le domaine polyaromatique se trouve ancré dans la paroi cellulaire primaire est lié aux hydrates de carbone de la paroi cellulaire (Bernards, 2002). La figure 9 montre l'ultrastructure des parois cellulaires subérifiées du périoderme de la pomme de terre, vues par TEM.

1.4.2 La composition chimique de la subérine

1.4.2.1 Le domaine aliphatique

La plupart des connaissances concernant la composition de la subérine proviennent de l'analyse GC-MS des monomères libérés après dépolymérisation de ce polymère avec des méthodes de clivage d'esters tels que l'hydrolyse alcaline, l'alcoolyse catalysée par un acide ou une base ou l'hydrogénolyse réductrice (Bernards, 2002; Graça et Pereira, 2000; Graça et Santos, 2007).

Les principales composantes structurales du domaine aliphatique sont illustrées à la figure 10, y compris les 1-alcanols, les acides ω -hydroxyalcanoïques, les acides α,ω -dioïques, les époxy-acides et le glycérol (Graça et Pereira, 1997). La longueur de la chaîne des α,ω -diacides et ω -hydroxyacides dans la subérine varie généralement de C16 à C26, et la totalité sont des chaînes à nombre pair (Kolattukudy, 1981). Dans certaines subérines, les acides gras monofonctionnels et les alcools peuvent atteindre des longueurs de chaîne jusqu'à C30 (Rios, 2014). Les acides α,ω -dioïques sont uniques aux tissus subérifiés et peuvent être utilisés comme marqueurs diagnostiques pour différencier les tissus subérifiés des tissus cutinisés (Mark A Bernards, 2002).

Historiquement, le domaine aliphatique de la subérine était considéré semblable à la cutine (Cottle et Kolattukudy 1982; Graça et Pereira 1997; Kolattukudy 1984). Cependant, Bernards et Lewis (1998) ont prouvé que ces deux polyesters sont distincts à la fois morphologiquement et chimiquement. En effet, les aliphatiques dans les tissus subérifiés sont situés entre la paroi cellulaire primaire et le plasmalemme, tandis que la cutine est une couche continue située à la surface des tissus externes tels que les tiges, les fruits, les fleurs et les feuilles (Kolattukudy, 1980).

Suite à une révélation par une coloration histochimique couplée à la microscopie électronique, le domaine aliphatique des tissus subérifiés présente typiquement une structure multilamellaire caractéristique (Bernards, 2002; Graça et Santos, 2007; Serra *et al.*, 2010). Le domaine aliphatique de la subérine contient généralement des acides gras à chaîne plus longue (supérieure à 20 unités de carbone) que ceux de la cutine (Bernards, 2002). Les aliphatiques de la subérine se distinguent également de ces derniers par la présence d'acides α,ω -dioïques (Beisson *et al.* 2012). Au contraire, les cutines sont en grande partie constituées de chaînes plus courtes (inférieur à 20 unités de carbone), mais avec plus de substitutions, comme les di et trihydroxyacides et les époxy-acides dont l'acide dihydroxyhexadécanoïque est considéré comme indicateur de la cutine (Gérard *et al.* 1994). Les deux polymères aliphatiques sont partiellement réticulés par des liaisons ester et ils contiennent également des cires associées (Bernards et Lewis, 1998).

1.4.2.2 Le domaine polyaromatique

L'application des techniques de dégradation, développées pour l'analyse des lignines (Lewis et Yamamoto, 1990) à des tissus subérifiés a montré une ressemblance entre le domaine

polyaromatique de la subérine et la lignine (Kolattukudy, 1980, 1984) qui est principalement dérivée de la polymérisation des monolignols. Des études plus récentes utilisant des techniques non destructives, comme le marquage spécifique avec C^{13} suivi de la spectroscopie RMN *in situ* à l'état solide (Bernards et Lewis, 1998) ainsi que la méthode de la thioacidolyse (Bernards, 2002; Bernards et Lewis, 1998), ont révélé le domaine polyaromatique de la subérine comme un polymère dérivé de l'hydroxycinnamate principalement composé d'acide férulique et de N-feruloyltyramine. Bien que les deux composés, la subérine et la lignine contiennent des monolignols, certains acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés tels que le feruloyltyramine, ne se retrouvent que dans la subérine (Bernards *et al.*, 1995).

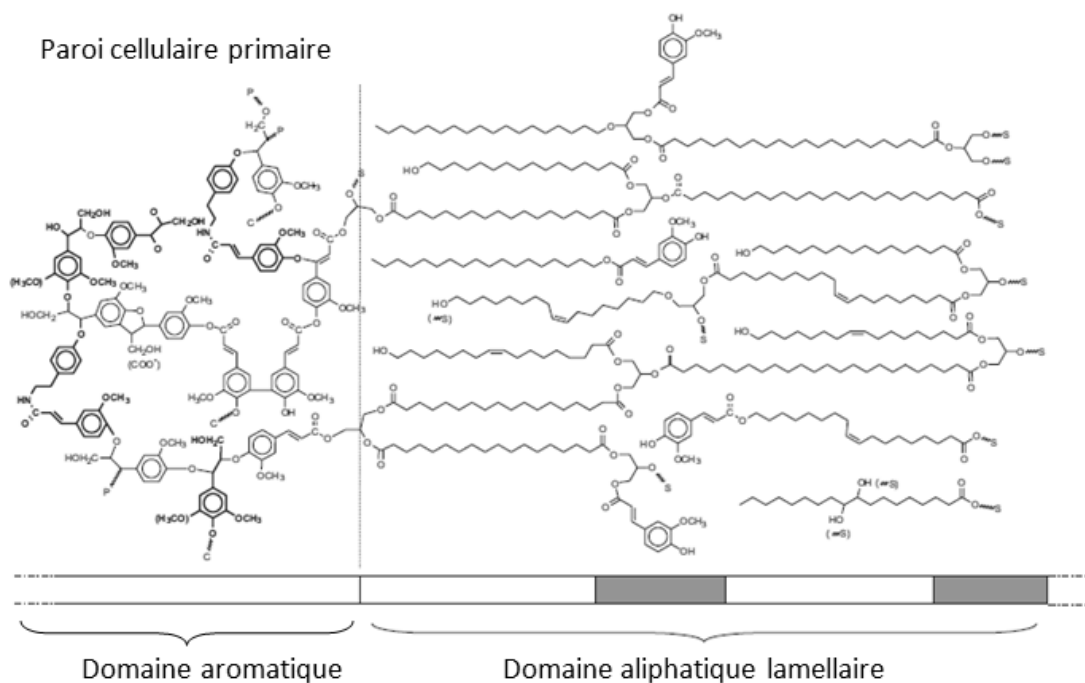


Figure 8. Modèle structural de la subérine de la pomme de terre (adaptée de Bernards, 2002).

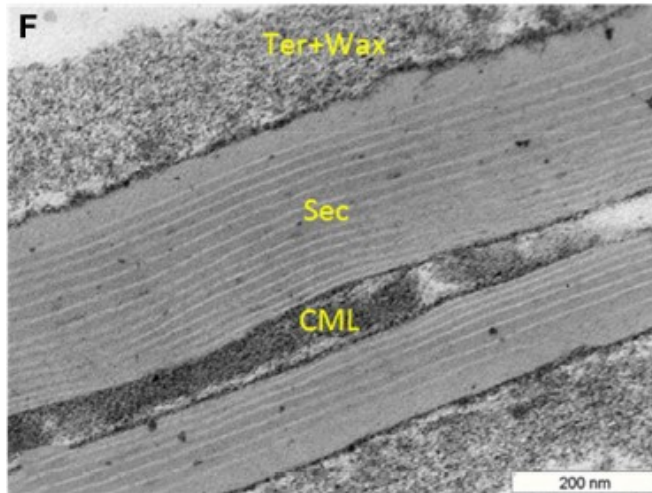


Figure 9. Ultrastructure des parois cellulaires subérifiées du périoderme de la pomme de terre, vues par MET. CML, lamelle moyenne et paroi primaire; Sec, paroi secondaire lamellaire subérisée; Ter et Wax, paroi tertiaire avec cires (Graça, 2015).

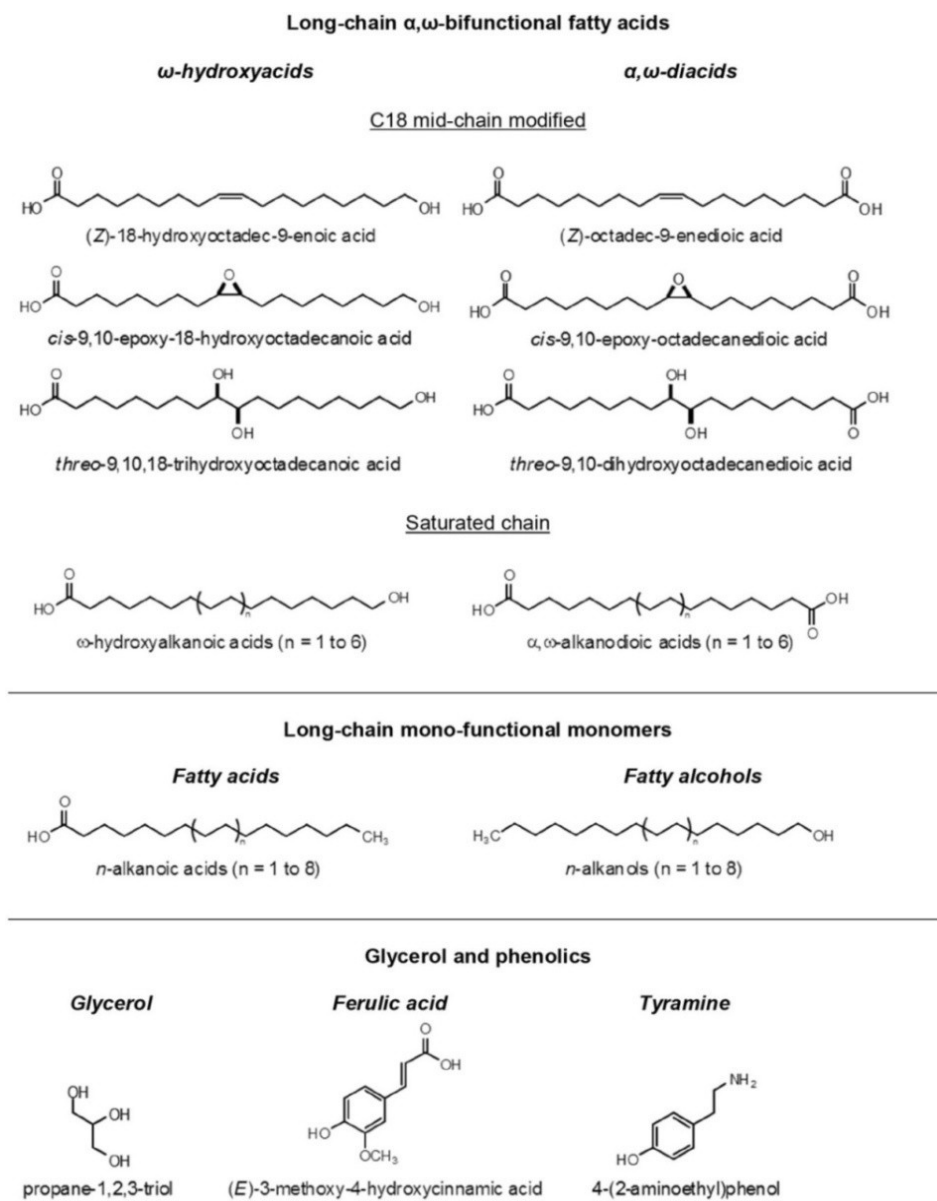


Figure 10. Les principaux monomères de la partie aliphatique de la subérine (Graça, 2015).

1.5 La dégradation de la subérine et de la cutine

La cutine et la subérine sont des biopolymères récalcitrants à la dégradation; elles constituent les principaux composants structuraux des barrières extérieures des plantes (Kontkanen *et al.*, 2009). La fragilisation de la barrière cubculaire des plantes hôtes, par des enzymes hydrolytiques sécrétés par l'agent pathogène, est une étape préliminaire au cours de l'infection (Dutta *et al.*, 2009).

La biodégradation de la cutine, par des cutinases, a été démontrée chez plusieurs microorganismes comme les champignons et les bactéries (Kolattukudy *et al.* 1981; Cottle et Kolattukudy, 1982; Kontkanen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). En plus de leur activité cutinolitique, certaines cutinases peuvent dégrader la subérine (Zimmermann et Eemüller, 1984; Ofong et Pearce, 1994; Kontkanen *et al.*, 2009).

Vu la présence de nombreux liens esters dans la structure de la subérine (Fig. 8), l'implication des estérases dans la biodégradation de ce biopolymère a sollicité l'intérêt de plusieurs chercheurs (Zimmermann et Eemüller, 1984; Ofong et Pearce, 1994; Kontkanen *et al.*, 2009). En effet, il a été démontré que l'activité estérase extracellulaire de certains champignons et bactéries phytopathogènes augmentait en présence de la subérine (Beauséjour *et al.*, 1999; Komeil *et al.*, 2013; McQueen et Schottel, 1987). La biodégradation de la partie aliphatique de la subérine a été démontrée chez certains champignons pathogènes comme *Rosellimia desmazieresii* (Ofong et Pearce, 1994), *Mycena meliigena* (Schultz *et al.*, 1996) et *Coprinopsis cinerea* (Kontkanen *et al.*, 2009). L'implication des streptomycètes dans la biodégradation de la subérine a été suggérée par certains auteurs (Beauséjour *et al.*, 1999; Komeil *et al.*, 2013; McQueen et Schottel, 1987). En effet, Komeil *et al.* (2013) ont mis en évidence le gène *sub1*

de *S. scabies*, codant pour une estérase homologue à des cutinases fongiques dont l'expression est induite spécifiquement par la subérine. De plus, Beaulieu *et al.* (2016) ont démontré la fragmentation du périoderme de tubercule de la pomme de terre et la brisure des lamelles de subérine après des mois d'incubation du périoderme de pomme de terre avec *S. scabies*.

1.6 Le gène *sub1* de *S. scabies* EF-35

Dans le but d'identifier des estérases impliquées dans la dégradation de la subérine, qui peuvent coder pour de possibles subérinases, Komeil *et al.* (2013) ont analysé la séquence du génome de *S. scabies* 87-22, pour chercher des gènes présentant une homologie avec un gène de champignon *Coprinopsis cinerea*, codant pour l'estérase extracellulaire CcCUT1 qui a une activité cutinase/subérinase (Kontkanen *et al.*, 2009). Un gène codant pour une potentielle estérase extracellulaire a été identifié dans le génome de *S. scabies* 87-22. Il s'agit du gène *sub1* (SCAB_78931, 642 pb). La présence de ce gène a été confirmée par PCR dans la souche *S. scabies* EF-35. Les gènes *sub1* de EF-35 et 87-22 présentent une homologie de 100 % (Komeil *et al.*, 2013). Une RT-PCR réalisée avec la souche *S. scabies* EF-35 a montré que le gène *sub1* est spécifiquement exprimé fortement et plus faiblement en présence de la subérine et de la cutine, respectivement (Komeil *et al.*, 2013), ce qui suggère que le gène *sub1* code pour une subérinase/cutinase.

1.6.1 Analyse de la séquence protéique de l'enzyme Sub1

L'analyse par BLAST de la séquence protéique de Sub1 par rapport aux bases de données de NCBI a montré que Sub1 n'est retrouvée que dans quelques actinobactéries (Komeil *et al.*, 2013). Selon l'arbre phylogénétique de la séquence en acides aminés de Sub1 (Fig. 11) (Komeil

et al., 2013), cette enzyme a présenté une homologie avec des enzymes de type cutinase provenant de mycobactéries pathogènes humaines et de certaines espèces fongiques. Par exemple, l'enzyme Sub1 a montré une identité de 33 % avec la cutinase CcCUT1 du *C. cinerea* VTDD041011(Komeil *et al.*, 2013). La figure 11 représente l'arbre phylogénétique de la protéine Sub1 construit selon la méthode de jointure-voisine (MEGA 4.0).

