

Clonage et expression des prochymosines bovines A, B et B S79N chez Escherichia coli et Pichia pastoris. Etude de la mutation S79N

Alexandra Abreu da Silva

▶ **To cite this version:**

Alexandra Abreu da Silva. Clonage et expression des prochymosines bovines A, B et B S79N chez Escherichia coli et Pichia pastoris. Etude de la mutation S79N. Biochimie [q-bio.BM]. INAPG (AgroParisTech), 2004. Français. NNT : 2004INAP0001 . tel-00005681

HAL Id: tel-00005681

https://pastel.hal.science/tel-00005681

Submitted on 30 Nov 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Institut National Agronomique
PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Biochimie

présentée par
Alexandra Abreu da Silva

Clonage et expression des prochymosines bovines A, B et B S79N chez *Escherichia coli* et *Pichia pastoris*. Etude de la mutation S79N

Cloning and expression of bovine prochymosins A, B and B S79N in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Study of mutation S79N

Directeur de thèse
Thierry Chardot

Soutenue le 1er mars 2004 devant la commission d´examen :

Mr J.-C. MEUNIER	Professeur à l´INA-PG	Président
Mme I. MACEDO	Professeur à l´Université Aveiro (Portugal)	Rapporteur
Mr S. BOUHALLAB	Chargé de Recherches (INRA)	Rapporteur
Mr J.A.P. HENRIQUES	Professeur à l´UFRGS (Brésil)	Examinateur
Mr T. CHARDOT	Directeur de Recherches (INRA)	Directeur de thèse

© UMLV

A Floriane,
pour tout.

A Marcelo,
pour tous les sacrifices qu'il a consentis et pour
la patience dont il a fait preuve à mon égard.

A mes parents,
pour toute leur affection.

Un travail de thèse est rarement celui d´une seule personne. Aussi, je souhaite témoigner à toutes les personnes qui m´ont soutenu au cours de ces années, ma profonde reconnaissance.

Je tiens en particulier à remercier :

- Monsieur le Professeur **J.C. Meunier** de l´INA-PG et Monsieur le Professeur **J.A.P. Henriques** de l´UFRGS pour m´avoir accueilli dans leurs laboratoires en France et au Brésil,

- Monsieur **T. Chardot**, Directeur de Recherches à l´INRA et Monsieur le Professeur **C. Termignoni** de l´UFRGS pour leur disponibilité et leur soutien constant tout au long de ce travail,

- Madame la Professeur **I. Macedo** de l´Université Aveiro et Monsieur **S. Bouhallab**, Chargé de Recherches à l´INRA, pour avoir accepté d´être rapporteurs de ce travail,

- Madame la Professeur **S.E. Farias** et Monsieur le Professeur **M.A.Z. Ayub** de l´UFRGS pour avoir accepté de participer de ma commission d´accompagnement,

- Monsieur le Professeur **S. Astolfi filho** de l´ « Universidade do Amazonas », Monsieur le Professeur **M. Brendel** de l´UFRGS et Madame la Professeur **C. Carlini** de l´UFRGS pour leurs encouragements,

- Madame le Professeur **A. Masuda** et Monsieur le Professeur **I. Vaz da Silva Jr** de l´UFRGS pour leur aimable collaboration,

- tous mes collègues français et brésiliens pour leur aide et leur amitié.

Je tiens également à remercier la « Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul" (FAPERGS) et le Programme de Coopération Internationale entre la « Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior » (CAPES) et le Comité Français d´Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (COFECUB) pour leur aide financière.

Résumé : La chymosine, enzyme utilisée dans l´industrie fromagère pour coaguler le lait, est traditionnellement extraite à partir du quatrième estomac de veaux non sevrés. La préparation ainsi obtenue dénommée présure a été depuis un certain nombre d´années substituée par divers coagulants d´origine microbienne et de plantes car la production de cette enzyme seule n´était plus capable de répondre à la demande mondiale du fait notamment de l´augmentation de la production fromagère. La chymosine est cependant toujours considérée comme étant la meilleure enzyme pour coaguler le lait dans l´industrie fromagère. Ainsi, les techniques d´ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante. C´est en utilisant ces techniques que nous proposons d´établir un procédé de production de chymosine bovine recombinante permettant l'innovation technologique et contribuant au maintien et au développement d'entreprises agro-alimentaires brésiliennes et des pays du Marché Economique du « Cone Sul » (MercoSul).

Nous avons ainsi cloné les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B à l'aide des techniques classiques de biologie moléculaire. Nous avons observé la présence de mutations dans la partie du propeptide de la prochymosine A et dans la partie mature de la prochymosine B. Cette dernière mutation, S79N, se situe dans la partie du tampon (résidus 72 à 86) qui constitue une anse externe mobile recouvrant le sillon du site actif. La conformation de ce tampon est caractéristique de la chymosine et serait en partie responsable pour sa grande spécificité. Nous avons modélisé cette mutation, qui semble entraîner des changements dans le réseau de liaisons hydrogène du tampon. Les séquences obtenues ont ainsi été introduites dans différents vecteurs d´expression puis clonées chez *Escherichia coli* et *Pichia pastoris*. L'expression des protéines a été suivie à l'aide d'anticorps spécifiques et au moyen de tests d'activité. Les différentes protéines sont toutes actives et ont été purifiées à l'homogénéité. Nous avons alors étudié leurs propriétés cinétiques à l'aide de différents substrats. Les chymosines B et BS79N ont un optimum de pH qui les différencie de la chymosine A. Le mutant B S79N a des propriétés cinétiques améliorées avec l´hexapeptide synthétique. La mutation S79N n´entraîne toutefois qu´une petite augmentation de la constante d´efficacité concernant les hydrolyses de la caséine κ et du lait, bien que ses vitesses de réactions catalytiques soient supérieures à celles de la chymosine B. Ces résultats sont expliqués par les modifications dans le réseau de liaisons hydrogène du tampon, et par le fait que le nombre d'interactions entre le substrat et l'enzyme est une fonction de la masse moléculaire et de la nature du substrat.

Mots clefs : chymosine bovine recombinante, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, protéases à acide aspartique, tampon, hexapeptide, caséine κ.

Abstract: Chymosin, an enzyme used in cheese manufactures as a milk-clotting agent, is traditionaly prepared from the fourth stomach of unweaved calves. This crude preparation called rennet has been substituted by microbial and plant coagulants for years since chymosin production was unable to satisfy the world demand especially due to the increase of cheese production. However, chymosin still remains the better milk-clotting enzyme. Thus, genetic engineering techniques are used to produce recombinant bovine chymosin. Using these techniques, we propose to establish the conditions for production of recombinant bovine chymosin, allowing technological innovation and contributing to the development of food industry of Brazil and countries of the Economic Market of "Cone Sul" (MercoSul).

We cloned the cDNA encoding preprochymosin A and preprochymosin B using standard techniques of molecular biology. We observed mutations in the region of propeptide of prochymosin A and in the mature part of prochymosin B. This last mutation, S79N, is localized in the region of the flap (residues 72 to 86), a flexible loop located at the entrance of the active site cleft. The conformation of the flap is characteristic of chymosin and is presumably responsible for the chymosin specificity. We modeled this mutation that seems to involve changes in the hydrogen network of the flap. The cDNA sequences were introduced into different expression vectors and cloned into *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Protein expression was analyzed with specific antibodies and with activity assays. The different proteins are all actives and were purified. We studied kinetic properties using different substrates. Chymosin B and chymosin B S79N show an optimum pH that differentiates them from chymosin A. The mutant B S79N show improved kinetics properties with the synthetic hexapeptide. The mutation S79N leads however to a little increase of efficacy constant concerning hydrolysis of κ-casein and milk. These results can be explained by changes in the hydrogen network of the flap and by the fact that the number of interactions between substrate and enzyme is a function of the molecular mass and the kind of the substrate.

Key words: recombinant bovine chymosin, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, aspartic proteinases, flap, hexapeptide, κ-casein.

TABLE DES MATIERES

Page de titre 1
Remerciements 3
Résumé 4
Abstract 5
Table des matières 6
Liste des tableaux 12
Liste des figures 13
Liste des abréviations 17

I.Introduction 18

I.1. Protéases 21

I.1.1. Nomenclature et classification 21
I.1.2. Peptidases à sérine 24
I.1.3. Peptidases à cystéine 26
I.1.4. Peptidases à acide aspartique 28
I.1.5. Peptidases à métal 31
I.1.6. Peptidases à thréonine 33
I.1.7. Peptidases non classées 35

I.2. Coagulants du lait 37

I.2.1. Coagulants d´origine microbienne 37
I.2.2. Coagulants de plantes 38
I.2.3. Coagulants d´origine animale 38

II. Materiels et méthodes

47

II.1. Souches bactériennes et levures 48

II.2. Plasmides 49

II.2.1. Plasmides de séquence 49
II.2.2. Plasmides d'expression 52
II.2.2.1. Chez les bactéries 52
II.2.2.2. Chez les levures 52

II.3. Amorces 55

II.4. Méthodes de base de Biologie Moléculaire 59

II.4.1. Electrophorèse en gel d'agarose 59
II.4.2. Dosage de l'ARN et l'ADN 59
II.4.3. Préparation d'ADN plasmidique 60
II.4.3.1. Mini-préparations plasmidiques («ébullition») 60
II.4.3.2. Lyse alcaline 60
II.4.4. Restrictions enzymatiques 61
II.4.5. Purification de fragments d'ADN 61
II.4.6. Clonage 62
II.4.6.1. Ligature 62
II.4.6.2. Transformation 63
II.4.6.2.1. Transformation $CaCl_2$ 63
II.4.6.2.2. Transformation par éléctroporation 63

II.5. Clonage de la séquence codant la préprochymosine 64

II.5.1. Collecte du tissus animal 64
II.5.2. Extraction de l'ARN total de tissus animal 64
II.5.3. RT-PCR 65

II.5.4. Clonage du produit de PCR 66

II.6. Criblage des bactéries transformées 66

II.7. Séquençage 67

II.8. Expression chez *Escherichia coli* 68

II.8.1. Induction de l'expression 68
II.8.1.1. A l´aide du plasmide pGEX 4T-3 68
II.8.1.2. A l´aide du plasmide pTIamy 68
II.8.2. Purification et solubilisation des corps d'inclusion 69

II.9.Activation et test d'activité 70

II.9.1. Activation de la prochymosine 70
II.9.2. Test d'activité sur le lait 70
II.9.2.1. Test de coagulation du lait 70
II.9.2.2. Test de turbidimétrie 70
II.9.3. Test d'activité sur la caséine κ 71
II.9.4. Test d'activité sur substrat synthétique 71
II.9.4.1. Préparation du substrat 71
II.9.4.2. Activité sur substrat synthétique en fonction du pH 72
II.9.5. Analyses des données 74
II.9.6. Thermostabilité 74

II.10. Analyses par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et immuno-empreintes (Western-blot) 74

II.11. Anticorps polyclonaux anti-chymosine 75

II.11.1. Obtention des anticorps 75
II.11.2. Adsorption des anticorps polyclonaux avec un lysat d´*Escherichia coli* 76

II.11.2.1. Préparation du lysat bactérien et saturation des membranes de nitrocellulose 76
II.11.2.2. Epuisement des anticorps non spécifiques 76

II.12. Détermination de la concentration protéique 77

II.12.1. Spectrophotométrie 77
II.12.2. Méthode de Bradford 77
II.12.3. Méthode BCA 78

II.13. *Pichia pastoris* 78

II.13.1. Transformation de *Pichia pastoris* 78
II.13.1.1. Préparation de cellules compétentes pour l'éléctroporation 78
II.13.1.2. Préparation de l'ADN à être transformé 79
II.13.1.3. Transformation 80
II.13.2. Sélection des transformants 80
II.13.2.1. Mut^+/Mut^s 80
II.13.2.2. Expression de la met-prochymosine 81
II.13.3. Intégration de la séquence codant la met-prochymosine dans le génome de *Pichia pastoris* 82
II.13.3.1. Extraction de l'ADN génomique de *Pichia pastoris* 82
II.13.3.2. Réaction de PCR 83
II.13.3.3. Southern blot 83
II.13.3.3.1. Digestion de l'ADN génomique 85
II.13.3.3.2. Transfert de l'ADN du gel d'agarose sur membrane de nylon 85
II.13.3.3.3. Préparation de la sonde d'ADN 85
II.13.3.3.4. Hybridation des membranes en nylon 86
II.13.3.3.5. Détection du signal 87
II.13.4. Production de la met-prochymosine chez *Pichia pastoris* 87
II.13.5. Purification de la met-prochymosine 87

III. Résultats et discussion 89

III.1. Clonage de la séquence codant la préprochymosine bovine chez *Escherichia coli* 90

III.1.1. Extraction de l'ARN total du tissus animal et RT-PCR 90
III.1.2. Clonage et séquençage des produits d´amplification 91
III.1.3. Analyse des mutations 98

III.2. Expression de la préprochymosine bovine chez *Escherichia coli* 103
III.2.1. A l´aide du plasmide pGEX 4T-3 103
III.2.1.1. Clonage des séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le pGEX-4T-3 103
III.2.1.2. Expression des séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le pGEX-4T-3 103
III.2.1.3. Purification partielle et tests d´activation/activité de la préprochymosine A et de la préprochymosine B S79N 107
III.2.2. A l´aide du plasmide pTIamy 108
III.2.2.1. Clonage des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans le pTIamy 108
III.2.2.2. Expression des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans le pTIamy 110
III.2.2.3. Purification partielle et tests d´activation/activité de la met-prochymosine A et de la met-prochymosine B S79N 110
III.2.3. Construction de la séquence codant la met-prochymosine B 113

III.3. Clonage et expression des séquences codant la met-prochymosine bovine chez *Pichia pastoris* 115

III.3.1. *Pichia pastoris* 115
III.3.2. Clonage des séquences codant la met-prochymosine chez *Pichia pastoris* 116
III.3.3. Transformation et criblage des transformants 117

III.3.4. Intégration des séquences codant la met-prochymosine bovine dans le génome de *Pichia pastoris* 128
III.3.4.1. Extraction de l'ADN génomique de *Pichia pastoris* 129
III.3.4.2. PCR 129
III.3.4.3. Southern-blot 133
III.3.5. Expression de la met-prochymosine chez *Pichia pastoris* 137

III.4. Purification de la met-prochymosine 142

III.5. Cinétiques de la chymosine A, chymosine B et chymosine B S79N 156

III.5.1. Importance du tampon (« flap ») chez la chymosine 156

III.5.2. Cinétiques des chymosines recombinantes 160

III.5.2.1. Cinétiques d´hydrolyse du peptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu 161
III.5.2.1.1. Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse 161
III.5.2.1.2. Effet du pH sur la réaction d´hydrolyse de l´hexapeptide 163
III.5.3.2. Cinétiques d´hydrolyse de la caséine κ 165
III.5.3.3. Cinétiques d´hydrolyse du lait 168
III.5.3. Modélisation de la mutation S79N 168
III.5.4. Discussion 172

III.6. Thermostabilité 173

IV. Conclusion et perspectives 176

V. Références bibliographiques 180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Clans et familles des peptidases à sérine.....25
Tableau I.2 : Clans et familles des peptidases à cystéine.....29
Tableau I.3 : Clans et familles des peptidases à acide aspartique.....32
Tableau I.4 : Clans et familles des peptidases à métal..... 34
Tableau I.5 : Clan et familles des peptidases à thréonine.....35
Tableau I.6 : Clan et familles des peptidases à type catalytique inconnu.....36
Tableau I.7 : La chymosine bovine recombinante est aujourd´hui disponible sur le marché sous trois différentes formules commerciales.....44

Tableau II.1: Amorces utilisées dans cette étude.....58

Tableau III.1 : Variants de la chymosine bovine.....97
Tableau III.2 : Transformation et criblage des clones de *P. pastoris*.....127
Tableau III.3 : Bilan des étapes de purification de la chymosine A à partir de la culture du clone 4S9.....153
Tableau III.4 : Bilan des étapes de purification de la chymosine B S79N à partir de la culture du clone 2S8.....154
Tableau III.5 : Bilan des étapes de purification de la chymosine B à partir de la culture du clone 37.....155
Tableau III.6 : Séquences des tampons de différentes protéases à acide aspartique.....157
Tableau III.7 : Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse de l´hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe par différentes chymosines.....162
Tableau III.8 : Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse de la caséine κ par différentes chymosines.....166
Tableau III.9 : Activités spécifiques des différentes chymosines sur le lait.....169

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Représentation de l'estomac des ruminants..... 20
Figure I.2 : Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon BARRETT (1986)..... 22
Figure I.3 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à sérine..... 27
Figure I.4 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à acide aspartique..... 30
Figure I.5: Représentation du chardon (*Cynara cardunculus*)..... 39
Figure I.6: Représentation schématique de l'hydrolyse de la caséine κ par la chymosine bovine..... 40
Figure I.7: Schéma de la structure de la préprochymosine..... 41
Figure I.8. : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine..... 43

Figure II.1: Vecteurs de séquence, (A) pBluescript SK et (B) pZERO-2..... 50
Figure II.2: Vecteur de séquence, pUC72..... 51
Figure II.3: Vecteurs d'expression chez *E. coli*: (A) pGEX-4T-3 et (B) pTIamy..... 53
Figure II.4: Vecteurs d'expression chez *P. pastoris*, (A) pHIL-S1 et (B) pPIC9..... 54
Figure II.5: Insertion du gène d'intérêt dans le génome de *P. pastoris*..... 56
Figure II.6: Insertion du gène d'intérêt dans le génome de *P. pastoris*..... 57
Figure II.7: Changement du coefficient molaire d'absorption à 310 nm des produits d'hydrolyse du peptide synthétique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe par la chymosine en fonction du pH (SALESSE et GARNIER, 1976)..... 73
Figure II.8: Principe du kit « ECL direct nucleic acid labelling and detection system » qui est basé sur le marquage de la sonde d'ADN avec l'enzyme péroxydase..... 84

Figure III.1: Analyse des produits d'amplification d'ADNc..... 92
Figure III.2: Vérification de l'insertion des produits d'amplification..... 93
Figure III.3: Détails du séquençage du clone 40 (chymosine A) et du clone 23 (chymosine B S139N)..... 95
Figure III.4: Séquence de la préprochymosine A selon Moir *et al.* (1982)..... 96

Figure III.5: Alignement des séquences de propeptides de différentes protéases à acide aspartique..... 99
Figure III.6: Alignement des séquences en acides aminés de différentes protéases à acide aspartique..... 101
Figure III.7: Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine (4CMS)..... 102
Figure III.8: Analyse des plasmides pGEX-4T-3 contenant les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N..... 104
Figure III.9: Analyses par électrophorèse SDS-PAGE 10% (A) et par Western-blot utilisant les anticorps monoclonaux anti-GST (B), de l´expression de la protéine de fusion préprochymosine bovine B S79N et GST par *E. coli* à l´aide du plasmide pGEX-4T-3 et de la solubilisation des corps d´inclusion par différentes concentrations d´urée..... 105
Figure III.10: Analyses par électrophorèse SDS-PAGE 10% de l´expression de la protéine de fusion: préprochymosine bovine A et GST par *E. coli* à l´aide du plasmide pGEX-4T-3 et de la purification partielle de la protéine de fusion..... 106
Figure III.11: Analyse des plasmides pTIamy contenant les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N..... 109
Figure III.12: Analyses par Western-blot utilisant les anticorps polyclonaux anti-chymosine de l´expression de la met-prochymosine A, de la met-prochymosine B S79N et de la met-prochymosine B par *E. coli* à l´aide du plasmide pTIamy..... 112
Figure III.13 : Construction du plasmide portant la séquence codant la met-prochymosine B à partir des plasmides portant la séquence codant la met-prochymosine A et du plasmide portant la séquence codant la met-prochymosine B S79N..... 114
Figure III.14: Analyse des plasmides pHIL-S1 et pPIC9 contenant les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N..... 118
Figure III.15: Analyse du plasmide pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine B..... 119
Figure III.16: Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris* et tests d´activité de coagulation du lait des surnageants de culture..... 122
Figure III.17: Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B S79N par différents clones de *P. pastoris* et tests d´activité de coagulation du lait des surnageants de culture..... 124