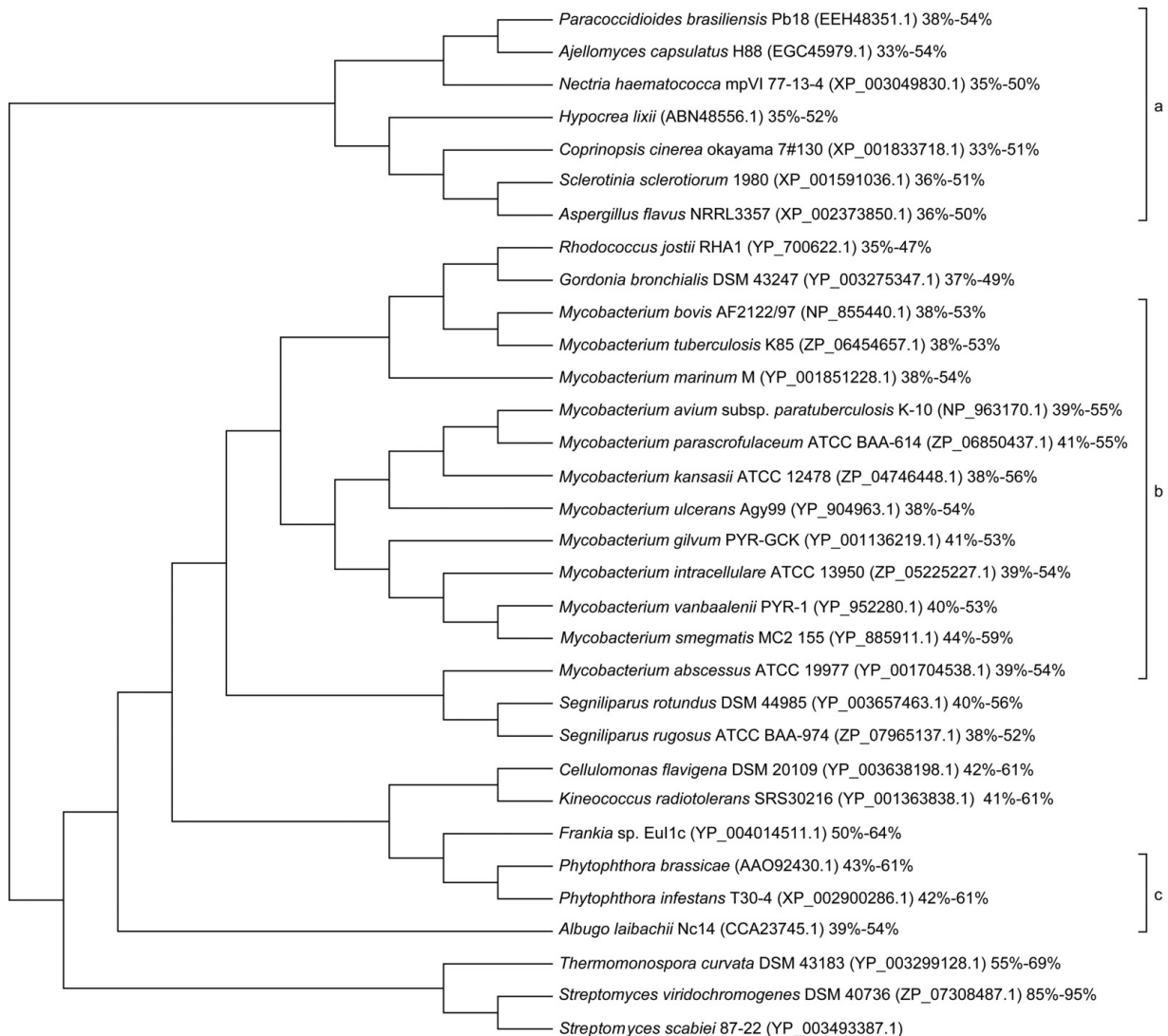


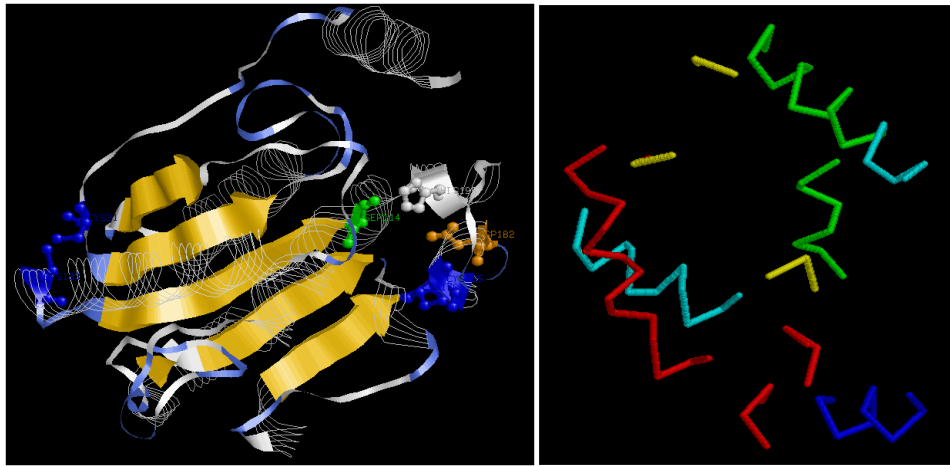
Figure 11. l'Arbre phylogénétique de la protéine Sub1 et ces homologues. Les numéros d'accès sont donnés la fin de chaque nom d'espèce, suivi d'une pourcentage d'identité. a, groupe d'espèces fongiques; b, groupe d'espèces de *Mycobacterium* et c, groupe d'espèces d'oomycètes (Komeil *et al.*, 2013).

Des alignements multiples de la séquence en d'acides aminés de la protéine Sub1 avec des cutinases fongiques et bactériennes ont révélé les résidus sérine, acide aspartique et histidine

qui sont strictement conservés dans l'alignement. Ils sont en position Ser 114, Asp 182 et His 195 dans la séquence de Sub1. Ces résidus forment la triade catalytique de la famille des sérine hydrolases y compris les cutinases (Chen *et al.*, 2013; Kontkanen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 1992). En plus, une séquence consensus Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly, contenant le résidu sérine actif, caractéristique de la superfamille des cutinases (Kontkanen *et al.*, 2009), a été aussi identifiée dans la séquence en acides aminés de Sub1. Cette séquence consensus a été trouvée à la position 112-116. Quatre résidus cystéine, hautement conservés ont été marqués dans la séquence prédite de Sub1, formant deux ponts disulfures (Cys31-Cys103 et Cys178-Cys185). Ces quatre résidus cystéine sont essentiels pour le repliement spatial des cutinases et pour leur l'activité catalytique (Kolattukudy, 1985). L'analyse N-terminale de la séquence en acides aminés prédite à partir de la traduction de la séquence en acides nucléiques du gène *sub1* a révélé la présence d'un peptide signal de 28 à 29 résidus, destiné pour une sécrétion extracellulaire (Komeil *et al.*, 2013 et ce travail). Selon l'interface de recherche de domaine conservée du NCBI, la séquence en acides aminés prédite de Sub1 appartient à la superfamille des cutinases.

1.6.2 Structure tridimensionnelle de Sub1 et sa ressemblance avec celles d'autres cutinases

La structure tridimensionnelle de la protéine Sub1 visualisée par le logiciel RasWin, montre que Sub1 est constituée de cinq feuilletts β , parallèles et dans le même sens, liés par des boucles à des hélices α . Une triade catalytique (Ser 114, Asp 182 et His 195) et quatre cystéines (Cys31, Cys103, Cys178 et Cys185) forment deux ponts disulfures dont un se trouve proche de la triade catalytique (Cys178-Cys185) et l'autre pont disulfure est installé du côté opposé (Cys31-Cys103). Les cinq feuilletts β se trouvent à l'intérieur de la structure, entourés par les hélices et les boucles. La figure 12a illustre la structure tridimensionnelle de la protéine Sub1.



(a)

(b)

Figure 12. Structure tridimensionnelle de Sub1. (a) les cinq feuillets β parallèles et en même sens, colorés en jaune et les hélices α colorées en blanc, la triade catalytique en modalité boules et bâtonnets (Ser114, vert; Asp182, marron, et His195, blanc) et les quatre cystéines représentées en modalité boules et bâtonnets, en bleu (Cys31-Cys103 et Cys178-Cys185). (b) Les hélices α de différentes tailles de la protéine Sub1.

Comme la cutinase d'*Aspergillus oryzae* (PDB ID:3GBS), Sub1 apparaît comme une protéine monomérique constituée de cinq feuillets β parallèles entourés de dix hélices α . Tandis que la cutinase de *Fusarium solani* (PDB ID : 1CEX) est composée de six feuillets β et du même nombre d'hélices α (Liu *et al.*, 2009).

Comme la cutinase de *Fusarium solani* et plusieurs autres cutinases (Carvalho *et al.* 1999; Liu *et al.* 2009; Martinez *et al.* 1992), l'enzyme Sub1 est caractérisée par deux ponts disulfures qui sont bien conservés dans la structure de la majorité des cutinases publiées précédemment, y compris celle de *F. solani* et d'*Aspergillus oryzae* (Liu *et al.*, 2009). Alors que l'enzyme

d'*Aspergillus oryzae* possède une liaison disulfure supplémentaire entre Cys63 et Cys76, cette liaison disulfure est unique pour les cutinases des *Aspergillus* (Liu *et al.*, 2009).

1.7 Les objectifs du mémoire :

L'objectif général de ce travail consiste à purifier et à caractériser l'estérase codée par le gène *sub1* de *S. scabies* EF-35.

Les objectifs spécifiques sont :

1. Cloner le gène *sub1* et surexprimer de façon hétérologue la protéine codé par ce gène.

Pour ce faire, le gène *sub1* de *S. scabies* EF-35, avec ou sans son propre peptide signal, sera cloné dans des vecteurs d'expression, qui sont les plasmides pFDES-D1-7 et pET-30a (+). Ensuite, les vecteurs recombinants seront transformés dans des hôtes d'expression, *S. lividans* et *E. coli* Shuffle-T7 respectivement. La protéine recombinante Sub1 sera purifiée d'un des deux hôtes selon les résultats obtenus.

2. Caractériser la protéine Sub1

L'activité estérasique de la protéine Sub1 purifiée sera estimée par la mesure de l'absorbance à 420 nm du *para*-nitrophénol qui est un produit de l'hydrolyse de la liaison ester des substrats *p*-nitrophényl esters. Le V_{max} et k_m de la protéine Sub1 seront déterminés en dosant l'activité estérasique de la protéine en présence de différentes concentrations du substrat *p*-nitrophényl butyrate (NPB).

3. Tester l'effet de l'estérase Sub1 sur la subérine et la cutine

L'action de l'estérase Sub1 sur la cutine et la subérine sera déterminée par un dosage colorimétrique des monomères d'acides gras libérés à partir de ces biopolymères après incubation avec l'enzyme Sub1.

4. Tester l'effet de l'estérase Sub1 sur un polymère synthétique, le polyéthylène téréphtalate (PET)

L'action de l'estérase Sub1 sur le PET sera estimée par le dosage de l'acide téréphtalique libéré à partir de PET, sous forme de granules broyées ou de fibres, incubé avec l'enzyme Sub1.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Enrichissement en subérine du périoderme de pomme de terre

Des périodermes de pomme de terre enrichis en subérine (par suite appelés PS) ont été obtenus selon le protocole de Kolattukudy et Agrawal (1974). Les tubercules de pomme de terre ont été bouillis pendant 20 min. Le périoderme (la peau) a été enlevé des tubercules. Par la suite, la peau a été rincée à l'eau du robinet et trempée pendant une nuit, avec agitation, dans un tampon acétate 50 mM (pH 4,0) avec des cellulases d'*Aspergillus niger* (5 g/L) (Sigma-Aldrich) et des pectinases (1 g/L) (Sigma-Aldrich) pour digérer la chair résiduelle. La peau a été ensuite rincée avec une solution de CHCl₃/CH₃OH (2:1). Une extraction Soxhlet avec le chloroforme a été faite pendant 12 heures pour extraire les acides gras libres et les cires. Par la suite, les PS résultants ont été séchés sous la hotte, moulus dans un moulin à café et conservés à température ambiante (Kolattukudy et Agrawal, 1974).

Le PS a été enrichi de façon encore plus prononcée de subérine (par la suite appelé PSS) en exposant ce substrat à une dégradation microbienne en présence de l'agent pathogène *S. scabies* EF-35. Un inoculum de 1 ml de *S. scabies* préparé comme décrit par Komeil *et al.* (2014) et 1 g de PS ont été ajoutés à 50 ml de milieu minimal constitué d'une solution minérale (0,5 g/L (NH₄)₂SO₄; 0,5 g/L K₂HPO₄; 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O et 10 mg/L FeSO₄·7H₂O). La culture bactérienne a été incubée à 30 °C avec agitation de 250

rpm pendant 60 jours. Après un mois d'incubation, la culture était rafraîchie par 10 ml du milieu minimal et 200 µl d'inoculum de *S. scabies*. À la fin de la période d'incubation, la culture a été centrifugée (20 min à 3450xg), le culot contenant le périderme et les bactéries a été resuspendu dans 100 ml d'eau stérile puis autoclavé pour 15 minutes. Par la suite, le résidu du périderme enrichi en subérine a été lavé avec de l'eau stérile pour enlever les débris des cellules bactériennes, puis séché dans une étuve à 50 °C pendant une journée puis stocké dans un contenant sec stérile. Ce résidu obtenu est plus riche en subérine (pourcentage de composés aliphatiques par rapport à la quantité du résidu polysaccharidique), autrement dit, il contient moins de polysaccharides que le PS, puisque les bactéries *S. scabies* ont utilisé des polysaccharides qui se trouvaient essentiellement dans les parois tertiaires des cellules du PS (Beaulieu *et al.*, 2016). La figure 13 montre le niveau d'enrichissement en subérine du PS et du PSS.

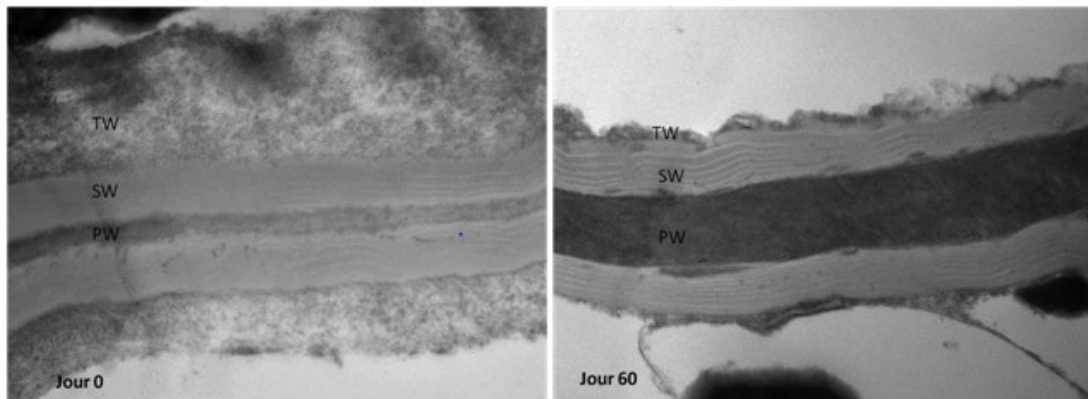


Figure 13. Coupe du périderme de pomme de terre enrichi en subérine (PS) et de ce substrat incubé en présence de l'agent phytopathogène *S. scabies* EF-35 pendant 60 jours (PSS) observés en microscopie à transmission. PW: paroi primaire; SW: paroi secondaire; TW: paroi tertiaire (Laboratoire de Carole Beaulieu).

2.2 Préparation de la cutine

La cutine a été extraite à partir de pommes selon le protocole de Walton et Kolattukudy (1972). Une quantité de 10 kg de pommes a été pelée, la pelure a été bouillie pendant 20 min dans l'eau avec de l'acide oxalique (4 g/l) et de l'ammonium oxalate (16 g/l). La pelure a ensuite été incubée toute une nuit dans un grand erlenmeyer contenant un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 (V/V), puis elle a été récupérée dans un tamis et séchée sous la hotte. Une extraction par l'appareil Soxhlet a été faite pendant 12 heures avec du chloroforme. Par la suite, le résidu a été traité avec une solution de cellulase d'*Aspergillus niger* (5 g/L) et de pectinase (Sigma Aldrich) (1 g/L) dans un tampon 0,05 M d'acétate d'ammonium pH 4,0 pendant 14 heures. L'extraction avec le chloroforme et le traitement enzymatique ont été répétés 2 fois. Enfin, la cutine obtenue a été séchée sous la hotte et conservée à température ambiante.

2.3 Les souches bactériennes et plasmides

2.3.1 Les bactéries

Le tableau 1 présente la liste des bactéries utilisées dans ce travail et leurs principales caractéristiques.

Tableau 1. Liste des bactéries utilisées dans ce travail et leurs principales caractéristiques.

Bactéries	Caractéristiques
<i>E. coli</i> DH5 α (Invitrogen)	Hôte de clonage, ne contient pas le gène qui code pour la T7 ARN polymérase. Il favorise une stabilité élevée de l'insert. Bon rendement en ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> GM272 (Invitrogen)	Hôte de clonage, ne méthylant pas l'ADN plasmidique introduit.
<i>E. coli</i> Shuffle T7 Express C3029H (Biolabs)	Hôte d'expression. Dérivé d' <i>E. coli</i> BL21. Déficient en protéases cytoplasmiques. Il permet le repliement correct des protéines qui ont des ponts disulfures. Il contient le gène qui code pour le T7 ARN polymérase qui est sous le contrôle de l'IPTG. Sensible à la kanamycine.
<i>Streptomyces scabies</i> EF-35	Souche contenant le gène <i>sub1</i>
<i>Streptomyces lividans</i> 10-164 et TK-24	Souches pour l'expression hétérologue de la protéine Sub1. Sensibles à la kanamycine. Ces deux souches sont des dérivés <i>S. lividans</i> 1326. La souche <i>S. lividans</i> 10-164 est un mutant <i>msiK</i> (Mondou <i>et al.</i> , 1986). La souche <i>S. lividans</i> TK-24 ne possède pas les plasmides cryptiques (Brzezinski, communication personnelle).

2.3.2 Les plasmides

Le tableau 2 présente la liste des plasmides qui ont été utilisés et produits durant ce travail. Deux vecteurs ont été utilisés dans ce travail pour le clonage du gène *sub1* de *S. scabies*, pFDES D1-7 et pET -30a (+). La figure 14 présente la région d'expression y compris le site de clonage multiple du plasmide pET-30a (+).

Tableau 2. Liste des plasmides utilisés et produits dans cette étude

Plasmide	Caractéristiques
pFDES D1-7	Dérivé du plasmide pFD666 (Denis et Brzezinski, 1992) duquel un fragment AclI/NruI de 354pb situé entre les paires 4930 et 33 a été délété (Sanssouci <i>et al.</i> , 2011). Contient un gène de résistance à la Kanamycine. D1-7; un promoteur constitutif moyennement fort (Seghezzi <i>et al.</i> , 2011) a été ajouté au plasmide pFDES dans le site de clonage entre HindIII et NdeI (Brzezinski, communication personnelle).
pFDES D1-7 <i>sub1</i>	Dérivé du plasmide pFDES D1-7. Contient le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> sans la portion codante pour le peptide signal inséré dans le site de clonage via une digestion par NdeI et BamHI.
pFDES D1-7 <i>sub1-psig</i>	Dérivé du plasmide pFDES D1-7 contient le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> avec la portion codant pour le peptide signal inséré dans le site de clonage suite à une digestion par NdeI et BamHI.
pET-30a (+)	Plasmide contenant une origine de répllication dans <i>E. coli</i> , un promoteur fort T7 inductible par l'IPTG en amont de l'opérateur lac, deux régions pour des étiquettes de six histidines dans la région du site de clonage multiple et un gène de résistance à la kanamycine.
pET- <i>sub1</i>	Dérivé de pET -30a (+) contenant le gène <i>sub1</i> de <i>S. scabies</i> inséré dans le site de clonage suite à une digestion par NcoI et XhoI.

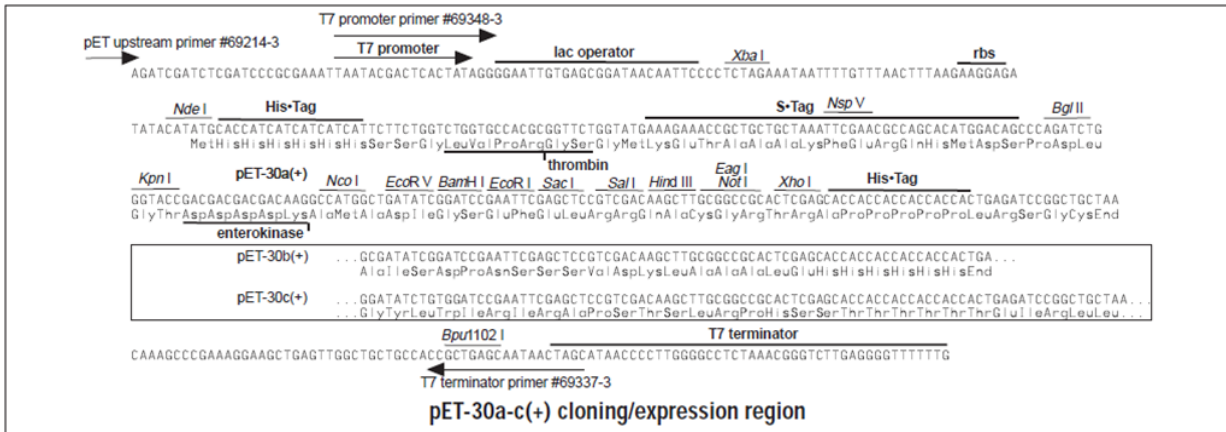


Figure 14: La région d'expression y compris le site de clonage multiple du plasmide pET-30a (+) (Novagen).

2.4 Milieux et conditions de culture

Les inocula de toutes les souches de *Streptomyces* utilisées dans ce travail ont été préparés de la manière décrite par Komeil *et al.* (2013) avec quelques modifications. En effet, 25 ml de TSB contenant au besoin 200 µg/ml de kanamycine ont été inoculés avec des spores (10^8), incubés à 30 °C avec agitation (250rpm) pendant 48 heures. Par la suite, la culture a été centrifugée 10 minutes à 3450xg, le culot a été remis en suspension et lavé deux fois avec une solution saline (0,85 % NaCl) stérile. Après centrifugation de la suspension, les cellules ont été resuspendues dans un volume de milieu de culture correspondant à deux fois le volume du culot pour produire la source des inocula.

S. scabies EF-35 a été cultivé dans du TSB alors que le milieu M14M a été utilisé pour la culture des *S. lividans* recombinants. Le milieu M14M est une solution de 0,1 % KH_2PO_4 ;

0,55 % K_2HPO_4 ; 0,14 % $(NH_4)_2SO_4$ et 0,1 % d'une solution d'éléments traces (2 mg/ml $CoCl_2 \cdot 7H_2O$; 5 mg/ml $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,6 mg/ml $MnSO_4 \cdot H_2O$ et 1,4 mg/ml $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 6,9) auquel a été ajouté après stérilisation à l'autoclave, 0,03 % $MgSO_4$; 0,03 % $CaCl_2$ et 1 % mannitol (Dubeau *et al.*, 2011). Lorsque nécessaire, de la kanamycine a été ajoutée au milieu de culture des *Streptomyces* à une concentration finale de 200 μ g/ml (Kieser *et al.*, 2000).

Pour obtenir des spores, la souche de *S. scabiei* EF-35 a été cultivée sur le milieu solide YMEA (4 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 10 g/L malt extract, 15 g/L d'agar et 1 g/L $CaCO_3$) (Kieser *et al.*, 2000), alors que le milieu SLM3 solide (10 g/L amidon, 5 g/L liqueur de maïs, 3 g/L $CaCO_3$, 10 mg/L chlorohydrate de thiamine, 12 mg/L $FeSO_4$ et 20 g/L d'agar) (Dewitt, 1985) a été utilisé pour *S. lividans*. Le milieu R5 (Kieser *et al.*, 2000) a été utilisé pour générer les protoplastes de *S. lividans*. Les souches de *Streptomyces* étaient cultivées à 30 °C. Les cultures liquides étaient agitées à 250 rpm.

Les souches bactériennes d'*E. coli* DH5 α et d'*E. coli* Shuffle T7 ont été cultivées dans le milieu LB « Luria-Bertani broth » supplémenté si nécessaire avec 30 μ g/ml de kanamycine. À moins d'avis contraire, ces bactéries ont été incubées à 37 °C et les cultures liquides étaient faites avec agitation de 225 rpm. Dans le cas d'*E. coli* Shuffle T7, la température d'incubation était abaissée à 25 °C après une induction par l'IPTG (pET System Manual 11th Edition).

2.5 Isolement d'ADN génomique et d'ADN plasmidique

L'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 et de *S. lividans* a été isolé à partir d'une culture bactérienne de 48 heures en utilisant la méthode de « Salting out » (Kieser *et al.*, 2000) ou bien en utilisant le kit « Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit » (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fabricant. L'ADN plasmidique a été isolé d'une culture d'*E. coli* de 12 heures en utilisant le kit d'extraction de l'ADN plasmidique « GenElute™ Plasmid Miniprep Kit » selon les recommandations du fabricant (Sigma-Aldrich).

2.6 Amplification du gène *sub1*

Les amplifications par PCR ont été faites dans un thermocycleur T100 (Bio-Rad). Les composants pour une réaction d'amplification étaient 2,5 µl du tampon de réaction Taq standard, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,5 µl d'amorce sens 10 µM, 0,5 µl d'amorce anti-sens 10 µM, 20 ng de l'ADN modèle et 0,125 ml d'ADN Taq polymérase (25 unités/ml du mélange réactionnel) (Biolabs) dans un volume total de 25 µl. Les conditions de thermocycleur étaient 2 min à 95 °C suivis par 30 cycles de 30 s à 95 °C, 1 min à la température d'hybridation spécifique pour chaque couple d'amorces, 1 min à 68 °C et 5 min à 68 °C pour l'extension finale (Sambrook et Russell, 2001).

La partie codante du gène *sub1* avec ou sans la région correspondante au peptide signal a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de *S. scabies* EF-35. Les séquences des amorces utilisées pour ces amplifications sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Les séquences des amorces utilisées pour les amplifications.

Partie amplifiée	Amorce sens	Amorce anti-sens	Endonucléases
Partie codante du gène <i>sub1</i> avec la région correspondante au peptide signal	F2-pFDES aggccat <u>atg</u> cgatcc gctgtacc	R-pFDES at <u>atggatc</u> cttagatctt ggtcgcggcgaagg	NdeI et BamHI
Partie codante du gène <i>sub1</i> sans la région correspondante au peptide signal	F1-pFDES agccat <u>atg</u> catcatcat catcatcacgatgatgat gataaagccgcctgcac ggacatc	R-pFDES at <u>atggatc</u> cttagatctt ggtcgcggcgaagg	NdeI et BamHI
Partie codante du gène <i>sub1</i> sans la région correspondante au peptide signal	F-pET at <u>atccatg</u> gccgctg cacg gacatcg	R-pET at <u>atctcg</u> agtagatctt ggtcgcggcgaagg	NcoI et XhoI

F, amorce sens; R, amorce anti-sens. Les régions soulignées correspondent aux sites de restriction des endonucléases.

Une migration électrophorétique sur gel d'agarose 1 % des produits de PCR, a été effectuée selon la manière décrite par Sambrook et Russell (2001) et a permis de vérifier la taille des amplicons. Les amplicons d'intérêt ont été purifiés à partir du gel d'agarose en utilisant le kit de purification sur gel « MinElute Gel extraction kit » (QIAGEN). Les amplicons ont été par la suite clonés dans les vecteurs pFDES-D1-7 ou pET-30-a (+).

2.7 Clonage du gène *sub1* dans les vecteurs pFDES-D1-7 et pET -30a (+)

Les produits de la PCR du gène *sub1* et les vecteurs de clonage ont été digérés par les mêmes enzymes de restriction appropriées (NdeI/BamHI pour le plasmide pFDES et NcoI/XhoI pour le vecteur pET). L'enzyme T4 DNA ligase (BioLabs) a été utilisé pour coller les extrémités du plasmide à l'amplicon. La ligation a été faite selon les recommandations du fournisseur New England BioLabs. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries *E. coli* DH5 α compétentes par un choc thermique comme mentionné dans le protocole de transformation à haute efficacité proposé par le fournisseur New England BioLabs. Par la suite, les bactéries ont été étalées sur un milieu LB Agar avec kanamycine et incubées toute la nuit. La présence des plasmides dans les colonies ayant poussé sur ce milieu sélectif a été confirmée par PCR comme décrite à la section 2.6, en utilisant les amorces appropriées pour chaque amplicon (voir Tableau. 3). Un séquençage des deux brins des amplicons a été fait à la Plateforme d'analyses génomiques de l'Université Laval (Québec, Canada). Les vecteurs qui ont reçu les bons amplicons ont été par la suite utilisés pour la transformation des bactéries hôtes d'expression.

2.8 Transformation de souches de *S. lividans*

2.8.1 Préparation des protoplastes

Pour la préparation de protoplastes, la méthode de Kieser *et al.* (2000) a été suivie. Ainsi, un inoculum de 2 ml d'une préculture de *S. lividans* a été ajouté à 100 ml de milieu R5. Après 24 heures d'incubation, la culture a été centrifugée à 2000xg pendant 10 min. Le surnageant a été jeté, le culot a été récupéré et resuspendu dans 60 ml de sucrose à 10,3 %. Cette étape a été

répétée deux fois. Par la suite, le culot a été suspendu dans 40 ml du tampon P complet (Kieser *et al.*, 2000) contenant 80 mg de lysozyme. La suspension de cellules a été incubée à 30 °C pendant 40 minutes dans un appareil rotatif. Les protoplastes ont été récupérés par filtration de la suspension à travers du coton stérile. Le volume récupéré par filtration a été centrifugé à 2000xg pendant 10 min. Le culot obtenu a été resuspendu dans un petit volume de tampon P et réparti dans des tubes eppendorf stériles (100 µl/tube). Les tubes ont été rapidement congelés à -80 C °. Avant l'utilisation, les protoplastes ont été décongelés rapidement, en plaçant les tubes contenant les protoplastes sous l'eau tiède.

2.8.2 Transformation des protoplastes de *S. lividans*

Le plasmide pFDES-D1-7 (vide ou portant le gène *sub1*) extrait de la souche bactérienne *E. coli* GM272, afin d'obtenir de l'ADN non méthylé, a été transformé dans les protoplastes de *S. lividans* 10-164 et *S. lividans* TK -24. Environ 10 ng d'ADN plasmidique ont été ajoutés à 100 µl de protoplastes supplémentés de 200 µl de polyéthylène glycol 25 % (PEG 1000) (Sigma-Aldrich). Après trente minutes d'incubation, les protoplastes ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant de milieu R5 et incubés pendant une nuit. Un volume de 3 ml de Nutrient broth contenant 0,6 % d'agar et 50 mg/ml de kanamycine a été versé sur chaque boîte. Les plats de Pétri ont été incubés pendant 3 jours. Les bactéries ayant poussé ont été purifiées sur un milieu R5 supplémenté de kanamycine. La présence du gène *sub1* dans les souches transformées a été confirmée par PCR telle que décrite à la section 2.6, en utilisant les amorces appropriées pour chaque amplicon (voir Tableau. 3).

Six types de transformants de *S. lividans* ont été obtenus. Ces transformants sont :

S. lividans TK-24 pFDES (porteur du plasmide sans insert), *S. lividans* TK24 pFDES-*sub1* (porteur du plasmide ayant pour insert le gène *sub1*), *S. lividans* TK24 pFDES-*Sub1*psig (porteur du plasmide ayant pour insert le gène *sub1* accompagné de la région du peptide signal), *S. lividans* 10-164pFDES (porteur du plasmide sans insert), *S. lividans* 10-164 pFDES-*Sub1* (porteur du plasmide ayant pour insert le gène *sub1*), *S. lividans* 10-164 pFDES-*Sub1*psig (porteur du plasmide ayant pour insert le gène *sub1* accompagné de la région du peptide signal) (tableaux 1 et 2).