Figure III.18: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris*..... 125
Figure III.19: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B S79N par différents clones de *P. pastoris*..... 126
Figure III.20: Analyse de l´ADN génomique total de différentes souches de *P. pastoris*..... 130
Figure III.21: Analyse par PCR des clones de *P. pastoris*..... 131
Figure III.22: Analyse par PCR des clones de *P. pastoris*..... 132
Figure III.23: Digestion de l'ADN génomique total de différentes souches de *P. pastoris*..... 134
Figure III.24: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U de l'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*..... 135
Figure III.25: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U d'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*..... 136
Figure III.26: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U de l'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*..... 138
Figure III.27: Culture du clone 37 de *P. pastoris* dans différents types d´erlenmeyers..... 139
Figure III.28: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris* dont la culture a été réalisée dans des erlenmeyers à baffles..... 141
Figure III.29: Biomasse des différents clones de *P. pastoris*..... 143
Figure III.30: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 37 (prochymosine B) de *P. pastoris*..... 144
Figure III.31: Analyse par SDS-PAGE 12,5% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 2S8 (prochymosine B S79N) de *P. pastoris*..... 145
Figure III.32: Analyse par SDS-PAGE 12,5% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 4S9 (prochymosine A) de *P. pastoris*..... 146
Figure III.33 : Analyses par SDS-PAGE 10% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine B par différents clones de *P. pastoris*..... 147
Figure III.34 : Purification de la chymosine A recombinante..... 150

Figure III.35 : Purification de la chymosine B S79N recombinante..... 151
Figure III.36 : Purification de la chymosine B recombinante..... 152
Figure III.37: Cinétiques d´hydrolyse de l´hexapeptide
Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-Ome..... 162
Figure III.38 : Effet du pH sur les vitesses initiales d´hydrolyse du peptide synthétique
Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu par les différentes chymosines..... 164
Figure III.39 : Cinétiques d´hydrolyse de la caséine κ..... 166
Figure III.40: Durées des phases de latence observées lors de l´hydrolyse de
la k-caséine par les différentes chymosines en fonction de la concentration
en substrat..... 167
Figure III.41: Courbes de turbidimétrie des différentes chymosines..... 169
Figure III.42: Etude de la mutation S79N utilisant le programme Swiss-Pdb
Viewer chez la chymosine “libre” (4CMS)..... 170
Figure III.43: Etude de la mutation S79N utilisant le programme Swiss-Pdb
Viewer chez le complexe chymosine/inhibiteur (1CZI)..... 171
Figure III.44: Thermostabilité des différentes chymosines à 40°C (A) et à 50°C (B)..... 174

LISTE DES ABREVIATIONS

A	: Absorbance
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMP	: Adénosine monophosphate
ARNm	: Acide ribonucléique messager
dNTP	: Désoxyribonucléotide triphosphate (N=A, G, C ou T)
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Ethylène-diamine-tétra-acétate
IPTG	: Isopropyl β-D-galactoside
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
pb	: paire de base
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
PEG	: Polyethylène glycol
PMSF	: Phénylméthylsulfonyl fluorure
Rnase A	: Ribonucléase A
RX	: Rayons X
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
UV	: Rayons ultra-violet
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

I. INTRODUCTION

Il est probable que les fromages aient été la première fois fait accidentellement en transportant du lait dans des estomacs de mammifères. Il s´agissait, en effet, d´une pratique courante dans les temps anciens, en Europe de l´Est et en Asie de l´Ouest, pour transporter le lait. Certains facteurs ont été certainement nécessaires à la transformation du lait en fromage comme la chaleur, l´acidité et les sucs de l'estomac. Il a dû alors être possible d'observer qu´on obtenait un produit avec les caractéristiques d'un fromage cru quand il y avait une agitation, provoquée par exemple, par le transport sur charette. Les Romains ont été les premiers à décrire en détail la fabrication du fromage, et les Légions Romaines ont contribué à répandre l´art de faire du fromage dans toute l´Europe (DAVIS, 1965). Sans aucun doute, plusieurs méthodes ont du être testées tout au long des siècles. Ainsi, des extraits d'estomac de plusieurs types d'animaux (moutons, chèvres, chevaux, vaches) mais également des extraits de plantes (comme le chardon) ont été utilisés pour la préparation de fromages.

Au dix-neuvième siècle, certains fermiers vendaient des extraits de présure en petites quantités pour la fabrication familiale de fromages. En 1874, le chimiste danois Christian HANSEN créait un laboratoire à Copenhague et lançait la première production industrielle d´extraits de présure, qui provenaient de l´estomac de veaux abattus pour la consommation de viande.

Les nombreuses dénominations de cette préparation à travers le monde peuvent être classées phylogéniquement en quatre groupes. Dans les pays anglo-saxons, la préparation brute ou l'extrait à partir du quatrième estomac (abomasum, voir **figure I.1**) utilisé dans l'industrie fromagère, est connue comme "rennet". Le mot "rennet" est dérivé de "run" (vieil anglais "runnen"). Dans le second groupe, on peut classer l'allemand "lab", le suédois "löpe" et le danois "löbe", qui dérivent tous du vieil allemand "luppi", qui signifie extrait de plante. Le mot français "présure", l'italien "presura" viennent du latin "prendere", empoigner. L'italien "caglio", l'espagnol "cuajo" et le portuguais "coalho" sont clairement dérivés du latin "coagulum", signifiant un matériel coagulé.

La présure brute ne contient pas seulement de la chymosine. La pepsine est également présente et il peut y avoir de la trypsine et d´autres protéases. La présure de jeune veau non sevré est environ 7 fois plus riche en chymosine que la présure d´une vache adulte.

L´augmentation de la production fromagère mondiale a conduit à l´utilisation de divers agents de coagulation du lait. Comme la présure extraite traditionnellement de l´estomac de veaux ne peut plus répondre à la demande mondiale, des substituts de la présure comme la pepsine bovine, la pepsine porcine, les protéases microbiennes et les protéases produites par les plantes, sont utilisés. Ces substituts de la présure, comme la chymosine, sont

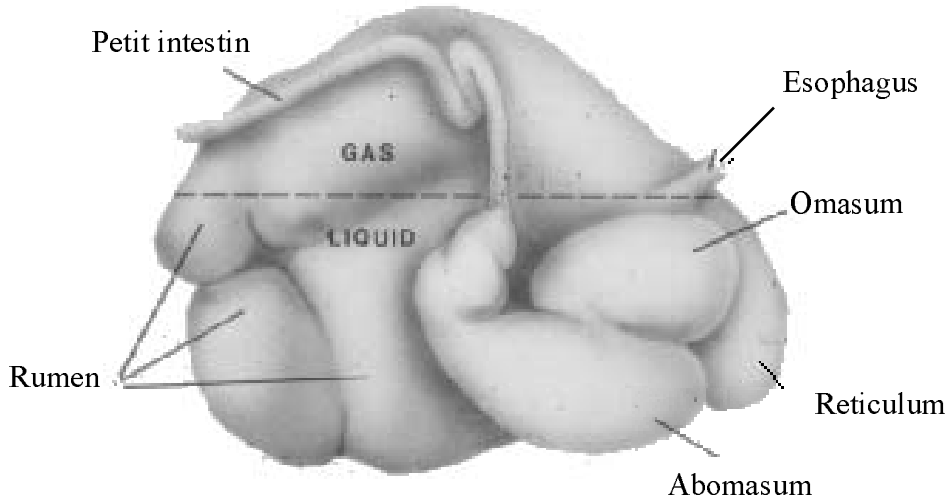


Figure I.1: Représentation de l´estomac des ruminants (figure disponible sur internet:http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html).

L´estomac des ruminants est composé de 4 compartiments: le rumen, l´omasum, le réticulum et l´abomasum.

des protéases à acide aspartique.

Nous nous proposons donc, dans un premier temps, de faire des rappels sur les protéases de manière générale puis nous focaliserons notre introduction sur les coagulants utilisés dans l´industrie fromagère, notamment ceux provenant de micro-organismes et de plantes et enfin, nous exposerons de manière plus détaillée les coagulants d´origine animale et plus particulièrement la chymosine bovine.

I.1. Protéases

I.1.1. Nomenclature et classification

Nous nous devons, dans un premier temps, de rappeler l´importance de la terminologie utilisée pour la classification des enzymes qui hydrolysent des liaisons peptidiques. En effet, trop souvent, les scientifiques se permettent une certaine liberté en ce qui concerne les termes qu´ils utilisent pour leurs objets d´étude et le résultat en est qu´une même enzyme se retrouve avec plusieurs dénominations. Les recommendations pour la nomenclature des enzymes ont été regroupées dans une liste « EC » (Enzyme Commission) publiée la première fois en 1954 puis en 1992 (NC-IUBMB, 1992). Depuis, cette liste est régulièrement actualisée dans les revues scientifiques de Biochimie et sur le site internet http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html.

Les peptidases sont nombreuses, représentant environ 2% de tous les produits géniques (RAWLINGS et BARRETT, 1999) et environ 10% des enzymes réunies dans la liste « EC ». Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l´hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d´une protéine donnée. Dans d´autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminées. Les peptidases ont une ample distribution, pouvant être rencontrées chez tous les organismes vivants. Elles participent à un grand nombre de processus biologiques dont le clivage de pro-hormones permettant leur activation, la coagulation sanguine et fibrinolyse, l´assemblage de structures macro-moléculaires comme les fibres de collagène, la fertilisation et la digestion de protéines, entre autres (NEURATH, 1984).

Les peptidases ne sont pas seulement une nécessité physiologique, elles peuvent également devenir un problème si elles ne sont pas contrôlées, pouvant détruire les

composants protéiques de cellules et de tissus. L´action de ces enzymes protéolytiques a donc besoin d´être régulée. Il existe deux mécanismes de régulation. Le premier est l´activation de précurseurs inactifs (zymogènes) par protéolyse limitée et le deuxième est l´inactivation de ces protéases par formation de complexes avec des inhibiteurs spécifiques. L´importance physiologique de ces deux mécanismes a été démontrée dans certaines maladies. Par exemple, plusieurs types d´hémophilie sont dues à une déficience de protéases plasmatiques qui normalement activent les zymogènes de la cascade de coagulation sanguine (DAHLBÄCK, 2000).

Les protéases sont divisées en deux groupes : d´une part les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités d´un peptide et d´autre part, les endopeptidases (ou protéinases) qui hydrolysent une liaison peptidique interne. Cette nomenclature est schématisée dans la **figure I.2**.