2.9 Transformation dans *E. coli*

Une transformation des plasmides pET-30a (+) portant ou non le gène *sub1* a d'abord été effectué dans la souche bactérienne d'*E. coli* DH5 α (Invitrogen). Cette souche est exempte de l'ARN polymérase T7. Ainsi, la protéine Sub1 ne sera pas produite, ce qui limitera l'instabilité du plasmide d'expression, ainsi que la toxicité pouvant être engendrée par l'expression protéique (pET System Manual 11th Edition, Novagen). Le plasmide a été réisolé de cette souche (voir la section 2.5) et transformé dans un hôte d'expression qui est la souche bactérienne *E. coli* Shuffle T7 express (BioLabs). Cette souche est déficiente en protéases cytoplasmiques (la protéine Sub1 est synthétisée et stockée dans le cytoplasme) et permet aussi la formation de ponts disulfure ce qui est essentiel au cas de la protéine Sub1.

L'ADN plasmidique pET-30a (+) avec ou sans l'insert a été transféré dans l'hôte d'expression suite à un choc thermique comme mentionné dans le protocole de transformation à haute efficacité (New England BioLabs). Après trente minutes d'incubation, les bactéries ont été

étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB avec kanamycine et incubées une nuit. La présence du gène *subI* dans les bactéries qui ont poussé a été vérifiée par PCR telle que décrite à la section 2.6, en utilisant les amorces appropriées pour chaque amplicon (voir Tableau. 3).

Deux types de transformants ont été obtenus. Ces transformants sont :

- *E. coli* Shuffle-T7-pET (porteur du plasmide pET-30a (+) sans insert)
- *E. coli* Shuffle-T7-pET-*subI* (porteur du plasmide pET-30a (+) ayant pour insert le gène *subI*) (Tableaux 1 et 2).

2.10 Obtention des extraits cytoplasmiques et extracellulaires

Les protéines extracellulaires et intracellulaires des souches de *S. lividans* recombinantes ont été obtenues d'une culture de deux jours contenant de la kanamycine. Après centrifugation (20 min à 3450xg), le surnageant de chaque culture a été récupéré et gardé à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure. Pour extraire les protéines cytoplasmiques, le protocole de Langlois *et al.* (2004) a été utilisé. Le culot bactérien a été lavé deux fois dans un tampon de sonication (10 mM Tris-HCl, pH 7). Les cellules ont été remises en suspension dans 4 ml du tampon de sonication contenant l'EDTA à une concentration finale de 2,5 mM. Les suspensions ont été soumises 4 fois à une sonication pendant une minute. Ces manipulations se sont déroulées sur la glace. Une centrifugation à 4 °C (20 min à 3450xg) du produit de sonication a été faite pour éliminer les débris cellulaires.

Dans le cas des souches recombinantes d'*E. coli*, seule la fraction cytoplasmique a été recueillie. Les souches recombinantes ont été incubées en présence de kanamycine jusqu'à ce que la culture atteigne une DO à 600 nm entre 0,6 et 0,8. À ce moment, de l'IPTG (0 à 0,8 mM, concentration finale) était ajouté et la culture se poursuivait par la suite à 25 °C pendant 24 h.

Les cellules ont alors été récoltées par centrifugation (10 min à 4000xg), lavées deux fois avec une solution de saline (0,9 % NaCl) et remises en suspension dans le tampon A supplémenté avec l'EDTA à une concentration finale de 2,5 mM. Le tampon A contenait 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl à pH 8. La rupture des cellules a été réalisée par sonication (4 fois, 10 sec d'impulsion) sur de la glace. Après centrifugation à 4000xg, pendant 30 min, à 4 °C, le surnageant a été récupéré et filtré successivement à travers les filtres de 0,4 µm puis de 0,2 µm. La fraction récupérée a été conservée à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

2.11 Purification de la protéine Sub1

La colonne d'affinité Ni-NT (cOmpleteHis-Tag purification column) (Roche) a été utilisée pour la purification de la protéine recombinante Sub1 avec une étiquette de six histidines de la fraction cytoplasmique d'une culture d'*E. coli* Shuffle-T7-pET-*sub1*. La purification a été faite dans les conditions natives selon le protocole fourni par la compagnie Roche. Les tampons utilisés au cours de la purification sont le tampon A (voir section 2.10) et le tampon B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8).

Un gradient de 5 à 250 mM d'imidazole, obtenu en mélangeant le tampon A au tampon B en diverses proportions, a été utilisé pour le lavage de la colonne et l'élution des protéines avec une étiquette His. Les protéines ont été séparées sur gel (SDS-PAGE) comme décrit par Komeil *et al.* (2014) avec quelques modifications. Chaque échantillon contient 9 µl de l'extrait protéique et 3 µl du tampon bleu (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 50 % [v/v] glycérol; 10 % [w/v] SDS, 20 % [v/v] β-mercaptoéthanol, et 0,1 % [w/v] bleu de bromophénol). Les échantillons ont été bouillis à 100 °C pendant 5 min pour dénaturer les protéines, puis déposés dans l'appareil d'électrophorèse ayant un tampon de migration contenant 30,3 g Tris-base, 144 g de glycine et 10 g de SDS pour un volume final de 1 litre et un pH 8,3. L'électrophorèse s'est déroulée à 70 volts jusqu'à ce que la séparation des protéines ait débuté et à 120 volts par la suite pendant environ 60 minutes. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie R -250 (Bio-Rad) selon le protocole de Lauzier *et al.* (2008). La taille des bandes sur le gel a été estimée à partir de l'échelle du marqueur du poids moléculaire « PageRuler™ Prestained Protein Ladder » (Thermo Scientific, Ottawa, Canada) qui a comigré dans le gel d'électrophorèse. Les fractions qui contenaient la protéine Sub1 purifiée ont été récupérées et amalgamées. Une dialyse de ces fractions amalgamées dans un tampon phosphate a été faite afin de se débarrasser de l'imidazole qui peut nuire à l'activité de l'enzyme.

2.12 Visualisation et quantification des protéines

La production de l'estérase Sub1 par les souches recombinantes a été vérifiée par la mesure de l'activité estérasique des protéines extracellulaires et de l'extrait cytoplasmique (voir section 2.13) et par l'observation du gel de protéines. Une migration sur gel (10 % [w/v] SDS-PAGE) des extraits cytoplasmiques et extracellulaires et de la protéine Sub1 purifiée a été effectuée, comme décrite à la section 2.11, pour visualiser les bandes correspondantes aux tailles prévues de la protéine Sub1.

La concentration en protéines des extraits cytoplasmiques et extracellulaires et de la protéine Sub1 purifiée a été mesurée par la méthode de Bradford (1976). L'absorbance à 595 nm du mélange réactionnel de chaque échantillon a été mesurée après 5 min d'incubation à température de la pièce. Une courbe standard de l'albumine de sérum bovin a été effectuée afin de convertir l'absorbance en une concentration en protéines.

2.13 Dosage de l'activité estérasique

L'activité estérasique a été estimée par la mesure de l'absorbance à 420 nm du *para*-nitrophénol qui est un produit de l'hydrolyse de la liaison ester de différents substrats *p*-nitrophényl butyrate (C4), *p*-nitrophényl octanoate (C8), *p*-nitrophényl decanoate (C10) et *p*-nitrophényl dodécanoate (C12) (Sigma-Aldrich) sous l'action des estérases. Le coefficient d'absorption du *para*-nitrophénol déterminé dans du Tris-HCl 20mM pH 7,5 à température de la pièce était de $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'expérience a été réalisée comme décrite par Komeil *et al.* (2013) avec quelques modifications. Dans une cuvette en plastique de 1,5 ml, 970 μl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 (contenant ou non 0,5 % Triton X-100) (Sigma-Aldrich) étaient mélangées avec 20 μl du réactif (la protéine Sub1 purifiée et diluée 100X dans le tampon Tris-HCl ou bien l'extrait cytoplasmique brut) et avec 10 μl du substrat à 20 mM (concentration finale 0,2 mM). Les mesures de l'absorbance à 420 nm ont été prises à la température de la pièce, pendant une minute, à des intervalles de 10 secondes. Pour le témoin négatif, l'enzyme Sub1 a été remplacée par un même volume de tampon Tris-HCl. La variation de l'absorbance à 420 nm a été lue en soustrayant la valeur associée au témoin négatif. Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de *para*-nitrophénol par minute, dans les conditions de l'expérience.

2.14 V_{max} et K_m de la protéine Sub1 pour le substrat *p*-nitrophényl butyrate (PNB)

Le V_{max} et le k_m de la protéine Sub1 ont été mesurés en dosant l'activité estérasique de la protéine en présence de différentes concentrations du substrat C4 tel que décrit à la section 2.13. Le logiciel Graphpad prism (version 7.03) a été utilisé pour déterminer le k_m et le V_{max} selon l'équation de Michaelis-Menten.

2.15 L'action de la protéine Sub1 sur le polyéthylène téréphtalate (PET)

L'hydrolyse des liens esters du polyéthylène téréphtalate (PET, Sigma Aldrich) par des estérases libère l'éthylène glycol et l'acide téréphtalique; ce dernier a une absorbance maximale à 240 nm. L'action de l'estérase Sub1 sur le PET a été estimée par le dosage de l'acide téréphtalique libéré dans la solution selon le protocole de Nimchua *et al.* (2008) avec les modifications suivantes. Dans cette expérience, chaque tube Eppendorf contenait 10 mg de PET sous forme de granules broyées en petites particules ou de fibres, 1 ml du tampon Tris-HCl à 20 mM pH 7,5 (avec ou sans 0,5 % de Triton X-100), ainsi qu'une quantité de l'enzyme Sub1 (1,5 ou 3 μ g). Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 15 jours. Après centrifugation des tubes pendant une minute à 13000xg, le surnageant a été récupéré puis utilisé dans le dosage de la quantité d'acide téréphtalique libérée. Des cuvettes en quartz de 400 μ l ont été utilisées pour faire les mesures de l'absorbance à 240 nm. Chaque cuvette contenait 350 μ l du tampon Tris-HCl et 50 μ l du surnageant. Pour convertir l'absorbance obtenue à 240 nm en une concentration d'acide téréphtalique (mM), une courbe d'étalonnage de l'acide téréphtalique a été établie dans les mêmes conditions.

2.16 Action de l'estérase Sub1 sur la subérine contenue dans le périderme de pomme de terre (PS ou PSS) et sur la cutine

Pour tester l'effet de l'estérase Sub1 sur la cutine et la subérine contenue dans les substrats PS et PSS, ces derniers ont été exposés à l'enzyme Sub1 pendant plusieurs jours. Un dosage colorimétrique des monomères d'acides gras libérés a été effectué. L'incubation a été faite dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Chaque tube contenait 10 mg de biopolymère, 350 µl du tampon Tris-HCl et 50 µl de l'enzyme Sub1 (15 µg de Sub1). Pour les témoins négatifs, la quantité de l'enzyme a été remplacée par le tampon Tris. Les tubes ont été incubés pendant 20 jours à une température ambiante. Puis, un dosage colorimétrique de monomères d'acides gras libérés a été effectué à l'aide du kit «Free Fatty Acid Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit » (BioVision) selon les recommandations du manufacturier. La quantité d'acides gras mesurée dans chaque puits a été calculée en soustrayant la valeur associée au témoin négatif. Une courbe d'étalonnage de l'acide palmitique a été établie afin de convertir les valeurs de l'absorbance à 570 nm en nM d'acide gras. L'expérience a été réalisée en triplicata.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Clonage du gène *sub1* de *S. scabies* EF-35 dans pFDES-D1-7 et transformation des plasmides recombinants dans *S. lividans*

Les produits de la PCR du gène *sub1* ont été clonés dans le plasmide pFDES-D1-7. Le séquençage des amplicons a permis de sélectionner les vecteurs qui ont reçu les bons amplicons. Les deux constructions plasmidiques (pFDES-D1-7*sub1* et pFDES-D1-7*sub1*-psig) ont été obtenues. La transformation des vecteurs recombinants ainsi que le plasmide vide (pFDES-D1-7) a réussi aussi bien dans *S. lividans* TK24 que dans *S. lividans* 10-164.

L'extrait protéique cytoplasmique et le surnageant d'une culture de 48 heures des six transformants de *S. lividans* ont été analysés par SDS-PAGE (10 % [w/v] SDS-PAGE). À partir de séquences en acides aminés de la protéine recombinante Sub1, le logiciel « Protein Calculator v3.4 » prédit que la masse moléculaire de cette estérase avec l'étiquette His est de 19,6 KDa sans la séquence du peptide signal et de 21,35 KDa avec le peptide signal. Cependant, la migration sur gel n'a pas révélé la présence de bandes additionnelles au voisinage des protéines ayant une taille entre 19 et 22 KDa et ce pour tous les transformants de *S. lividans* portant le gène *sub1* par rapport à celui qui ne contient pas le gène *sub1* (Fig. 15).

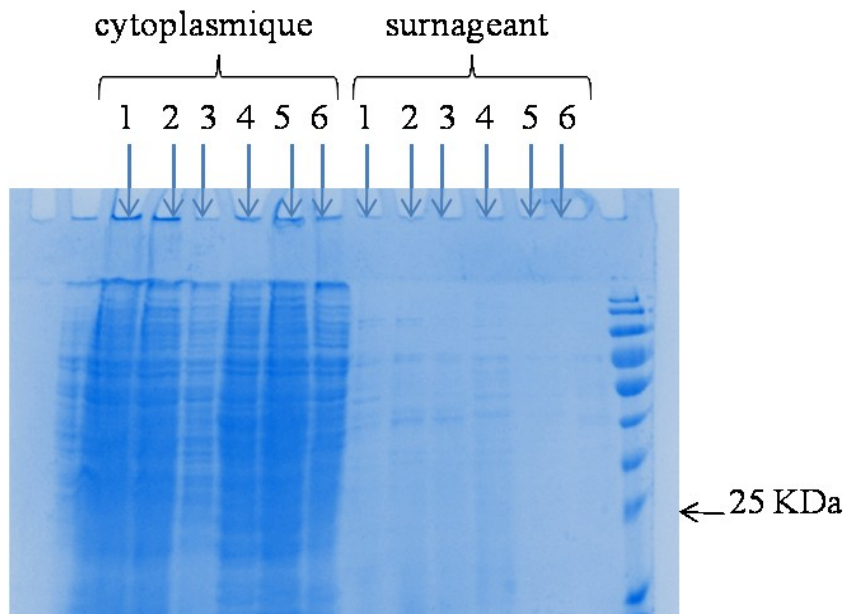


Figure 15. Séparation sur gel SDS-PAGE des protéines extracellulaires et de l'extrait cytoplasmique de souches de *S. lividans* transformées avec un vecteur portant ou non le gène *sub1* de *S. scabies*. 1, *S. lividans* 10-164 pFDES-D1-7; 2, *S. lividans* 10-164 pFDES-D1-7-*sub1*; 3, *S. lividans* 10-164 pFDES-D1-7-*sub1*-psig; 4, *S. lividans* TK24 pFDES-D1-7; 5, *S. lividans* TK24 pFDES-D1-7-*sub1*; et 6, *S. lividans* TK24 pFDES-D1-7-*sub1*-psig. Les puits de gauche contiennent les extraits cytoplasmiques alors que les puits de droite contiennent le surnageant des cultures. Le dernier puits contient le marqueur de poids moléculaire (4-20 % Tris-glycine SDS-PAGE, Fisher Scientific).

3.2 Clonage du gène *sub1* de *S. scabies* EF-35 dans le vecteur pET-30a (+) et transformation des plasmides recombinants dans *E. coli* Shuffle T7

Le gène *sub1* a été cloné dans le vecteur pET et transféré dans *E. coli* DH5 α . Après séquençage des plasmides de plusieurs colonies recombinantes, les plasmides d'intérêt ont été sélectionnés et véhiculés dans *E. coli* Shuffle T7.

Un gel SDS-PAGE de l'extrait cytoplasmique des cultures de 12 heures après induction d'*E. coli* Shuffle T7 transformées a révélé une bande épaisse et dense au voisinage de 25 KDa d'*E. coli* Shuffle-T7pET-*sub1* et non pas dans celui du témoin négatif *E. coli* Shuffle-T7pET (Fig. 16). La taille prédite par le logiciel « Protein Calculator » de la protéine Sub1 avec une étiquette His est de 23 KDa. Même sans induction par l'IPTG, il y avait présence de cette bande. Après induction, l'épaisseur de la bande augmentait selon la concentration de l'inducteur (Fig. 16).