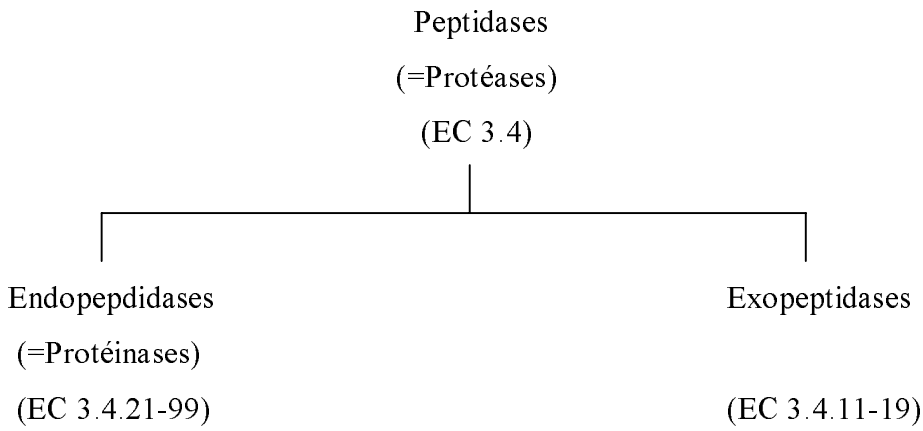


Figure I.2 : Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon BARRETT (1986).

Les exopeptidases qui agissent au niveau d´une extrémité N-terminale peuvent libérer soit, un unique résidu d´acide aminé et sont alors dénommées aminopeptidases (EC 3.4.11) soit, un dipeptide ou un tripeptide et sont alors dénommées dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14). Celles qui agissent au niveau d´une extrémité C-terminale peuvent de la même manière libérer soit, un unique résidu et sont alors dénommées carboxypeptidases (EC 3.4.16 à 3.4.18) soit, un dipeptide et sont alors dénommées peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15). Certaines exopeptidases sont spécifiques de dipeptides et portent le nom de dipeptidases (EC 3.4.13). Enfin, les omega peptidases (EC 3.4.19) hydrolysent des

liaisons peptidiques impliquant un résidu terminal d´acide aminé qui est modifié, cyclisé ou lié par des ponts isopeptidiques (liaisons peptidiques différentes de celles entre un groupement α-carboxyle et un groupement α-amine).

Les endopeptidases (ou protéinases) sont classées en cinq groupes distincts en fonction de leurs mécanismes catalytiques: les endopeptidases à sérine, les endopeptidases à cystéine, les endopeptidases à acide aspartique, les endopeptidases à métal et les endopeptidases à thréonine. Ces 5 groupes forment donc des sous-sous-classes numérotées 21, 22, 23, 24 et 25. Les endopeptidases à sérine, à thréonine et à cystéine sont, d´un point de vue catalytique, très diffèrentes des endopeptidases à acide aspartique et à métal dans la mesure où le nucléophile du site catalytique fait partie d´un résidu d´acide aminé tandis qu´il est une molécule d´eau activée pour les deux derniers groupes. Une des conséquences qui en découle est que les intermédiaires, qui sont des enzymes « acyl », peuvent seulement être formés dans les réactions impliquant les endopeptidases à sérine, à thréonine et à cystéine. Elles sont ainsi les seules à pouvoir agir comme des transférases. Les structures moléculaires des protéinases ont été déterminées utilisant des analyses de séquences en acides aminés et des études de cristallographie. Dans la plupart des cas, le site catalytique se situe dans un sillon trouvé à la surface de la molécule d´enzyme. La présence de zymogènes, précurseurs inactifs activés par l´élimination d´une extension peptidique dans la partie N-terminale de la protéine, se retrouvent chez toutes les endopeptidases. Les protéinases dont les mécanismes catalytiques sont inconnus sont regroupées dans une classe à part (sous-sous-classe 99).

Avant de parler plus en détails de chacune des classes de peptidases, il est intéressant d´introduire ici l´idée que certains chercheurs ont développé en ce qui concerne une nouvelle approche de classification des peptidases (BARRETT *et al.*, 2001). En effet, ces auteurs allèguent que la division des peptidases en seulement 14 sous-sous-classes comme il en est le cas dans la liste « EC » n´est pas adéquate pour un groupe si vaste d´enzymes. L´originalité a donc été de regrouper les enzymes qui sont similaires à la fois dans leur structure tridimensionnelle et dans leur origine d´un point de vue évolutif. Ce nouveau système de classification des peptidases est à la base de la banque de données MEROPS qui est disponible sur internet depuis 1996 (http://www.merops.sanger.ac.uk/) et est à la base également du livre des enzymes protéolytiques édité en 1998 (BARRETT *et al.*, 1998). Les peptidases sont classées en familles en fonction de l´homologie de séquences en acides aminés et les familles sont regroupées en clans dans la mesure où il existe l´évidence qu´elles partagent une origine ancestrale commune. Il existe des peptidases qui n´ont pas encore été attribuées à une famille en particulier car les informations sur leurs séquences en acides

aminés sont insuffisantes (http://merops.sanger.ac.uk/indexes/unseqpep.htm). Ces peptidases ne seront pas mentionnées dans la suite du manuscrit. Toutefois, il est important d´en parler car elles sont relativement nombreuses (199) avec la répartition suivante: peptidases à acide aspartique : 10 ; peptidases à cystéine : 18 ; peptidases à métal : 71 ; peptidases à sérine : 64 ; peptidases de type catalytique inconnu : 36. Sur ces 199 peptidases, seulement 39 sont incluses dans la liste « EC », soit environ 20%. Ainsi, nous allons mentionner dans ce chapitre cette nouvelle classification qui est complémentaire de la liste « EC ». Nous nous devons, ici, de rappeler à quelle vitesse évoluent les informations disponibles sur ce sujet. En effet, certaines données regroupées dans le livre des enzymes protéolytiques en 1998 ont déjà été modifiées. Pour cette raison, nous avons réalisé une « compilation » entre ces différentes bases de données, essayant dans la mesure du possible de réaliser une actualisation en accédant régulièrement aux sites internet du Comité de Nomenclature et de MEROPS.

I.1.2. Peptidases à sérine

Les peptidases à sérine possèdent un mécanisme catalytique qui dépend du groupement hydroxyle d´un résidu sérine. Ce dernier agit comme un nucléophile qui attaque alors une liaison peptidique. Les peptidases à sérine étaient classées en deux super-familles, chymotrypsine et subtilisine (BARRETT, 1986). En se basant sur le nouveau système de classification des peptidases, nous pouvons observer que les peptidases à sérine sont regroupées en 39 familles en fonction des comparaisons de séquences en acides aminés. Ces familles ont elles mêmes été regroupées en 10 clans : SB, SC, SE, SF, SH, SK, SM, PA(S), PB(S) et PC(S). En plus de ces 10 clans, il existe un clan supplémentaire SX où sont regroupées 6 de ces familles qui n´ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (**tableau I.1**).

Les protéases appartenant à la famille S1 (chymotrypsine) sont rencontrées chez les micro-organismes procaryotes et eucaryotes, les plantes et les animaux vertébrés tandis que celles appartenant à la famille S8 (subtilisine) sont uniquement rencontrées chez les bactéries. La structure tridimensionnelle est différente pour ces deux familles mais elles possèdent la même géométrie du site actif et le mécanisme catalytique se déroule de la même manière. Les résidus His57, Asp102 et Ser195 forment la triade catalytique (numérotation en fonction du chymotrypsinogène). Toutefois, certains auteurs ont montré qu´il existe des différences importantes entre les peptidases à sérine, notamment concernant les résidus d´acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique (BARRETT et RAWLINGS, 1995).

Tableau I.1 : Clans et familles des peptidases à sérine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLANS	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
SB	S8	subtilisine Carlsberg (*Bacillus licheniformis*)
	S53	pseudomonapepsine (*Pseudomonas sp. 101)*
SC	S9	oligopeptidase prolyl (*Sus scrofa*)
	S10	carboxypeptidase Y (*Saccharomyces cerevisiae*)
	S15	dipeptidyl-peptidase X-Pro (*Lactococcus lactis*)
	S28	carboxypeptidase lysosomal Pro-X (H*omo sapiens*)
	S33	aminopeptidase prolyl (*Neisseiria gonorrhoeae*)
	S37	peptidase PS-10 (*Streptomyces lividans*)
SE	S11	carboxypeptidase A D-Ala-D-Ala (*Geobacillus stearothermophilus*)
	S12	carboxypeptidase B D-Ala-D-Ala (*Streptomyces* sp.)
	S13	peptidase C D-Ala-D-Ala (*Escherichia coli*)
SF	S16	protéase Ion (*Escherichia coli*)
	S24	répresseur LexA (*Escherichia coli*)
	S26	signal peptidase I (*Escherichia coli*)
	S50	protéase Vp4 de birnavirus de nécrose infectieuse pancréatique
SH	S21	assembline de cytomegalovirus (cytomegalovirus humain)
SK	S14	endopeptidase Clp (*Escherichia coli*)
SM	S41	protéase-1 C-terminal (*Escherichia coli*)
SX	S19	protéase chymotrypsin-like (*Coccidioides immitis*)
	S38	protéase PrtB putative chymotrypsin-like (*Treponema denticola*)
	S46	dipeptidyl-peptidase 7 (*Porphyromonas gingivalis*)
	S48	endopeptidase HetR (*Anabaena variabilis*)
	S49	protéase IV (*Escherichia coli*)
	S54	Rhomboïde-1 (*Drosophila melanogaster*)
PA(S)	S1	chymotrypsine A (*Bos taurus*)
	S3	togavirine (virus Sindbis)
	S6	endopeptidase à sérine spécifique IgA1 (*Neisseria gonorrhoeae*)
	S7	flavivirine (virus "yellow fever")
	S29	hepacivirine (virus de l'hépatite C)
	S30	protéinase de potyvirus P1
	S31	peptidase polyprotéine de pestivirus NS3
	S32	endopeptidase à sérine de virus équin
	S35	protéase à sérine de capillovirus
	S39	protéinase de sobemovirus
	S43	porine protéine D2 (*Pseudomonas aeruginosa*)
	S55	peptidase SpolVB (*Bacillus subtilis*)
PB(S)	S45	précurseur de la pénicilline acylase (*Escherichia coli*)
	S58	aminopeptidase DmpA (*Ochrobactrum anthropi*)
PC(S)	S51	dipeptidase E (*Escherichia coli*)

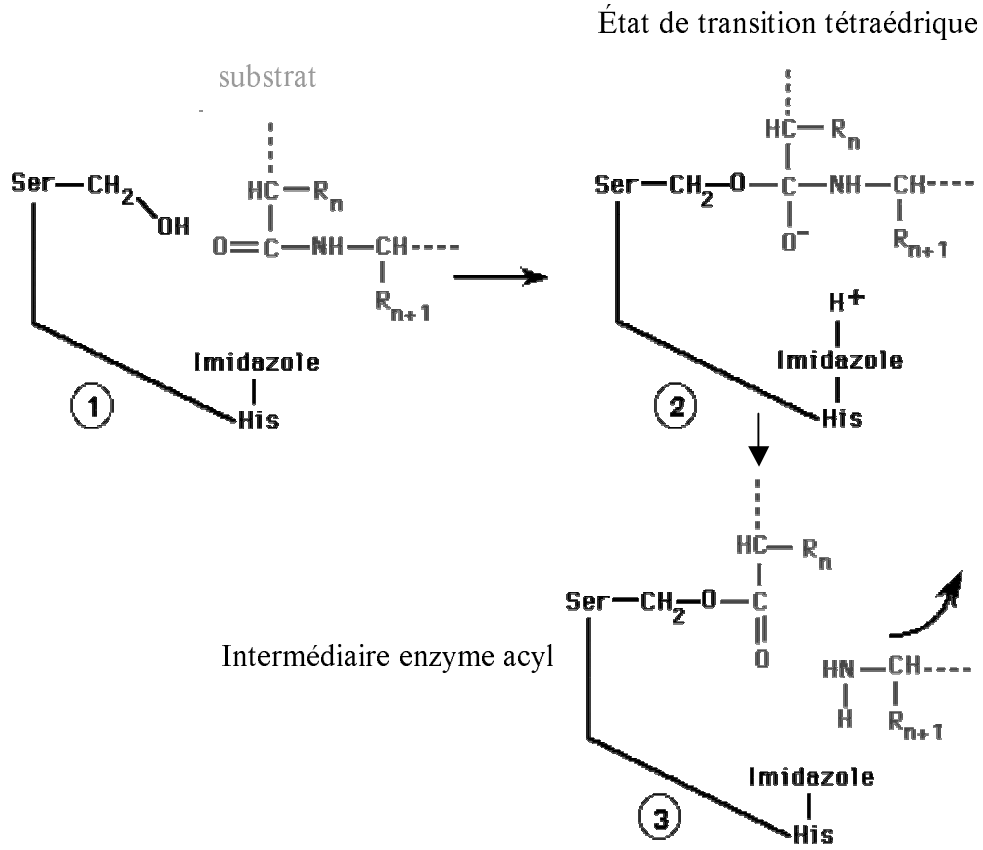
Ainsi, le mécanisme catalytique implique de manière générale, en plus du résidu sérine qui porte le nucléophile, un donneur de proton (base). Chez les clans PA(S), SB, SC et SH, le donneur de proton est un résidu histidine et il existe une triade catalytique puisqu´un troisième résidu est nécessaire, probablement en raison de l´orientation de l´anneau imidazole de l´histidine. Il s´agit le plus souvent d´un acide aspartique mais il peut s´agir d´un autre résidu histidine, comme c´est le cas pour le clan SH. Chez les clans SE et SF, c´est un résidu lysine qui possède le rôle de donneur de proton, et dans ce cas, un troisième résidu catalytique n´est pas nécessaire. Chez le clan SF, certaines peptidases ont une dyade catalytique Ser/His (BARRETT *et al*., 1998).

Quant à la catalyse à proprement parlé, elle se déroule en deux étapes (**figure I.3**). La première étape est la formation d´un intermédiaire qui est une enzyme « acyl » entre le substrat et le résidu sérine. La formation de cet intermédiaire covalent se maintient à l´aide d´un état de transition intermédiaire tétraédrique chargé négativement jusqu´au clivage de la liaison peptidique. Pendant la deuxième étape du mécanisme catalytique ou désacylation, l´intermédiaire enzyme « acyl » est hydrolysé par une molécule d´eau pour éliminer le peptide et pour restaurer le groupement hydroxyle du résidu sérine de l´enzyme. La désacylation, qui implique également la formation d´un état de transition intermédiaire tétraédrique, se déroule suivant la réaction inverse à l´acylation. Dans ce cas, c´est la molécule d´eau qui est le nucléophile et non le résidu sérine.

I.1.3. Peptidases à cystéine

Les peptidases, chez qui le nucléophile est un groupement sulfhydrique d´un résidu cystéine, sont connues comme peptidases à cystéine. Le mécanisme catalytique est similaire à celui des peptidases à sérine dans la mesure où un nucléophile et un donneur de protons (base) sont nécessaires. Le donneur de proton, chez toutes les peptidases à cystéine, est un résidu histidine (comme pour la majorité des peptidases à sérine). Bien qu´il existe l´évidence, chez certaines familles, de la nécessité d´un troisième résidu pour orienter l´anneau imidazole de l´His (rôle similaire à celui de l´Asp102 observé chez quelques peptidases à sérine), la plupart des peptidases à cystéine n´ont besoin que d´une dyade catalytique. Le mécanisme catalytique se déroule donc à travers la formation d´un intermédiaire covalent où sont impliqués les deux résidus Cys25 et His159 (selon la numérotation de la papaïne, RAWLINGS et BARRETT, 1994) qui jouent le même rôle que la Ser195 et His57. Le nucléophile est un ion thiolate qui est stabilisé par la formation d´une paire d´ion avec le groupement imidazole voisin de

Acylation



Désacylation

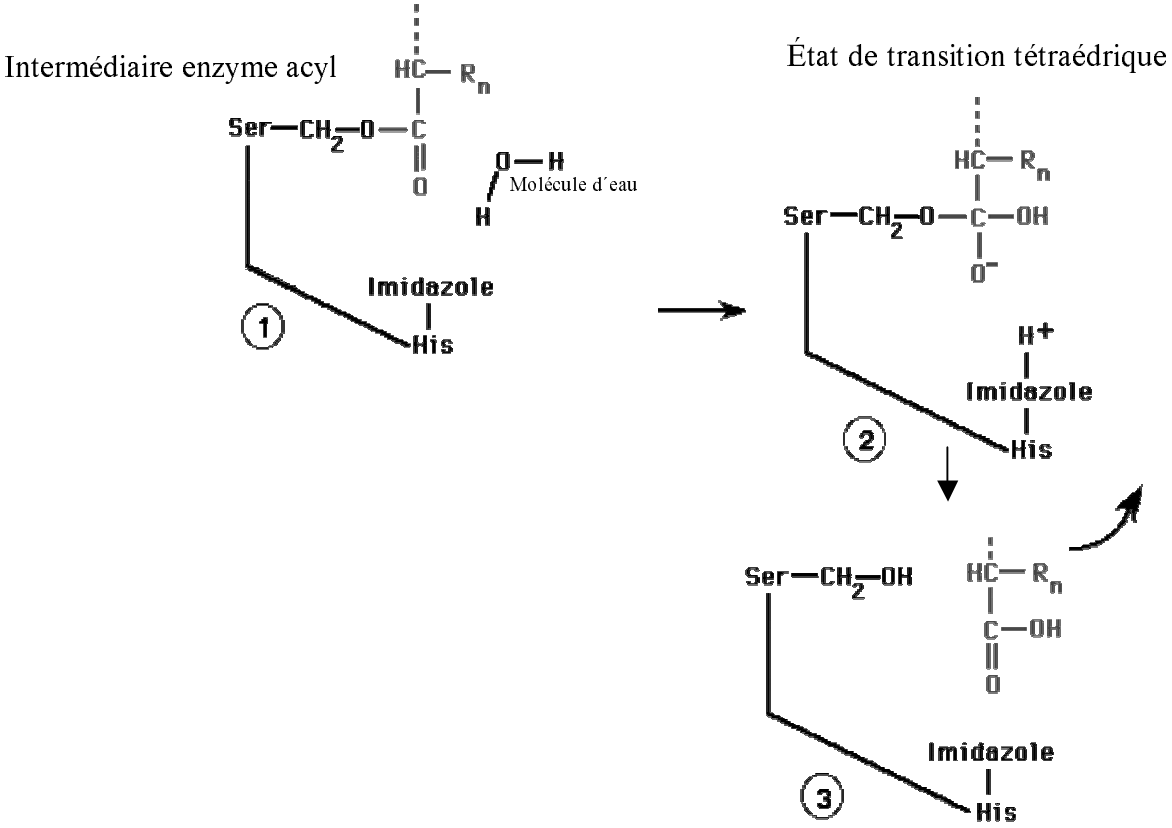


Figure I.3 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à sérine (figure disponible sur internet: http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/Images/mecaser.gif).
Le mécanisme catalytique se déroule en deux étapes, acylation et désacylation. La première étape conduit à la formation d´un intermédiaire enzyme acyl entre le substrat et le résidu sérine. Ensuite, cet intermédiaire est hydrolysé par une molécule d´eau pour éliminer le peptide et pour restaurer le groupement hydroxyle du résidu sérine de l´enzyme.

l´His159.

On rencontre les protéases à cystéine chez les micro-organismes, les plantes et les animaux. Elles semblaient être composées d´au moins 4 super-familles (BARRETT, 1986). La plus étudiée des protéinases à cystéine est la papaïne (EC 3.4.22.2), présente dans le latex de la plante *Carica papaya* et qui appartient à la super-famille à qui elle a donné son nom. Comme pour les peptidases à sérine, les connaissances se sont accélérées durant ces dernières années et se basant sur le nouveau système de classification, les peptidases à cystéine se divisent en 51 familles et 8 clans : CA, CD, CE, CF, CH, PA(C), PB(C) et PC(C). En plus de ces 8 clans, il existe un clan supplémentaire CX où sont regroupées 4 de ces familles qui n´ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (**tableau I.2**). La papaïne fait partie de la famille C1 et du clan CA. Les structures cristallographiques de la papaïne et de plusieurs peptidases de la famille C1 ont été déterminées et les résidus catalytiques ont été identifiés : cystéine, histidine et asparagine. Un quatrième résidu (glutamine) précédant le résidu cystéine semble également essentiel pour l´activité catalytique (BARRETT *et al.*, 1998).