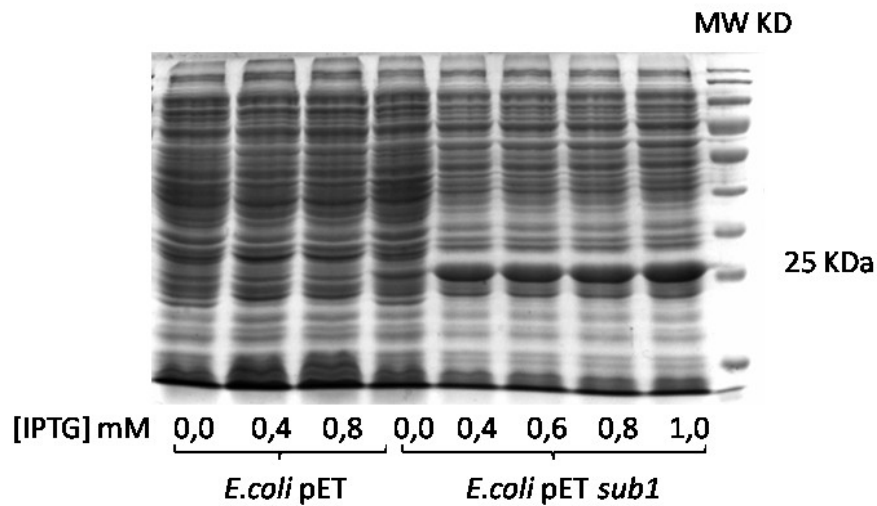


Figure 16. SDS-PAGE de l'extrait cytoplasmique d'*E. coli* Shuffle-T7, transformé avec le vecteur pET portant ou non le gène *sub1* de *S. scabies*, obtenu après une induction avec différentes concentrations d'IPTG. Les puits de gauche contiennent l'extrait cytoplasmique des *E. coli* pEt alors que les puits de droite contiennent l'extrait cytoplasmique des *E. coli* pET-*sub1*. MW, marqueur de poids moléculaire.

3.3 Dosage de l'activité estérasique du surnageant et de l'extrait cytoplasmique des transformants de *S. lividans*

L'activité estérasique des surnageants et des extraits cytoplasmiques des transformants de *S. lividans* a été déterminée. La plus grande activité estérasique a été retrouvée dans le surnageant de *S. lividans* 10-164 pFDES-D1-7-*sub1*-psig (Fig. 17). Le surnageant de la souche *S. lividans* TK-24 pFDES-D1-7-*sub1* a montré une activité enzymatique significativement plus importante que celui de la souche qui contenait le gène *sub1* avec la partie codante pour le peptide signal extracellulaire et que la souche qui ne contenait pas le gène *sub1* (Fig. 17).

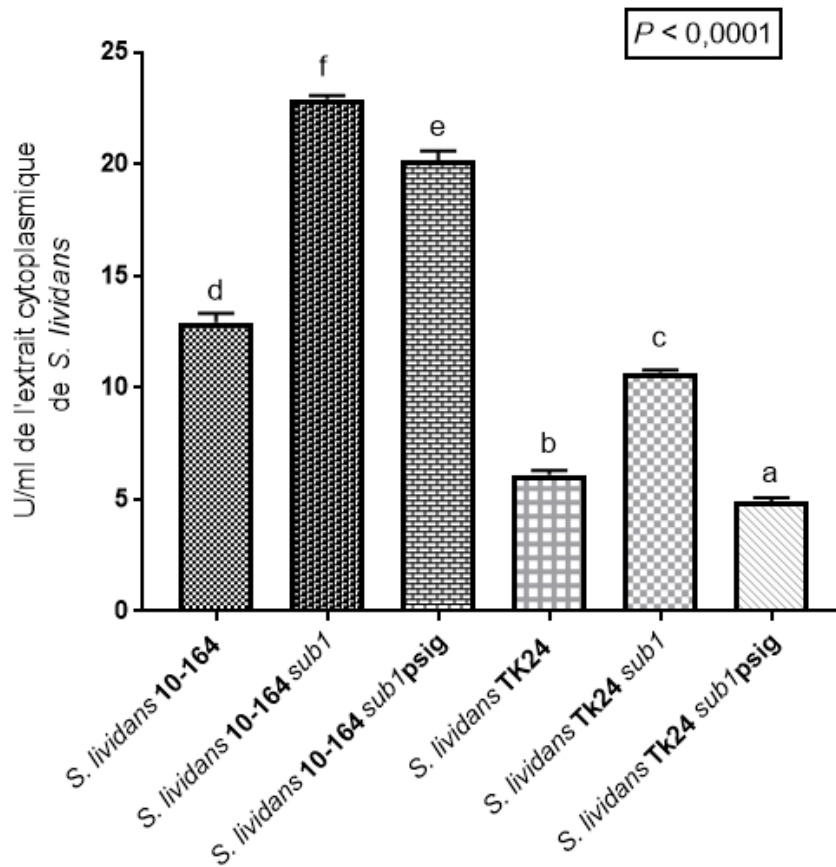


Figure 17: Mesure de l'activité estérasiq ue du surnageant de deux souches de *S. lividans* transformées avec des plasmides portant ou non le gène *sub1* de *S. scabies*. Les résultats présentent une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre représentent des valeurs qui ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

Au niveau des extraits cytoplasmiques, une activité estérasiq ue plus élevée a été associée aux transformants de *S. lividans*10-164 qu'à ceux de *S. lividans* TK-24 (Fig. 18). La présence du peptide signal corrélait avec une réduction de l'activité chez les deux souches (Fig. 18).

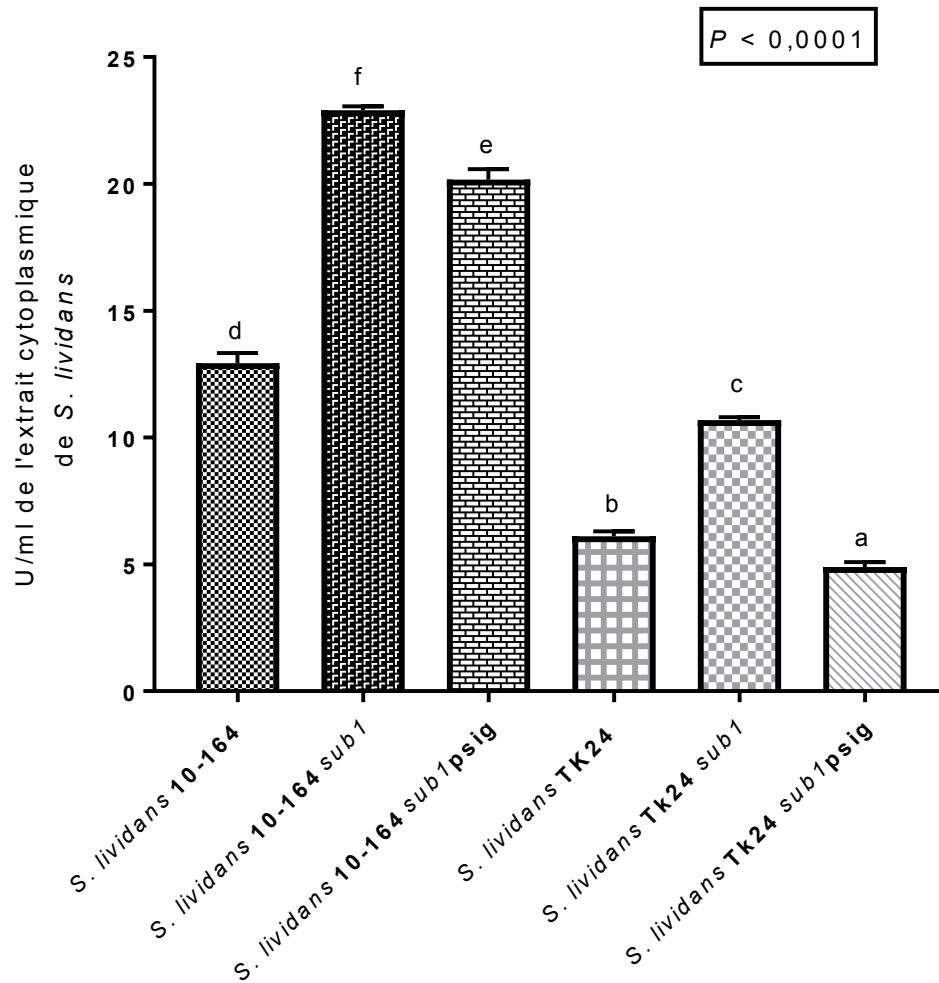


Figure 18. Mesure de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique de deux souches de *S. lividans* transformées avec des plasmides portant ou non le gène *sub1* de *S. scabies*. Les résultats présentent une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre représentent des valeurs qui ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

3.4 Dosage de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique des transformants d'*E. coli* Shuffle-T7

L'activité estérasique des extraits cytoplasmiques des transformants d'*E. coli* a été déterminée. Une activité estérasique d'environ 42 fois plus importante a été retrouvée dans l'extrait cytoplasmique de la souche d'*E. coli* ShuffleT7-pET*sub1* que dans celui d'*E. coli* Shuffle-T7-pET (Fig. 19). Même sans une induction par l'IPTG, l'extrait cytoplasmique d'*E. coli* Shuffle-T7-pET*sub1* a montré une activité estérasique plus importante que la souche témoin. L'effet de l'induction à l'IPTG sur l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique n'a été pas très prononcé lorsque le mélange réactionnel était incubé pendant 30 minutes (Fig. 19). Toutefois, l'effet de l'induction a été remarquable lorsque le mélange réactionnel était incubé pendant 5 minutes. En effet, l'activité estérasique augmentait significativement avec l'accroissement de la concentration de l'inducteur jusqu'à la valeur de 0,8 mM d'IPTG.

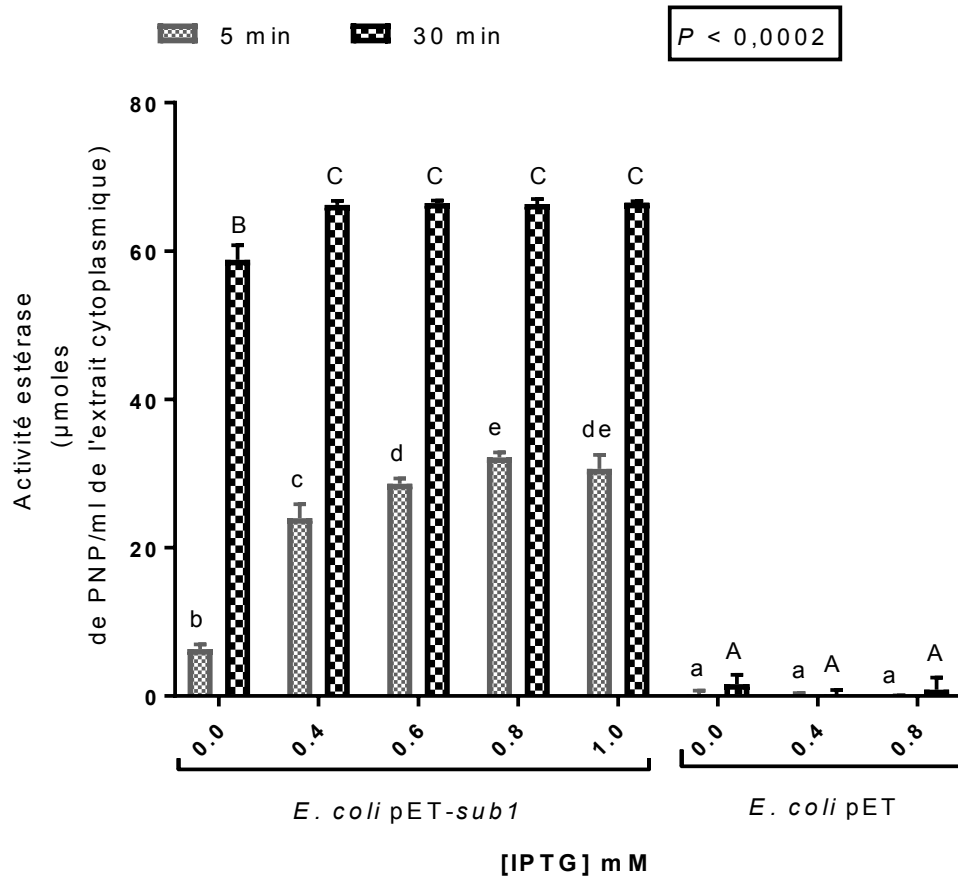


Figure 19. Mesure de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique d'une souches de *E. coli* Shuffle T7 transformées avec des plasmides portant ou non le gène *sub1* de *S. scabies*. Les résultats présentent une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre représentent des valeurs qui ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

3.5 Purification de la protéine recombinante His6-Sub1

La colonne d'affinité Ni-NT (cOmplete His-Tag) a été utilisée pour la purification de la protéine recombinante Sub1 à partir de l'extrait cytoplasmique de la souche *E. coli* Shuffle-T7-pET-*sub1*. En comparant le profil de migration sur gel (SDS-PAGE) de l'extrait cytoplasmique brut et du flow-through (Fig. 20, puits 2 et 3.), il semble que la colonne utilisée ait fixé la quasi-totalité de la protéine recombinante Sub1 puisque la bande qui correspond à la protéine Sub1 avec l'étiquette His (25 KDa) était bien visible dans le profil protéique de l'extrait cytoplasmique brut et non présente dans le profil du flow-through. La présence d'imidazole dans le tampon de lavage et d'élution a permis le décrochage des protéines avec étiquette His de la colonne d'affinité. Aux concentrations variant de 4 à 10 mM d'imidazole, les tampons d'élution libéraient la majorité de protéines contaminantes et une faible quantité de la protéine Sub1 (Fig. 20, puits 4, 5, 6 et 7). Le tampon à 50 mM d'imidazole permettait d'éluer une quantité importante de la protéine d'intérêt sans présence notable de protéines contaminantes (Fig. 20, puits 8). L'élution avec le tampon 200 mM d'imidazole ne contenait pas de quantités détectables de protéines recombinantes (Fig. 20, puits 9). Une analyse par spectrométrie de masse effectuée à la plateforme protéomique du Centre de génomique de Québec (Canada) a confirmé que la protéine de 25 KDa qui a été purifiée correspondait bel et bien de la protéine Sub1.

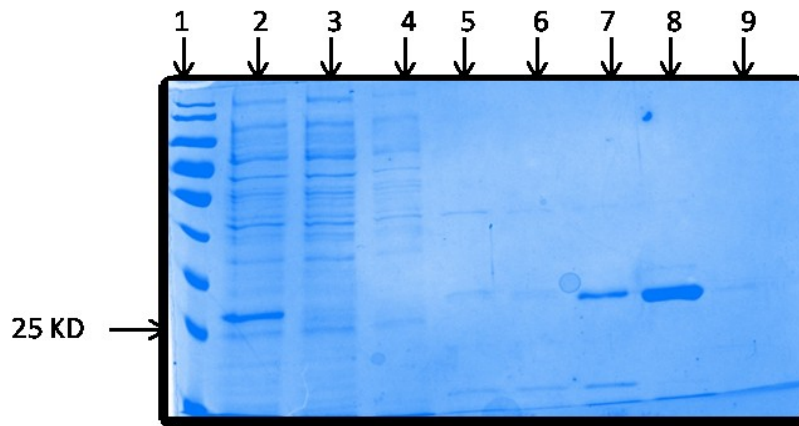


Figure 20. SDS-PAGE des protéines cytoplasmiques d'*E. coli* Shuffle pET*sub1* après fractionnement sur la colonne d'affinité (IMAC). Puits 1, le marqueur du poids moléculaire; puits 2, l'extrait cytoplasmique brut; puits 3, flow-through; puits 4, protéines libérées après un lavage avec le tampon A; puits 5 à 9, protéines libérées avec un gradient d'imidazole de 4, 5, 10, 50 et 200 mM, respectivement.