I.1.4. Peptidases à acide aspartique

Comme nous l´avons déjà mentionné, les peptidases à acide aspartique (mais aussi à métal) sont très différentes des peptidases à sérine, à cystéine et à thréonine, dans la mesure où le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d´eau activée. Les résidus, impliqués dans le mécanisme catalytique, sont des acides aminés qui agissent comme des ligands. Les peptidases à acide aspatique sont ainsi dénommées car des résidus d´acide aspartique sont les ligands de la molécule d´eau activée (**figure I.4**). Le meilleur exemple en est certainement la pepsine, enzyme responsable pour la digestion des protéines alimentaires dans l´estomac des animaux supérieurs et qui est sans aucun doute la protéinase à acide aspartique la plus étudiée. Chez la pepsine, les chaînes latérales de deux résidus d´acide aspartique maintiennent une molécule d´eau en place. Cependant, il est possible qu´une endopeptidase de nodavirus ait pour dyade catalytique un acide aspartique et une asparagine. Chez l´endopeptidase de tetravirus, le résidu d´acide aspartique est remplacé par un résidu d´acide glutamique et il a été suggéré que chez la scytalidopepsine B, un acide glutamique remplace l´acide aspartique (BARRETT *et al.*, 1998).

Les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23) étaient divisées en deux super-familles, eucaryotes et rétrovirales, distinguées en fonction de leur taille et de leur source d´origine. Si nous considérons à présent la nouvelle classification, les peptidases à acide aspartique sont

Tableau I.2 : Clans et familles des peptidases à cystéine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLANS	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
CA	C1	papaïne (*Carica papaya*)
	C2	m-calpaïne (*Homo sapiens*)
	C6	protéinase de potyvirus "helper component" (potato virus Y)
	C7	protéinase "chesnut blight fungus virus p29 (Cryphonectria hypovirus)
	C8	protéinase "chesnut blight fungus virus p48 (Cryphonectria hypovirus)
	C9	protéinase sindbis virus-type nsP2 (Sindbis virus)
	C10	streptopaïne (*Streptococcus pyogenes*)
	C12	ubiquitine C-terminal hydrolase UCH-L1 (*Homo sapiens*)
	C16	endopeptidase 1 papaïne-like de coronavirus d´hépatite murine
	C19	protéase 14 ubiquitine-spécifique (*Homo sapiens*)
	C21	endopeptidase de tymovirus
	C23	endopeptidase de carlavirus
	C27	endopeptidase de virus rubella
	C28	protéinase du virus de la maladie "foot and mouth"
	C31	protéinase à cystéine (« lactate-deshydrogenase-elevating virus »)
	C32	protéinase à cystéine du virus équin (« equine arteritis virus »)
	C33	protéinase à cystéine du du type arterivirus équin Nsp2
	C34	endopeptidase papaïne-like de closterovirus putative
	C35	endopeptidase papaïne-like de capillovirus putative
	C36	endopeptidase papaïne-like de furovirus (« beet necrotic yellow vein virus »)
	C39	peptidase « bacteriocin-processing » (*Pediococcus acidilactici*)
	C42	endopeptidase papaïne-like (beet yellows virus)
	C47	staphopaïne (*Staphylococcus aureus*)
	C51	endopeptidase D-alanyl-glycyl (*Staphylococcus aureus*)
	C54	peptidase Aut2 (*Saccharomyces cerevisiae*)
	C58	peptidase YopT (*Yersinia pestis*)
CD	C11	clostripaïne (*Clostridium histolyticum*)
	C13	legumaïne (*Canavalia ensiformis*)
	C14	caspase-1 (*Rattus norvegicus*)
	C25	gingipaïne R (*Porphyromonas gingivalis*)
	C50	séparase (*Saccharomyces cerevisiae*)
CE	C5	adénaïne (adénovirus type 2 humain)
	C48	endopeptidase Ulp1 (*Saccharomyces cerevisiae*)
	C55	protéase YopJ (*Yersinia pseudotuberculosis*)
	C57	peptidase « vaccinia virus 17 processing » (Vaccinia virus)
CF	C15	peptidase I pyroglutamyl (*Bacillus amyloliquefaciens*)
CH	C46	protéine "hedgehog" (*Drosophila melanogaster*)
CX	C40	dipeptidyl-peptidase VI (*Bacillus sphaericus*)
	C41	protéinase à cystéine (virus de l´hépatite E)
	C53	endopeptidase de pestivirus Npro
	C60	sortase A (*Staphylococcus aureus*)
PA(C)	C3	picornaïne 3C de poliovirus-type (poliovirus type 1 humain)
	C4	endopeptidase "nuclear-inclusion-a" (potyvirus plum pox)
	C24	endopeptidase du virus 3C de la maladie hémorragique du lapin
	C30	protéase (virus de la gastroentérite transmissible porcin)
	C37	peptidase « Southampton virus-type processing »
	C38	peptidase « parsnip yellow fleck virus putative processing »
PB(C)	C44	précurseur de l´amidotransférase glutamine phosphoribosylpyrophosphate
	C45	précurseur « acyl-coenzyme A :6-aminopenicillanic acid acyl-transférase »
PC(C)	C26	hydrolase gamma-glutamyl (*Rattus norvegicus*)
	C56	endopeptidase PfpI (*Pyrococcus furiosus*)

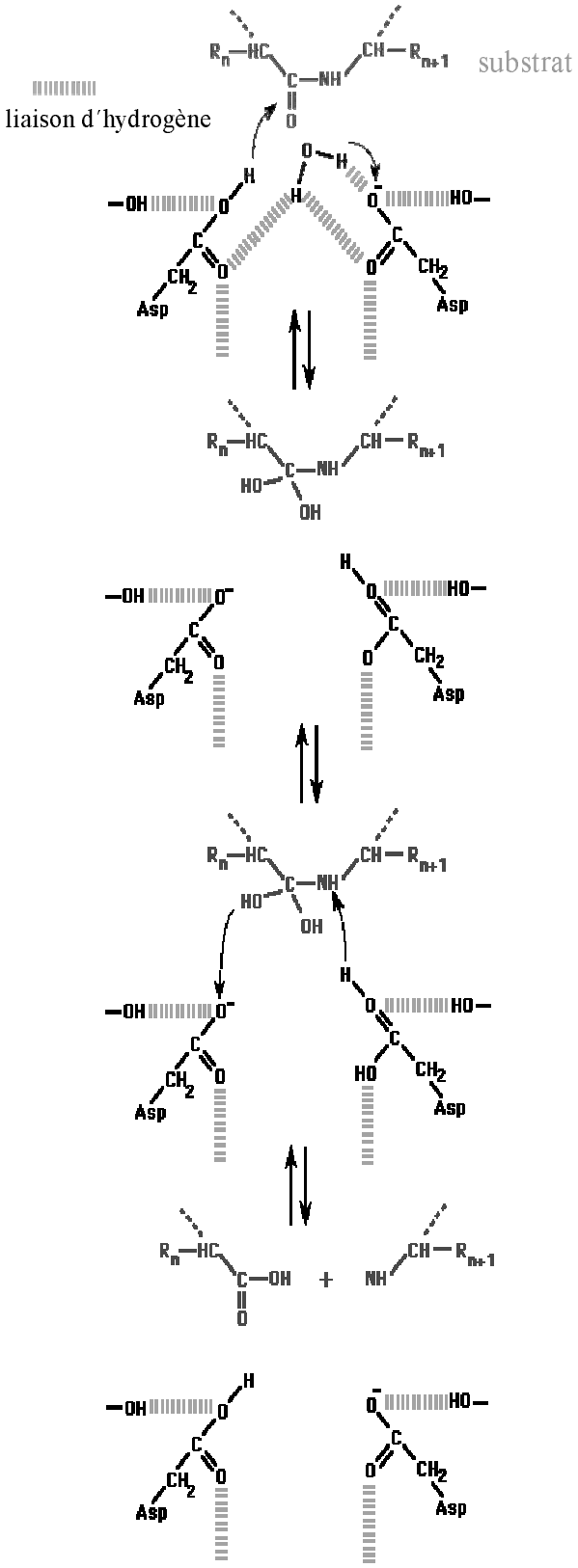


Figure I.4 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à acide aspartique (figure disponible sur internet: http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/Images/mecaser.gif).

Le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d´eau. Les résidus d´acide aspartique agissent comme des ligands.

divisées en 17 familles et en 5 clans : AA, AB, AC. AD et AF. En plus de ces 5 clans, il existe un clan supplémentaire AX, où sont regroupées 2 de ces familles qui n´ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (**tableau I.3**).

Les structures tertiaires sont connues pour seulement 5 des familles de peptidases à acide aspartique. Chez la famille A1, les enzymes possèdent une unique chaîne polypeptidique avec deux domaines structurellement similaires dont la jonction forme une fente profonde où se situe le site actif. Au contraire, les enzymes rétrovirales (famille A2) sont des dimères composés de deux chaînes polypeptidiques identiques, qui se joignent pour former le site actif de manière similaire à l´arrangement des deux domaines des enzymes eucaryotes de la famille A1. Chacun des deux résidus catalytiques d´acide aspartique contribue pour un domaine (enzymes eucaryotes) ou un monomère (enzymes de rétrovirus). La structure tertiaire caractéristique de la famille A1 est commune à de nombreuses peptidases, toutefois, ce qui est intéressant chez les peptidases à acide aspartique est que l´un des lobes a été dupliqué à partir de l´autre.

Il est également intéressant de noter que chacun des lobes est lui-même dupliqué, ce qui signifie que ces enzymes sont composées de 4 copies d´une même unité primitive (TANG *et al.*, 1978). La chymosine, protéine qui fait l´objet de notre étude, est une protéase à acide aspartique de la famille A1 (famille de la pepsine) et du clan AA. Ce clan est donc caractérisé par des protéases où le nucléophile est une molécule d´eau, celle-ci étant liée aux deux résidus d´acide aspartique de monomères ou de dimères. Toutes les protéases du clan AA sont des endopeptidases provenant d´organismes eucaryotes, de virus ou d´organismes « virus-like ».