L'efficacité de la purification a été estimée par la mesure de l'activité estérasique de l'extrait cytoplasmique brut et de la protéine Sub1 purifiée. L'activité enzymatique de l'estérase Sub1 purifiée (22,95 U/ml) était d'environ 52 fois supérieure à celle de l'extrait brut (0,44U/ml).

3.6 Action de la protéine Sub1 sur des dérivés *p*-nitrophényl d'esters d'acides gras

Le dosage de l'activité estérasique de la protéine Sub1 sur plusieurs dérivés *p*-nitrophényl d'esters d'acides gras de chaînes carbonnées de différentes longueurs a été faite en absence ou en présence du surfactant non ionique (Triton X-100). L'enzyme montrait une activité plus

importante pour le *p*-nitrophényl butyrate (C4) et le *p*-nitrophényl octanoate (C8) que pour les substrats ayant une chaîne à 10 ou 12 carbones et ce en présence ou en absence de Triton X-100 (Fig. 21). L'activité maximale (22,95 U/nmole de Sub1; 616,40 U/mg de protéine) a été obtenue sur le substrat (C4) en présence de Triton X-100. La présence de Triton X-100 toutefois augmentait l'activité entre 2,4 et 7,4 fois pour tous les substrats testés (Fig. 21).

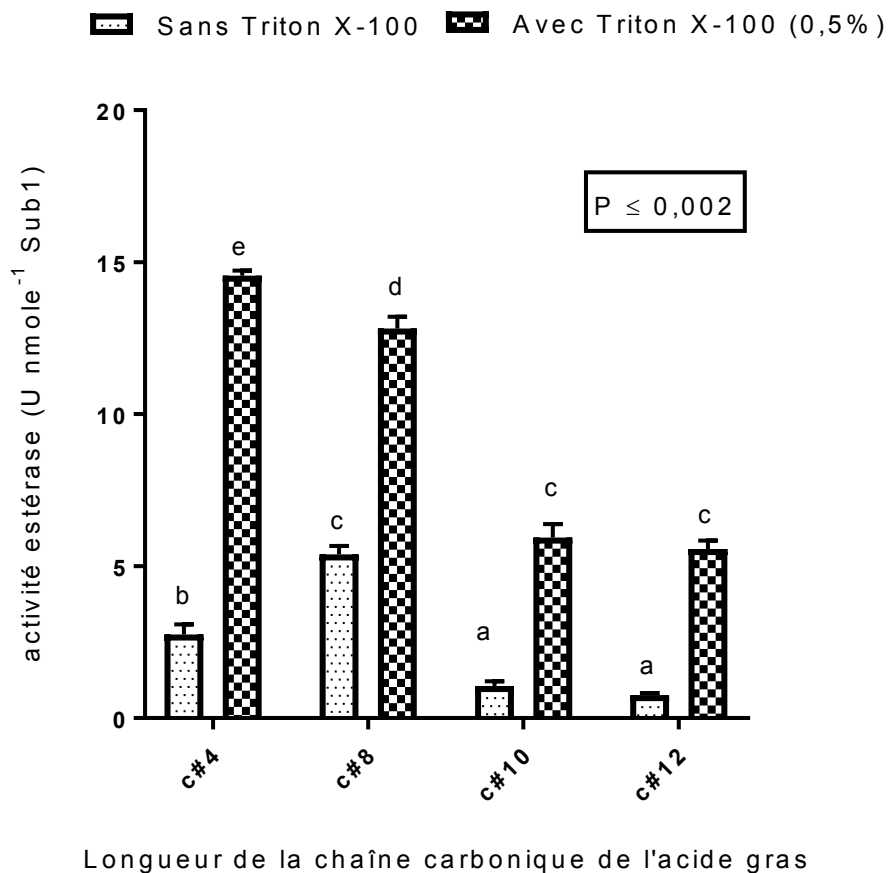


Figure 21. Effet de la longueur de la chaîne carbonée du substrat et de la présence d'un surfactant sur l'activité estérasique de l'enzyme Sub1. Les données sont une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

3.7 Détermination du V_{max} et k_m de l'estérase Sub1 pour le substrat *p*-nitrophényl-butyrates

La figure 22 illustre la variation de la vitesse initiale (V_i) de la réaction d'hydrolyse en fonction de la concentration du substrat (PNB). La vitesse V_i augmentait en fonction de l'accroissement de la concentration du substrat. La courbe s'apparentait à la courbe typique de Michaelis-Menten, sauf aux concentrations de PNB supérieures à 1 mM où la vitesse baissait brutalement (résultats non montrés). Les valeurs estimées selon l'équation de Michaelis-Menten étaient un V_{max} de $55,8 \pm 2,0$ U/nmole de Sub1 ($2361 \pm 84,5$ U/mg Sub1) et un k_m de $0,57 \pm 0,04$ mM de PNB.

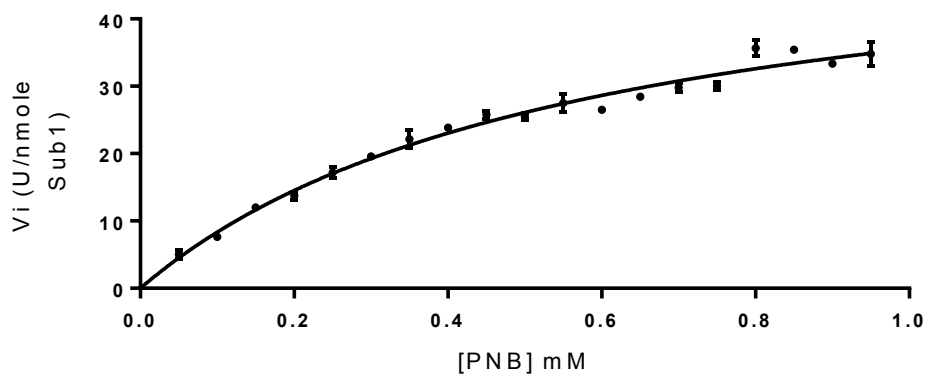


Figure 22. Effet de la concentration du substrat (PNB) sur la vitesse initiale (V_i) de la réaction d'hydrolyse par l'estérase Sub1. Les données sont une moyenne de trois répétitions.

3.8 Action de la protéine Sub1 sur le polyéthylène téréphtalate (PET)

La libération d'acide téréphtalique (TA) suite à une exposition du polyéthylène téréphtalate (PET) à l'action de l'estérase Sub1 (Fig. 23) démontrait la capacité de l'enzyme à hydrolyser les liens esters de ce substrat synthétique. Le substrat PET sous forme de granules broyées apparaissait plus accessible à l'attaque de l'estérase Sub1 que les fibres, puisque la quantité d'acide téréphtalique libérée à partir des granules broyées était au moins 3,5 fois supérieure que celle libérée à partir des fibres (Fig. 23). L'ajout du Triton X-100 dans le mélange réactionnel favorisait la réaction d'hydrolyse des liens esters du PET et l'effet était plus marqué lorsque le PET était sous forme de fibres. En effet, la présence du Triton X-100 dans le mélange réactionnel augmentait la quantité de TA libérée d'environ 2,7 fois pour les granules broyées et plus que 41 fois pour les fibres (Fig. 23)

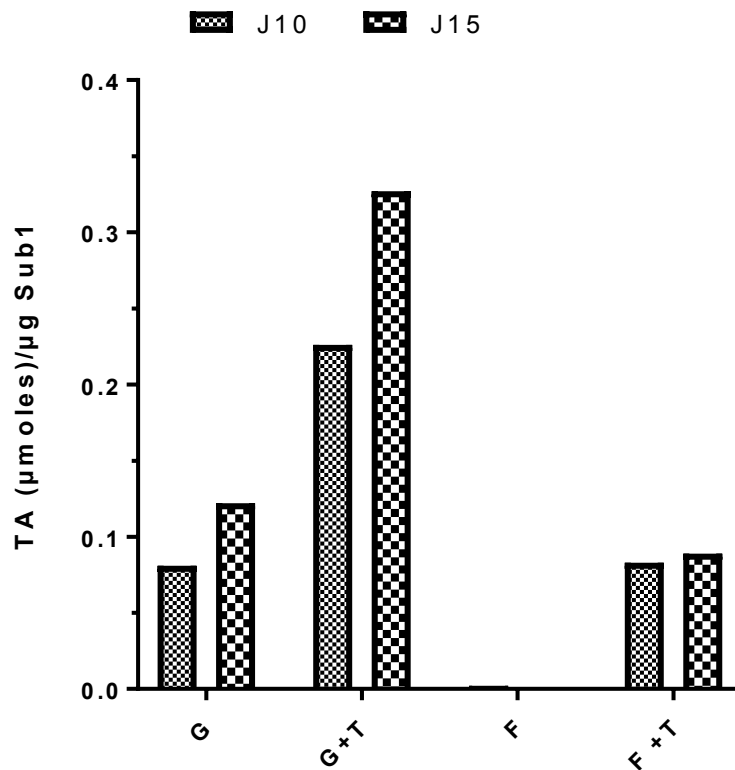


Figure 23. Mesure de la quantité d'acide téréphtalique (TA) libéré par hydrolyse du polyéthylène téréphtalate (PET) sous l'action de l'enzyme Sub1. Les mesures ont été prises après 10 et 15 jours d'incubation à 37 °C du PET avec 10 μl (2,96 μg) de l'estérase Sub1. Les réactions enzymatiques ont été faites sur des granules broyées de PET(G), des fibres de PET (F). L'effet de l'ajout de Triton X-100 à une concentration de 0,5% sur l'activité de l'enzyme a aussi été testé sur les granules broyées de PET (G+T) et sur les fibres de PET (F+T). Les données sont d'une seule mesure expérimentale.

Après 15 jours d'incubation du PET avec l'estérase Sub1, la quantité d'acide téréphtalique libérée sous l'action de 5 μl (1,5 μg) de l'enzyme Sub1 dans le mélange réactionnel est significativement inférieure à celle libérée sous l'action de 10 μl (3,0 μg) de l'enzyme (Fig. 24). La quantité d'acide téréphtalique libérée augmente avec le temps d'incubation. Ce

prouve que l'enzyme Sub1 reste encore actif même après 20 jours d'incubation à 37 °C (Fig. 24).

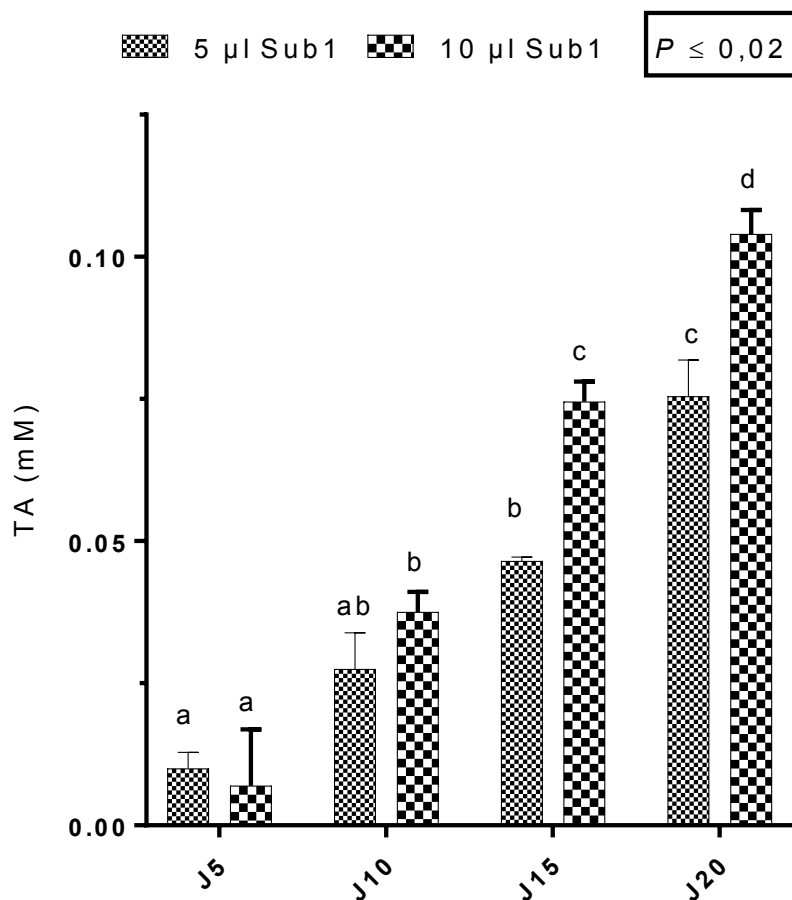


Figure 24. Mesure de la concentration de l'acide téréphtalique (TA) libéré par hydrolyse du polyéthylène téréphtalate (granules broyées) sous l'action de l'enzyme Sub1. Les mesures ont été prises après 5 à 20 jours incubation du PET à 37 °C en présence de 5 µl (1,48 µg) et 10 µl (2,96 µg) de l'enzyme Sub1. Les données sont une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

3.9 Action de l'estérase Sub1 sur la subérine contenue dans le périderme de pomme de terre (PS ou PSS) et sur la cutine

La capacité de l'estérase Sub1 à hydrolyser des liens esters et à libérer des acides gras à partir de la cutine et de péridermes de pomme de terre enrichis de subérine (PS et PSS) a été déterminée (Fig. 25). L'estérase Sub1 n'était pas apte à libérer des acides gras du substrat PS (Fig. 25). Toutefois, l'enzyme présentait une activité sur la cutine et le substrat PSS. La quantité d'acides gras libérée à partir de la cutine (2,08 nmoles d'acides gras/mg Sub1) était presque le double de celle relâchée à partir de PSS (0,93 nmoles d'acides gras/mg Sub1).

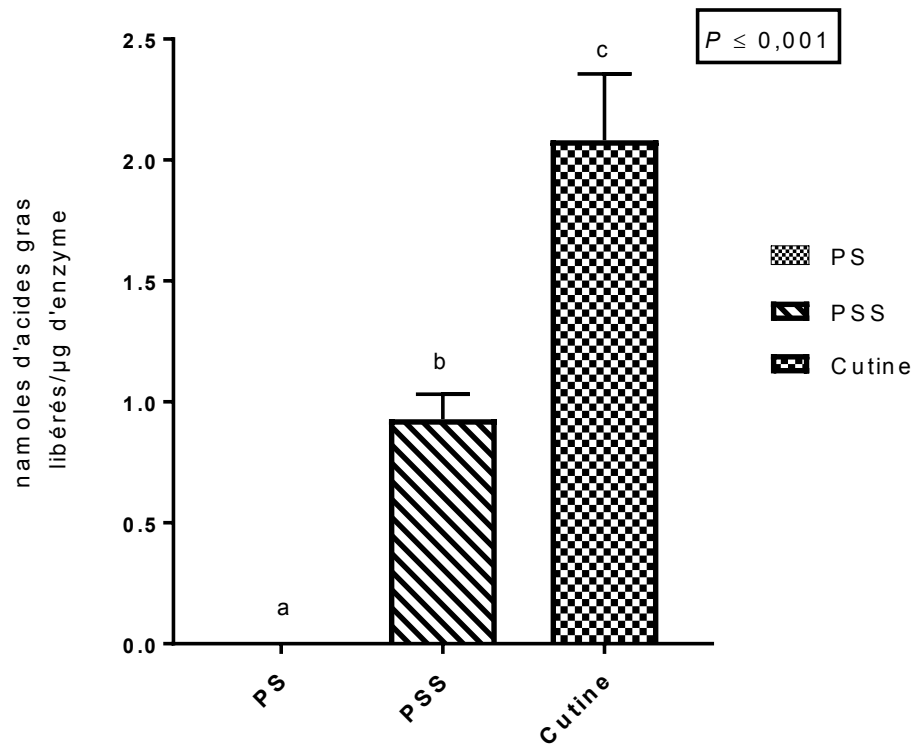


Figure 25. Dosage colorimétrique des acides gras libérés à partir des biopolymères exposés à l'estérase Sub1 pendant 20 jours d'incubation à température de la pièce. PS: périoderme enrichi de subérine, PSS: périoderme enrichi de subérine et exposé 60 jours en présence de *Streptomyces scabies* EF-35. Les données sont une moyenne de trois répétitions. Les barres accompagnées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test LSD).

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Komeil *et al.* (2013) avait prédit que la protéine Sub1 était une estérase appartenant à la classe des sérine estérases contenant la triade catalytique (sérine, histidine, aspartate) avec une sérine active dans la séquence consensus Gly-His/Tyr-Ser-X-Gly (Martinez *et al.*, 1994). Ici, le gène *sub1* de *S. scabies* a été amplifié par PCR et cloné dans deux vecteurs d'expression, pFDES-D1-7 et pET. Par la suite les plasmides porteurs du gène d'intérêt, ont été transformés dans *S. lividans* et *E. coli* Shuffle-T7 respectivement. Le dosage de l'activité esterasique du surnageant et de l'extrait cytoplasmique des cultures de *S. lividans* et d'*E. coli* transformés a révélé une forte activité esterasique de l'extrait cytoplasmique de la culture bactérienne d'*E. coli*, par rapport aux autres cultures. Ce résultat a été confirmé par un gel SDS-PAGE du surnageant et de l'extrait cytoplasmique de ces cultures qui a montré une bande épaisse, correspondante à la taille prédite de la protéine Sub1 au niveau du puits contenant l'extrait cytoplasmique d'*E. coli* pET-*sub1*, induite par 1mM d'IPTG. Cette souche a donc été utilisée par la suite pour la production hétérologue intracellulaire de l'enzyme Sub1. D'autres études ont également reporté l'expression hétérologue d'estérases bactériennes dans *E. coli* (Chen *et al.*, 2008; Ribitsch *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2013) dont l'estérase EstA de *S. scabies* FL1 qui est sécrétée par l'agent pathogène lors d'une croissance en présence de subérine (McQueen et Schottel, 1987). Par la suite, l'enzyme Sub1 a été purifiée et caractérisée. L'estérase Sub1 est constituée de 213 résidus dont 28 acides aminés qui forment le peptide signal. Sub1 mature à un poids moléculaire prédit de 18,63 KDa sans le peptide signal et de 21,35 KDa avec la portion du peptide signal. Le poids moléculaire de Sub1 recombinante purifiée, estimé à partir de la migration sur gel SDS-PAGE, était au voisinage de 25 KDa. Sub1 a un poids moléculaire inférieur à l'estérase EstA de *S. scabies* FL1 (36 KDa) (McQueen et Schottel, 1987) ainsi qu'à

d'autres estérases d'actinobactéries telles les cutinases Tfu-0882 et Tfu-0883 de *Thermobifida fusca* (29 KDa) (Chen *et al.*, 2008). Il apparaît que la taille de Sub1 est inférieure à celles de la majorité des estérases bactériennes et plus proche de celles des cutinases fongiques : CcCut1 de *Coprinopsis cinerea* (18,8 KDa) (Kontkanen *et al.*, 2009), CutA de *Botrytis cinerea* (18 KDa) (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997), les deux cutinases d'*Alternaria brassicicola* (23 et 21 KDa, respectivement) (Trail et Köller, 1993), la cutinase de *Fusarium solani* (22 KDa) (Carvalho *et al.*, 1998).

L'enzyme Sub1, qui montre une action d'hydrolyse sur les liens esters des *p*-nitrophenyl esters, a plus d'activité sur les *p*-nitrophenyl esters avec des chaînes carbonnées courtes comme le *p*-nitrophényl butyrate (C4) et le *p*-nitrophényl octanoate (C8) que sur les substrats ayant une chaîne à 10 ou 12 carbones. Comme l'enzyme Sub1, plusieurs autres estérases sont plus actives sur les acides gras à courtes chaînes carbonnées (Purdy et Kolattukudy, 1973). Par exemple, la cutinase CcCUT1 du champignon phytopathogène *Fusarium solani*, qui présente une similarité de séquence relativement élevée avec Sub1 (Komeil *et al.*, 2013), a une activité estérasique plus élevée sur les esters à courtes chaînes carbonnées (C2 à C10 mais surtout C2 et C3) que sur les esters à longues chaînes (C16 et C18) (Kontkanen *et al.*, 2009). Il semble que les liens esters soient plus accessibles à l'attaque enzymatique pour les esters à courtes chaînes carbonnées que pour les esters à longues chaînes.

L'ajout de Triton X-100, un détergent non ionique, augmente nettement l'action d'hydrolyse de Sub1 sur les *p*-nitrophényl esters. Ce résultat est intrigant. Alors que l'ajout d'un tel détergent augmente généralement l'activité des lipases, ce n'est pas le cas pour la plupart des cutinases. Par exemple, le produit de l'action d'hydrolyse de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* sur le polyester bis -(benzoyloxyethyl) téréphtalate (3PET) est en quantité sept fois plus importante en présence du Triton X-100 qu'en son absence, alors que le Triton X-100

n'a pas amélioré l'activité hydrolytique des cutinases de *Thermobifida fusca* et *Fusarium solani* (Eberl *et al.*, 2009). L'ajout d'un détergent comme le Triton X-100 dans le mélange réactionnel améliorerait l'activité des lipases en favorisant l'ouverture d'un couvercle peptidique couvrant le site actif des lipases; couvercle qui n'est pas retrouvé chez les cutinases (Eberl *et al.*, 2009; Kontkanen *et al.*, 2009). La protéine Sub1 est une cutinase comme le démontre son activité sur la cutine (ce travail) et sa grande similitude dans sa structure linéaire et sa structure tridimensionnelle avec les cutinases fongiques et bactériennes (Komeil *et al.*, 2013 et ce travail) (voir la section 1.6 de l'introduction). Cependant, contrairement à la plupart des cutinases, la présence du Triton X-100 dans le milieu réactionnel augmente remarquablement l'activité enzymatique de Sub1 pour les substrats *p*-nitrophényl esters (ce travail), alors que sa présence est sans effet sur l'hydrolyse de la cutine par Sub1 (résultat non montré). Similairement, l'ajout du Triton X-100 (0.1 %) dans le mélange réactionnel n'a pas d'effet sur la réaction d'hydrolyse de la cutine par la cutinase CcCUT1, toutefois, il a augmenté remarquablement la quantité d'acides gras libérés à partir de la subérine (Kontkanen *et al.*, 2009). On peut émettre l'hypothèse que dans le cas de certaines cutinases telles Sub1, le Triton X-100 augmenterait la solubilité des substrats à hydrolyser, de telle sorte qu'il rend le substrat plus accessible aux enzymes et par conséquent augmente leur activité.

En utilisant le PNB comme substrat, l'enzyme Sub1 a montré une courbe typique de Michaelis-Menten. Le K_m de Sub1 ($5,7 \times 10^{-4} \text{M}$) sur PNB s'apparente à celui des cutinases fongiques y compris les deux cutinases de l'agent phytopathogène *Fusarium solani* pv. *pisi* dont les K_m sont de $3,5 \times 10^{-4} \text{M}$ et $7,5 \times 10^{-4} \text{M}$. Toutefois, en ce qui concerne la puissance de l'enzyme, Sub1 a une vitesse presque deux fois supérieure à celles de ces cutinases fongiques (2,36 vs 1,0 et 1,2 moles/g.min⁻¹) (Kolattukudy *et al.*, 1981). L'estérase EstA de *S. scabiei* FL1 a plus d'affinité pour le substrat PNB que Sub1 puisque son K_m est plus faible ($1,2 \times 10^{-5} \text{M}$), mais l'enzyme Sub1 est de loin plus active que l'estérase de *S. scabiei* FL1 (2,36

vs $1,3 \times 10^{-4}$ moles/g.min⁻¹) (McQueen et Schottel, 1987), une enzyme dont le gène n'est retrouvé que chez quelques souches de *S. scabies* (Komeil *et al.*, 2013).

Étant donné qu'une culture de *S. scabies* peut croître dans un milieu minimal où la seule source de carbone est soit la cutine soit la subérine (Beaulieu *et al.*, 2016; Padilla-Reynaud *et al.*, 2015) et que les surnageants de ces cultures démontraient une activité hydrolytique sur les liens esters du PNB (Beauséjour *et al.*, 1999), il était probable que *S. scabies* produise des cutinases. Komeil *et al.* (2013) avait prédit que la protéine Sub1 présentait une cutinase puisque l'enzyme Sub1 présente une forte homologie de séquences avec des cutinases de mycobactéries pathogènes à l'homme et de certaines espèces de champignons. Par ailleurs, Komeil *et al.* (2013) ont démontré que l'expression du gène *sub1* était induit par la cutine. En se basant sur ces informations et après avoir démontré dans ce travail que l'estérase Sub1 avait une action d'hydrolyse sur la cutine, on peut affirmer que Sub1 est une cutinase.

La méthode classique pour mesurer l'activité cutinase consiste à utiliser la cutine comme substrat et mesurer les monomères d'acides gras libérés dans le milieu réactionnel par hydrolyse sous l'action de l'enzyme. La dégradation de la cutine par l'enzyme Sub1 a été démontrée par un dosage colorimétrique de monomères d'acides gras libérés. La quantité d'acides gras libérés à partir de la cutine, traitée 20 jours par l'enzyme Sub1, était de 2,08 nmoles d'acides gras/mg Sub1. Dans certains cas, le degré d'hydrolyse était exprimé sous forme de ratio entre la quantité de monomères de cutine libérés et la quantité totale du substrat. En comparaison, le surnageant d'une culture de *Thermomonospora fusca* dégradait 7 à 16 % de substrat selon l'origine de la cutine utilisée (Fett *et al.*, 1999). On peut difficilement comparer l'efficacité de la réaction d'hydrolyse de l'enzyme Sub1 sur la cutine avec celles d'autres cutinases dont les dosages ont été effectués par d'autres moyens comme la HPLC et la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) (Kontkanen *et al.*,

2009), par couplage non spécifique de la cutine avec un groupe chromogénique de bleu brillant de Remasol (RBB) et mesure de l'accroissement de l'absorbance à 590 nm causé par les monomères marqués libérés dans le surnageant (Chen *et al.*, 2013), ou l'utilisation de la cutine radioactive marquée au C¹⁴ (Koller et Parker, 1989; Trail et Köller, 1993).

Komeil *et al.* (2013) avait prouvé que la protéine Sub1 présente une similarité de séquence relativement élevée avec la cutinase CcCUT1 du champignon phytopathogène *Fusarium solani*, qui a une action non seulement sur la cutine mais aussi sur la subérine. Ce travail démontre aussi que l'enzyme Sub1 est comme CcCUT1 non seulement une cutinase mais que l'enzyme a une action hydrolytique sur la subérine (PSS). À notre connaissance, l'enzyme Sub1 est la première cutinase bactérienne pour laquelle une action de subérinase a été démontrée.

D'après la littérature scientifique, la dégradation de la subérine est peu documentée. Rares sont les cutinases qui ont montré une activité subérinase mais 10 % de la subérine de pomme de terre a été dégradée après un traitement avec une culture de *Rosellinia desmazieri* au bout de deux mois (Ofong et Pearce, 1994). Dans notre cas, l'enzyme Sub1 n'a pas montré d'effet sur le PS alors qu'elle a libéré une quantité de 10,9 nmoles d'AG/mg Sub1 après 20 jours d'incubation avec le PSS. La figure 24 illustre clairement la différence histologique de la paroi des cellules de périodermes (PS) et (PSS). En effet, avant le traitement par l'agent phytopathogène, les lamelles de la subérine (PS) étaient de part et d'autre accompagnées par une couche épaisse de polysaccharides (Beaulieu *et al.*, 2016). Ces couches sont devenues très minces et avaient même disparu à certains endroits après le traitement. Il semble que dans un milieu minimal où la seule source de carbone est le PS, les bactéries *S. scabies* vont utiliser leur besoin en carbone en priorité à partir des résidus de polysaccharides qui se trouvent dans le périodermes enrichi en subérine (PS). Les lamelles de la subérine seraient donc plus

accessibles à l'enzyme dans le PSS que dans le PS. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi la production de Sub1 par *S. scabies* dans un milieu de culture contenant du PS n'est pas détectée avant 20 jours d'incubation (Beaulieu *et al.*, 2016). Plusieurs enzymes lipolytiques produites par les *Streptomyces* sont inductibles en présence de leur substrat (Large *et al.*, 1999). On ne peut toutefois exclure que le PS puisse contenir des molécules inhibant l'activité de l'enzyme et que la quantité de l'inhibiteur soit moindre dans le PSS.

Les cutinases sont des enzymes multifonctionnelles qui peuvent catalyser les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification. Par conséquent, elles sont largement utilisées dans l'industrie (Carvalho *et al.*, 1998). Le polyéthylène téréphtalate (PET), composé de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol, est un polyester synthétique très utilisé par l'industrie du textile (Eberl *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2005). La dégradation du polyester PET par des cutinases a été aussi mise en évidence à plusieurs reprises (Eberl *et al.*, 2009; Nimchua *et al.* 2007; Ribitsch *et al.*, 2015).

Dans ce travail, on a aussi mis en évidence l'action de l'enzyme Sub1 sur le PET (sous forme de fibres et de granules broyées). La quantité d'acide téréphtalique libérée à partir du polyester PET sous l'action de Sub1 a augmenté progressivement avec le temps d'incubation. Ceci prouve que l'enzyme Sub1 reste encore active même après 20 jours d'incubation confirmant la stabilité de l'activité des cutinases (Dutta *et al.*, 2009). La quantité d'acide téréphtalique libérée à partir des granules broyées, qui ont une structure amorphe, était au moins 3,5 fois supérieure à celle libérée à partir des fibres qui ont une structure plus cristalline. Ce résultat confirme que la capacité de la cutinase à hydrolyser les liaisons esters de surface est grandement affectée par la cristallinité du polymère. Plus la structure est cristalline, plus l'attaque enzymatique est difficile (Vertommen *et al.*, 2005). D'autre part, ce travail confirme aussi que l'ajout du Triton X-100 facilite l'attaque enzymatique du substrat (Eberl *et al.*, 2009;

Silva *et al.*, 2005; Vertommen *et al.*, 2005) puisque la quantité d'acide téréphtalique libéré a augmenté d'au moins 2,7 fois quand on a ajouté du Triton X-100 dans le mélange réactionnel. La bonne activité de Sub1 sur les liaisons esters du PET montre l'application possible de cet enzyme dans l'industrie du textile. Toutefois, il serait intéressant de tester son effet sur d'autres polymères synthétiques à des fins d'application industrielle. Par exemple, le polycaprolactone, un produit entrant dans la composition de certains plastiques et qui par l'action de la cutinase de *Fusarium solani* pv. *pisi* pourrait être biodégradé en produits hydrosolubles (Murphy *et al.*, 1996).

CONCLUSION

Ce travail a permis de purifier et caractériser la protéine codée par le gène *sub1* (Komeil *et al.*, 2013). Par un dosage des acides gras libérés à partir de la cutine et de la subérine sous l'action de l'enzyme Sub1, l'action de cette enzyme sur ces biopolymères a pu être démontrée. Il serait maintenant intéressant d'utiliser des méthodes plus sophistiquées pour le dosage et l'identification des acides gras libérés. Dans ce but, un dosage par HPLC suivi d'une GC-SM par exemple, permettrait de déterminer si, comme le laisse supposer l'étude de Beaulieu *et al.* (2016), certains composés aliphatiques de la subérine seraient plus facilement accessibles ou ciblés que d'autres par l'action de Sub1. Ceci permettrait non seulement de mieux comprendre le processus de biodégradation de la subérine qui est toujours fort mal compris, mais également de déterminer si la composition de la subérine et la proportion des composés aliphatiques de ce constituant, ne permettraient pas de déterminer le niveau de résistance des cultivars de pomme de terre face à l'agent pathogène *S. scabies*. Alors qu'il est connu que la nature des composés phénoliques présents dans la subérine participe au niveau de tolérance des cultivars de pomme de terre (Singhai *et al.*, 2011), aucun travail n'a, à notre connaissance, examiné celui des composés aliphatiques. Toutefois, des variants somaclonaux résistants à la gale commune produisent, en présence de l'agent pathogène, un nombre plus élevé de couches de cellules subérisées dans leur périoderme que les parents (Thangavel *et al.*, 2016).