I.1.5. Peptidases à métal

Les peptidases à métal font partie des hydrolases pour lesquelles l´attaque nucléophilique d´une liaison peptidique est réalisée par une molécule d´eau (caractéristique partagée avec les peptidases à acide aspartique comme nous venons de le voir). C´est un cation métallique bivalent, le plus souvent le zinc mais aussi parfois le cobalt ou le manganèse, qui active la molécule d´eau. L´ion métallique se maintient en place à l´aide de ligands qui sont des acides aminés des chaînes latérales, normalement au nombre de trois.

Chez de nombreuses peptidases à métal, un unique ion zinc est nécessaire mais chez certaines familles, il existe deux ions métalliques qui agissent alors de manière co-catalytique. Toutes les peptidases à métal, pour lesquelles le cobalt ou manganèse sont essentiels, ont besoin de deux ions métalliques.

Tableau I.3 : Clans et familles des peptidases à acide aspartique. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLANS	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
AA	A1	pepsine A (H*omo sapiens*), **chymosine** (*Bos taurus*)
	A2	HIV-1 rétropepsine
	A3	endopeptidase de "cauliflower mosaic virus-type"
	A9	spumapepsine (spumaretrovirus humain)
	A11	transposon Copia (*Drosophila melanogaster*)
	A12	endopeptidase de rétrotransposon bs1 (*Zea mays*)
	A16	peptidase de rétrotransposon Tas (*Ascaris lumbricoides*)
	A17	peptidase de rétrotransposon Pao (*Bombyx mori*)
	A18	protéinase putative de rétrotransposon Skippy (*Fusarium oxysporum*)
AB	A6	endopeptidase de nodavirus (virus "flock house")
	A21	endopeptidase de tétravirus (omega virus Nudaurelia capensis)
AC	A8	signal peptidase II (*Escherichia coli*)
AD	A22	préséniline 1 (H*omo sapiens*)
	A24	type IV prépiline peptidase type M1 (*Pseudomonas aeruginosa*)
AF	A26	omptine (*Escherichia coli*)
AX	A4	aspergillopepsine II (*Aspergillus niger*)
	A5	thermopsine (*Sulfolobus acidocaldarius*)

Les ligands métalliques connus chez les peptidases à métal sont les résidus histidine, acide glutamique, acide aspartique ou lysine. En plus des ligands métalliques, au moins un résidu supplémentaire est nécessaire pour le mécanisme catalytique. Il s´agit d´un acide glutamique pour la plupart des peptidases à métal, mais les résidus lysine et arginine sont également impliqués dans l´activité de certaines enzymes (BARRETT *et al.*, 1998).

Les protéases à métal (EC 3.4.24) sont très anciennes, étant largement distribuées parmi les bactéries, streptomycètes, champignons et organismes supérieurs.

Elles sont divisées en 51 familles et en 13 clans : MA(E), MA(M), MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, ML, MM, MN. En plus de ces 13 clans, il existe un clan supplémentaire MX, où sont regroupées 6 de ces familles qui n´ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (**tableau I.4**). Les peptidases des clans MA(E), MA(M), MC, MD and ME ont seulement un ion zinc catalytique. Par contre, les peptidases des clans MF, MG et MH ont des ions métalliques qui agissent de manière co-catalytique. Il s´agit du zinc ou manganèse pour le clan MF et du cobalt ou manganèse pour le clan MG.

I.1.6. Peptidases à thréonine

Ce nouveau type catalytique n´a été découvert que très récemment grâce aux recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est, en effet, un complexe de protéases impliqué dans la dégradation protéique. Il est d´une grande importance pour la croissance et la viabilité de la cellule en raison de ses fonctions dans le cycle mitotique et dans le contrôle de la demi-vie de la plupart des protéines cellulaires.

La recherche chez les procaryotes de particules ressemblant au protéasome eucaryote a conduit à la découverte d´un complexe protéolytique chez *Thermoplasma acidophilum* (DAHLMANN *et al.*, 1989). Dans un premier moment, la particule était dénommée protéinase multicatalytique (prosome) puis, le nom protéasome, qui a ensuite été proposé pour son homologue eucaryote, a été adopté. Ce nom a été choisi pour décrire son activité protéolytique (« protéa-») mais aussi sa taille et sa complexité («-some »). Les premières recherches sur les activités protéolytiques du protéasome ont conduit à des résultats controversés. Même après les mutations de tous les résidus sérine, de deux résidus histidine, de l´unique résidu cystéine et de deux résidus d´acide aspartique conservés du protéosome de *Thermoplasma*, ce dernier présentait toujours une activité enzymatique. Cela semblait indiquer que le protéosome n´appartenait pas aux groupes de peptidases “classiques”. Ainsi,

Tableau I.4 : Clans et familles des peptidases à métal. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLANS	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
MA(E)	M1	aminopeptidase (*Homo sapiens*)
	M2	peptidase unité 2 angiotensine « converting enzyme » (*Homo sapiens*)
	M3	oligopeptidase thimet (*Rattus norvegicus*)
	M4	thermolysine (*Bacillus thermoproteolyticus*)
	M5	mycolysine (*Streptomyces cacaoi*)
	M9	collagénase microbienne (*Vibrio alginolyticus*)
	M13	néprilysine (*Homo sapiens*)
	M26	endopeptidase à métal IgA1-spécifique (*Streptococcus sanguis*)
	M27	tentoxilysine (*Clostridium tetani*)
	M30	hyicolysine (*Staphylococcus hyicus*)
	M32	carboxypeptidase Taq (*Thermus aquaticus*)
	M34	facteur létal anthrax (*Bacillus anthracis*)
	M36	fungalysine (*Aspergillus fumigatus*)
	M41	endopeptidase FtsH (*Escherichia coli*)
	M47	peptidase à métal PRSM1 putative (*Homo sapiens*)
	M60	enhancine (nucléopolyhédrovirus Lymantria dispar)
	M61	glycyl aminopeptidase (*Sphingomonas capsulata*)
MA(M)	M6	inhibiteur immunitaire A (*Bacillusthuringiensis*)
	M7	snapalysine (*Streptomyces lividans*)
	M8	leishmanolysine (*Leishmaniamajor*)
	M10	collagénase 1 (H*omo sapiens*)
	M11	gamétolysine (*Chlamydomonas reinhardtii*)
	M12	astacine (*Astacus astacus*)
	M35	deutérolysine (*Aspergillus flavus*)
	M43	cytophagalysine (*Cytophaga* sp.)
	M46	pappalysine-1 (H*omo sapiens*)
	M57	prtB g.p. (*Myxococcus xanthus*)
	M64	protéase IgA (*Clostridium ramosum*)
MC	M14	carboxypeptidase A1(H*omo sapiens*)
MD	M15	carboxypeptidase zinc D-Ala-D-Ala (*Streptomyces albus*)
ME	M16	pitrilysine (*Escherichia coli*)
	M44	peptidase à métal du virus-type Vaccinia
MF	M17	endopeptidase Clp (*Escherichia coli*)
MG	M24	méthionyl aminopeptidase type 1 (*Escherichia coli*)
MH	M18	aminopeptidase 1 (*Saccharomyces cerevisiae*)
	M20	carboxypeptidase glutamate (*Pseudomonas* sp.)
	M28	peptidase mername-AA022 (*Streptomycesgriseus*)
	M42	glutamyl aminopeptidase (*Lactococcus lactis*)
MJ	M19	dipeptidase de membrane (H*omo sapiens*)
	M38	beta-aspartyl dipeptidase (*Escherichia coli*)
MK	M22	endopeptidase O-sialoglycoprotéine (*Pasteurella haemolytica*)
ML	M52	endopeptidase HybD (*Escherichia coli*)
	M63	protéase gbr (*Bacillus megaterium*)
MM	M50	protéase S2P (H*omo sapiens*)
MN	M55	D-aminopeptidase DppA (*Bacillus subtilis*)
MX	M23	beta-lytic endopeptidase à métal (*Achromobacter lyticus*)
	M29	aminopeptidase T (*Thermus aquaticus*)
	M48	endopeptidase Ste24 (*Saccharomyces cerevisiae*)
	M49	dipeptidyl-peptidase III (*Rattus norvegicus*)
	M56	peptidase BlaR1 (*Bacillus licheniformis*)
	M67	peptidase Poh1 (*Saccharomyces cerevisiae*)

la suppression de la thréonine N-terminal ou sa mutation pour une analine a conduit à l´inactivation de l´enzyme (ORLOWSKI et WILK, 2000).

Le protéasome appartient donc à cette nouvelle classe de peptidases où le résidu thréonine N-terminal fonctionne comme un nucléophile. Les peptidases à thréonine sont regroupées en 3 familles et un clan (**tableau I.5**). Ces données traduisent le fait que cette classe n´a été découverte que très récemment. Les peptidases à thréonine apparaissent en effet en petit nombre comparé aux autres peptidases.

Tableau I.5 : Clan et familles des peptidases à thréonine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLAN	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
PB(T)	T1	protéasome archaean, beta component (*Thermoplasma acidophilum*)
	T2	précurseur glycosylasparaginase (*Homo sapiens*)
	T3	gamma-glutamyltransferase 1 (*Escherichia coli*)

I.1.7. Peptidases non classées

La section 3.4.99 de la liste « EC » est réservée aux protéinases dont le mécanisme catalytique n´a pas encore été identifié. Elle peut être considérée comme une liste d´attente pour les enzymes qui, une fois purifiées et caractérisées, vont émerger comme membres d´un des autres groupes. Il existe toutefois la possibilité que ces protéinases représentent un nouvel et sixième type de mécanisme catalytique.

Si nous accédons à présent au site du Comité de Nomenclature, nous nous apercevons que toutes les peptidases regroupées dans cette section 3.4.99, qui sont au nombre de 46, ont été soit « éliminées », soit attribuées à un des types catalytiques. Par exemple, la peptidase 3.4.99.1 est devenue 3.4.23.28. Il s´agissait donc d´une endopeptidase à acide aspartique. Il est intéressant d´observer qu´environ la moitié de ces enzymes portent la mention « deleted ». Chacune de ces enzymes devaient en effet avoir déjà été « découvertes » et comme nous

l´avions déjà mentionné, une même enzyme peut se retrouver avec plusieurs dénominations, entraînant alors une certaine confusion.