La subérine apparaît jouer un rôle important dans le pouvoir pathogène. Il a été démontré que la présence de la subérine dans le milieu de culture de *S. scabies* induit remarquablement la production de la thaxtomine A qui est une toxine strictement liée au pouvoir pathogène des actinobactéries (Goyer *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que le gène *sub1* est aussi induit

spécifiquement par la subérine (Komeil *et al.*, 2013) et que l'enzyme Sub1 est une suberinase (ce travail). Le mécanisme cellulaire menant à l'induction des gènes de biosynthèse de la thaxtomine par la subérine n'a pas été élucidé, mais il se peut que Sub1 libère de la subérine un composé chimique qui agisse directement ou indirectement comme inducteur de la biosynthèse de la thaxtomine. Toutefois, le gène *sub1* n'ayant été détecté que chez les espèces phytopathogènes *S. scabies* et *S. bototropensis* et pas chez d'autres organismes causant la gale commune dont *S. acidiscabies* (Komeil *et al.*, 2013), ce gène ne doit donc pas être indispensable au pouvoir pathogène. Il pourrait toutefois participer à la virulence des bactéries en favorisant, par exemple, la colonisation du périderme. Ceci d'autant qu'il a été démontré que la capacité des cultivars résistants à la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* dépendait de leur aptitude à restreindre la colonisation bactérienne dans l'espace et le temps (Caldwell *et al.*, 2017).

Il est connu que *S. scabies* peut survivre pour de nombreuses années dans le sol, et ce même en absence de son hôte (Ensign, 1978). La subérine est un composé très résistant à la dégradation et qui réside de nombreuses années dans les sols (Hamer *et al.*, 2012). La capacité de *S. scabies* à dégrader à tout le moins partiellement la subérine pourrait lui conférer un avantage écologique lui permettant de se maintenir sur de longues périodes dans les sols agricoles.

L'étude de Sub1 n'est pas seulement pertinente du point de vue écologique ou pathologique, le fait que Sub1 est capable d'hydrolyser des polymères synthétiques comme le PET suggère une possibilité d'application de cette enzyme dans l'industrie textile et même la possibilité de l'appliquer dans des réactions d'estérification et de transestérification (Carvalho *et al.*, 1998) telle que pour la production de biodiesel à partir d'esters produits par transestérification d'huiles végétales ou de graisses animales (Dutta *et al.*, 2009; Ejikeme *et al.*, 2010; Ghaly *et*

al., 2010). Étant donné que les cutinases maintiennent davantage leur stabilité et leur activité à des températures élevées et à des pH alcalins que les lipases, les cutinases sont plus demandées dans l'industrie des détergents et de l'hygiène que les lipases (Dutta *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAPHIE

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds. Academic press, San Diago, CA, USA.

Beaulieu, C., Sidibé, A., Jabloun, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Monga, E., & Bernards, M. A. (2016). Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabiei*. *Microbes And Environments*, *31*(4), 427–434.

Beauséjour, J., Goyer, C., Vachon, J., & Beaulieu, C. (1999). Production of Thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Canadian Journal Of Microbiology*, *45*(9), 764–768.

Beisson, F., Li-Beisson, Y., & Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion In Plant Biology*, *15*(3), 329–337.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal Of Antibiotics*, *58*(1), 1–26.

Bernards, M. A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal Of Botany*, *80*(3), 227–240.

Bernards, M. A., & Lewis, N. G. (1998). The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry*, *47*(6), 915–933.

Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajicek, J., & Lewis, N. G. (1995). Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(13), 7382–7386.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 73–81.

Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio and stereoselective biotransformations*, 2nd Edition.

Bouček-Mechiche, Gardan, L., Normand, P., & Jouan, B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France : description of three new species , *S . europaeiscabiei* sp . nov . and *S . stelliscabiei* sp . nov . associated with common scab , and *S . reticuliscabiei* sp . nov . associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*, 91–99.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.

Caldwell, D., Kim, B., & Iyer-Pascuzzi, A. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology*, *107*(5), 528–536.

Carvalho, C. M. L., Aires-barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (1999). Cutinase : from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*, *66*(1), 17–34.

Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology*, *1*(2), 160–173.

Chapleau, M., Guertin, J. F., Farrokhi, A. L. I., Lerat, S., Burrus, V., & Beaulieu, C. (2016). Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *Streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, *17*(4), 501–509.

Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1754–1767.

Chen, S., Tong, X., Woodard, R. W., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(38), 25854–25862.

Cottle, W., & kolattukudy, P. E. (1982). Biosynthesis , deposition , and partial characterization of potato suberin phenolics '. *Plant Physiology*, *69*(2), 393–399.

Dewitt, J. P. (1985). Evidence for a Sex Factor in *Streptomyces erythreus*. *Journal of Bacteriology*, *164*(2), 996–971.

Dubeau, M. P., Poulin-Laprade, D., Ghinet, M. G., & Brzezinski, R. (2011). Properties of CsnR, the transcriptional repressor of the chitosanase gene, *csnA*, of *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, *193*(10), 2441–2450.

Dutta, K., Sen, S., & Veeranki, D. V. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*, *44*(2), 127–134.

Eberl, A., Heumann, S., Brückner, T., Araujo, R., Cavaco-Paulo, A., Kaufmann, F., Guebitz, G. M. (2009). Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *Journal of Biotechnology*, *143*(3), 207–212.

Ejikeme, P. M., Anyaogu, I. D., Ejikeme, C. L., Nwafor, N. P., Egbuonu, C. A. C., Ukogu, K., & Ibemesi, J. A. (2010). Catalysis in biodiesel production by transesterification processes-an insight. *E-Journal of Chemistry*, *7*(4), 1120–1132.

Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology*, *32*, 185–219.

Fellows, H. (1926). Relation of growth in the potato tuber to the potato scab disease. *Journal of Agricultural Research*, *32*(8), 757–781.

Fett, W. F., Wijey, C., Moreau, R. A., & Osman, S. F. (1999). Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(4), 561–568.

Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, *82*(11), 1033–1041.

Gérard, H. C., Pfeffer, P. E., & Osman, S. F. (1994). 8,16-Dihydroxyhexadecanoic acid, a major component from cucumber cutin. *Phytochemistry*, *35*(3), 818–819.

Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S., & Budge, S. (2010). Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *6*(2), 54–76.

Goyer, C., Vachon, J., & Beaulieu, C. (1998). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in Thaxtomin A production. *Phytopathology*, *88*(5), 442–445.

Graça, J. (2015). Suberin : the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, *3*(62), 1–11.

Graça, J., & Pereira, H. (1997). Cork suberin: A glyceryl based polyester. *Holzforschung*, *51*(3), 225–234.

Graça, J., & Pereira, H. (2000). Methanolysis of bark suberins : Analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochemical Analysis*, *11*(1), 45–51.

Graça, J., & Santos, S. (2007). Suberin : a biopolyester of plants ' skin. *Macromolecular Bioscience*, *7*(2), 128–135.

H. T. Güssow. (1914). The systematic position of the organism of the common potato scab. *Science*, *39*(1003), 431–433.

Hamer, U., Rumpel, C., & Dignac, M. F. (2012). Cutin and suberin biomarkers as tracers for the turnover of shoot and root derived organic matter along a chronosequence of Ecuadorian pasture soils. *European Journal of Soil Science*, *63*, 808–819.

Hill, J., & Lazarovits, G. (2005). A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Pathology*, *27*, 46–52.

Hiltunen, L., Laakso, I., Chobot, V., Hakala, K., Weckman, A., & Valkonen, J. (2006). Influence of Thaxtomins in different combinations and concentrations on growth of micropropagated potato shoot cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(9), 3372–3379.

Joshi, M. V, Bignell, D. R. D., Johnson, E. G., Sparks, J. P., Gibson, D. M., & Loria, R. (2007). The AraC / XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Molecular Microbiology*, *66*(3), 633–642.

Kers, J. A., Cameron, K. D., Madhumita, V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., Loria, R. (2005). A large , mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces species*. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1025–1033.

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*.

King, R. R., & Calhoun, L. A. (2009). Phytochemistry the Thaxtomin phytotoxins : Sources , synthesis , biosynthesis , biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), 833–841.

King, R. R., Clark, C. H., & Lawrence, M. C. (1991). Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal*, 68(10), 675–680.

King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, C., & Calhoun, L. A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications Articles*, 849(1), 849–850.

Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants : cutin and suberin. *Science*, 208(4447), 990–1000.

Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 539–567.

Kolattukudy, P. E. (1984). Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany*, 62(12), 2918–2933.

Kolattukudy, P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 223–250.

Kolattukudy, P. E., & Agrawal, V. P. (1974). Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids*, 9(9), 682–691.

- Kolattukudy, P., Purdy, R., & Maiti, I. (1981). Cutinases from fungi and pollen. *Methods in Enzymology*, *71*, 652–664.
- Koller, W., & Parker, D. M. (1989). Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, *79*(19), 278–283.
- Komeil, D., Padilla-Reynaud, R., Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., & Beaulieu, C. (2014). Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. *Proteome Science*, *12*(1), 35.
- Komeil, D., Simao-Beaunoir, A.-M., & Beaulieu, C. (2013). Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other actinobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *59*(5), 294–303.
- Kontkanen, H., Westerholm-Parvinen, A., Saloheimo, M., Bailey, M., Rättö, M., Mattila, I., Buchert, J. (2009). Novel *Coprinopsis cinerea* Polyesterase that hydrolyzes cutin and suberin. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 2148–2157.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, *39*(4), 393–396(a).
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989). *Streptomyces scabies* sp. nov., norn. rev. *International Journal Of Systematic Bacteriolo*, *39*(4), 387–392(b).
- Large, K. P., Mirjalili, N., Osborne, M., Peacock, L. M., Zormpaidis, V., & Walsh, M. (1999). Lipase activity in streptomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(7), 569–575.
- Lauzier, A., Simao-Beaunoir, A. M., Bourassa, S., Poirier, G. G., Talbot, B., & Beaulieu, C. (2008). Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. *Molecular Plant Pathology*, *9*(6), 753–762.
- Lazarovits, G., Hill, J., Patterson, G., Conn, K. L., & Crump, N. S. (2007). Edaphic soil levels of mineral nutrients , ph , organic matter , and cationic exchange capacity in the geocaulosphere associated with potato common scab. *Phytopathology*, *97*(9), 1071–1082.

Lehtonen, M. J., Rantala, H., Kreuze, J. F., Kuisma, L., Koski, P., Virtanen, E., Valkonen, J. P. T. (2004). Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions : quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology*, *53*, 280–287.

Lerat, S., Babana, A. H., Oirdi, M. El, Hadrami, A. El, Daayf, F., Beaudoin, N., Beaulieu, C. (2009). *Streptomyces scabiei* and its toxin Thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, *28*(12), 1895–1903.

Lerat, S., Forest, M., Lauzier, A., Grondin, G., Lacelle, S., & Beaulieu, C. (2012). Potato suberin induces differentiation and secondary metabolism in the genus *Streptomyces*. *Microbes and Environments / JSME*, *27*(1), 36–42.

Lerat, S., Simao-Beauvoir, A.-M., Wu, R., Beaudoin, N., & Beaulieu, C. (2010). Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in triggering Thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology*, *100*(1), 91–96.

Lerat, S., Simao-Beauvoir, A., & Beaulieu, C. (2009). Pathogen profile genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, *10*(5), 579–585.

Lewis, N. G., & Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, *41*, 455–496.

Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P. J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., Kong, X. (2009). Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase : enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(43), 15711–15716.

Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, *81*(8), 836–946.

Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., & Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *62*(2), 65–72.

Loria, R., & Kers, J. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. Annual Review of Phytopathology, 44(1), 469–487.

Lulai, E., & Corsini, D. (1998). Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L) wound-healing. Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(4), 209–222.

Lulai, E., & Freeman, T. (2001). The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L) periderm. Annals of Botany, 88(4), 555–561.

Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., & Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature, 356(6370), 615–618.

Martinez, C., Nicolas, A., Tilbeurgh, H. Van, Egloff, M., Cudrey, C., Verger, R. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. Biochemistry, 33(1), 83–89.

McQueen, D. A. R., & Schottel, J. L. (1987). Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. Journal of Bacteriology, 169(5), 1967–1971.

Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., & Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 495–502.

Murphy, C. A., Cameron, J. A., Huang, S. J., & Vinopal, R. T. (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. Applied And Environmental Microbiology, 62(2), 456–460.

Nimchua, T., Eveleigh, D. E., Sangwatanaroj, U., & Punnapayak, H. (2008). Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate- hydrolyzing enzyme for fabric modification. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(8), 843–850.

Nimchua, T., Punnapayak, H., & Zimmermann, W. (2007). Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. Biotechnology Journal, 2(3), 361–364.

- Ofong, A. U., & Pearce, R. B. (1994). Suberin degradation by *Rosellinia desmazieresii*. *European Journal of Forest Pathology*, *24*(6–7), 316–322.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, *5*(3), 197–211.
- Padilla-Reynaud, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Bernards, M. A., & Beaulieu, C. (2015). Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. *Microbes and Environments*, *30*(3), 245–253.
- Purdy, R. E., & Kolattukudy, P. E. (1973). Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisi*: Isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *159*(1), 61–69.
- Ribitsch, D., Acero, E. H., Przylucka, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Gamerith, C., Guebitz, G. M. (2015). Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(11), 3586–3592.
- Rios, P., Cabral, V., Santos, S., Mori, F., & Grac, J. (2014). The chemistry of *Kielmeyera coriacea* outer bark: a potential source for cork. *European Journal of Wood and Wood Products*, *72*(4), 509–519.
- Sabba, R., & Lulai, E. (2002). Histological analysis of the maturation of native and wound periderm in potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber. *Annals of Botany*, *90*(1), 1–10.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schreiber, L. (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science*, *15*(10), 546–553.
- Schultz, E., Chamuris, G., & Dallabrida, S. (1996). Screening wood and bark inhabiting basidiomycetes for esterase activity in liquid stationary culture. *Mycologia*, *88*(5), 831–838.

Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., & Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *The Plant Journal*, *62*(2), 277–290.

Silva, C. M., Carneiro, F., O'Neill, A., Fonseca, L. P., Cabral, J. S. M., Guebitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Cutinase - A new tool for biomodification of synthetic fibers. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, *43*(11), 2448–2450.

Singhai, P. K., Sarma, B. K., & Srivastava, J. S. (2011). Biological management of common scab of potato through *Pseudomonas* species and vermicompost. *Biological Control*, *57*(2), 150–157.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, *47*(2), 479–491.

Su, L., Woodard, R. W., & Chen, J. (2013). Extracellular location of *Thermobifida fusca* cutinase expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) without mediation of a signal peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(14), 4192–4198.

Suzuki, Y., Hatagaki, K., & Hiroshi, O. (1991). A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *34*(6), 707–714.

Thangavel, T., Tegg, R. S., & Wilson, C. R. (2016). Toughing it out — disease-resistant potato mutants have enhanced tuber skin defenses. *Phytopathology.*, *106*(5), 474–483.

Thumarat, U., Nakamura, R., Hideyuki, S., Fusako, K., & Kawabata, T. (2012). Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(2), 419–430.

Trail, F., & Köller, W. (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

Tyner, D., Hocart, M., Lennard, J., & Graham, D. (1997). Periderm and lenticel characterization in relation to potato cultivar, soil moisture and tuber maturity. *Potato Research*, *40*(2), 181–190.

van der Vlugt-Bergmans, C. J., Wagemakers, C. A., & van Kan, J. A. (1997). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, *10*(1), 21–29.

Van Doom, W. G., & Stead, A. D. (1997). Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany*, *48*(309), 821–837.

Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipases : facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, *15*(1), 32–38.

Vertommen, M. A. M. E., Nierstrasz, V. A., Veer, M. Van Der, & Warmoeskerken, M. M. C. G. (2005). Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, *120*(4), 376–386.

Walton, T. J., & Kolattukudy, P. E. (1972). Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry*, *11*(10), 1885–1897.

Wanner, L. A. (2007). A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. *Plant Disease*, *91*(4), 352–359.

Wanner, L. A. (2009). A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in north america. *American Journal of Potato Research*, *86*(4), 247–264.

Wei, Y., Schottel, J. L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S., & Derewenda, Z. S. (1995). A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nature Structural Biology*, *2*(3), 218–223.

Whitaker, J. (1972). *Principles of enzymology for the food sciences*, Second edition. Food science and technology.

Zimmermann, W., & Eemüller, E. (1984). Degradation of raspberry suberin by *Fusarium solani* f. sp. *lisi* and *Armillaria mellea*. *Journal of Phytopathology*, *110*(3), 192–199.