En accédant au site de MEROPS, nous avons pu observer la présence de peptidases dont le mécanisme catalytique est inconnu (**tableau I.6**). Elles sont regroupées en 13 familles. A l´exception de U61 (EC 3.4.17.13), ces peptidases n´ont pas encore été incluses dans les recommendations de l´IUBMB.

Tableau I.6 : Clan et familles des peptidases à type catalytique inconnu. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

CLAN	FAMILLES	EXEMPLES DE PEPTIDASES
UX	U4	facteur de sporulation SpoIIGA (*Bacillus subtilis*)
	U6	endopeptidase muréine (*Escherichia coli*)
	U9	protéinase “prohead” (bactériophage T4)
	U32	collagénase (*Porphyromonas gingivalis*)
	U34	dipeptidase A (*Lactobacillus helveticus*)
	U39	endopeptidase 2 du virus de l´hépatite C
	U40	endopeptidase protéine P5 muréine (bactériophage phi-6)
	U48	protéase 2 CAAX prényl (*Saccharomyces cerevisiae*)
	U49	protéase Lit (*Escherichia coli*)
	U57	protéine yabG (*Bacillus subtilis*)
	U61	carboxypeptidase muramoyl-tetrapeptide (*Escherichia coli*)
	U62	peptidase Mername-AA136 (*Escherichia coli*)
	U64	endoisopeptidase Pei pseudomuréine (Methanobacterium phage psiM2)

I.2. Coagulants du lait

I.2.1. Coagulants d´origine microbienne

Les coagulants d´origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des micro-organismes capables d´induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d´origine animale. Un grand nombre de champignons sécrétent des protéases à acide aspartique dans le milieu de culture, la fonction physiologique de ces enzymes étant l´hydrolyse de protéines pour répondre aux besoins nutritionnels. Les principaux champignons, sources de protéases à acide aspartique, sont *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Rhizopus chinensis* (FUKUMOTO *et al.*, 1967), *Penicillium janthinellum* (HOFMANN et SHAW, 1964), *Mucor pusillus* (ARIMA *et al.*, 1968) et *Mucor miehei* (STERNBERG, 1971). *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei* appartiennent à la sous-division « zygomycotina », classe des « zygomycètes », ordre des « Mucorales ». *Endothia parasitica* et *Penicillium janthinellum* appartiennent à une autre sous-division « ascomycotina ». ARIMA *et al.* (1967) ont montré que *Mucor miehei* var. *Lindt*, moisissure thermophile isolée de sols chauds et humides, était l´espèce la plus productrice de protéases à acide aspartique parmi 800 autres espèces de divers micro-organismes testés.

Les enzymes produites par ces champignons sont caractérisées par une grande activité de coagulation du lait due au clivage de la caséine κ avec une activité protéolytique relativement limitée ce qui en fait des substituts de la chymosine bovine dans l´industrie fromagère. Selon STERNBERG (1976), déjà en 1974, 60% des fromages produits aux Etats-Unis étaient fabriqués avec les protéases provenant d´*Endothia parasitica*, de *Mucor pusillus* et de *Mucor miehei*. Ce rapide succès est dû en partie à leurs prix compétitifs, ne représentant que 45% du prix d´acquisition de la présure traditionnelle. Toutefois, comparée avec la chymosine, les coagulants d´origine microbienne montrent certains désavantages, dont un ratio plus petit entre l´activité de coagulation du lait et l´activité protéolytique non spécifique. De plus, ils présentent une thermostabilité plus grande qui entraîne la survie de l´activité de l´enzyme après la cuisson du caillé, conduisant alors à l´apparition de goûts indésirés pendant les périodes de maturation des fromages. En ce qui concerne ce dernier point, plusieurs groupes travaillent pour tenter de diminuer la thermostabilité de la protéase à acide aspartique de *Mucor*. YAMASHITA *et al.* (1994) ont réalisé une mutagénèse sur le champignon *Mucor pusillus* et ont pu isoler une souche de champignon mutée qui produisait une enzyme avec une thermostabilité réduite.

I.2.2. Coagulants de plantes

Les coagulants de plantes obtenus à partir du genre *Cynara* (chardon, voir **figure I.5**) ont été utilisés dès les anciens temps dans la production de plusieurs variétés de fromages au Portugal (fromages « Serra da Estrela » et « Serpa »). Les fromages produits avec ces coagulants de plantes sont considérés comme étant de grande qualité et sont très appréciés en raison de leur goût et texture particuliers. Le coagulant est obtenu à partir du style et du stigmate de la fleur et est exclusivement utilisé sous une forme séchée. Les coagulants de plantes, en général, ne sont pas considérés comme étant très adéquats pour la production fromagère en raison du faible rendement et de la qualité inférieure du produit obtenu. Le succès des coagulants de *Cynara* sp. est probablement dû aux caractéristiques uniques et spécifiques de ces enzymes. Les enzymes de *Cynara cardunculus* L. et *Cynara humilis* L. ressemblent à la chymosine par plusieurs aspects. *C. cardunculus* L. hydrolyse spécifiquement la liaison Phe_{105}-Met_{106} de la caséine κ. Le K_m de la réaction est plus faible que pour la chymosine mais une activité catalytique similaire (k_{cat}/K_m) est obtenue pour les deux enzymes (MACEDO *et al.*, 1993). Le coagulant de *C. cardunculus* L. contient deux protéases à acide aspartique dénommées cardosine A et cardosine B, cette dernière ayant une action protéolytique plus marquée. Utilisant un peptide synthétique comme substrat, VERISSIMO *et al.* (1995) ont montré que les valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour la cardosine A étaient similaires à celles obtenues avec la chymosine et que celles de la cardosine B étaient similaires à celles obtenues avec la pepsine. Chez *C. humilis*, l´unique enzyme qui a été découverte est une « cardosine A like ». L´utilisation de coagulants de plantes reste toutefois restreinte, si nous la comparons avec celle des coagulants d´origines microbienne et animale. Elle se limite à certaines régions géographiques où les coagulants issus de plantes sont utilisés pour la fabrication de fromages traditionnels.

I.2.3. Coagulants d´origine animale

Les principaux coagulants d´origine animale utilisés de nos jours pour la fabrication fromagère sont la chymosine bovine, la pepsine bovine et la pepsine porcine. Ces trois enzymes sont des protéases digestives isolées d´estomacs de veaux, de vaches adultes et de cochons. Elles peuvent coaguler le lait mais l'intérêt de la chymosine est qu'elle donne une coagulation rapide avec une protéolyse limitée. Cette dernière induite, par exemple, par la



Figure I.5: Représentation du chardon (*Cynara cardunculus*).

Le coagulant de cette plante est obtenu à partir du style et du stigmate de la fleur et est exclusivement utilisé sous une forme séchée.

pepsine conduit à une amertume dans le fromage. Dans ce chapitre, nous parlerons donc de manière plus détaillée de la chymosine bovine. La chymosine (EC 3.4.23.4) est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C´est une protéase à acide aspartique qui hydrolyse spécifiquement la liaison Phe_{105}-Met_{106} de la protéine caséine κ du lait, la clivant en deux peptides (**figure I.6**). La caséine κ normalement stabilise les micelles du lait mais quand elle est clivée, les micelles précipitent en présence de Ca^{2+} donnant des caillés.

Après que le petit-lait a été éliminé, les caillés peuvent être travaillés pour donner du fromage ou autres produits laitiers. La raison physiologique de la coagulation du lait dans la caillette du jeune animal est que le lait étant son unique aliment, les protéines du lait échapperaient à l'action protéolytique puissante des sucs stomacaux sans ce mécanisme de caillage.

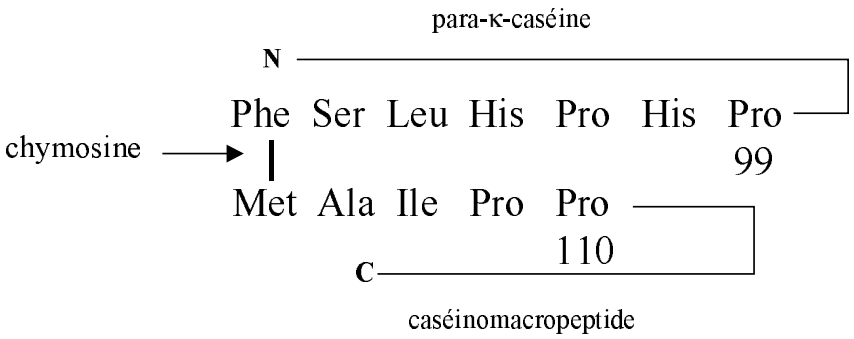


Figure I.5: Représentation schématique de l´hydrolyse de la κ-caséine par la chymosine bovine.

La chymosine hydrolyse spécifiquement la liaison Phe_{105}-Met_{106} de la κ-caséine la clivant em deux peptides, la para-κ-caséine et le caséinomacropeptide (CMP).

La chymosine, dont le poids moléculaire est de 35 kDa, est formée d´une chaîne polypeptidique de 323 résidus d´acides aminés. Elle possède trois ponts disulfure dans les positions suivantes: 45 à 50, 206 à 210 et 249 à 282 (numérotation en relation avec la pepsine). Il existe plusieurs formes de chymosine dans la présure. Les deux formes prédominantes sont la chymosine A et la chymosine B, isozymes qui diffèrent par un unique

acide aminé dans la position 302 (**figure I.7** ; FOLTMANN *et al.*, 1977). La chymosine C apparaît comme étant un produit de dégradation de la chymosine A (DANLEY et GEOGHEGAN, 1988).

L´intérêt porté à la structure de la chymosine bovine est ancien. C´est en 1945 que BERRIDGE a publié ses travaux sur la cristallisation de la chymosine à partir de solutions contenant de hautes concentrations en NaCl. Plus tard, BUNN *et al.* (1971) ont caractérisé ces cristaux et ont entrepris la détermination de leurs structures par rayons X. Ce n´est qu´en 1990 que la structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante a été résolue et raffinée à 2,3 Å (GILLIGAND *et al.*, 1990). La même année était publiée l´étude cristallographique de la chymosine mutante V111F à une résolution de 2,2 Å (STROP *et al.*, 1990). La structure de la chymosine bovine sauvage a également été déterminée à 2,2 Å (NEWMAN *et al.*, 1991). Enfin, GROVES *et al.* (1998) ont résolu la structure (1CZI) de la chymosine complexée avec l´inhibiteur CP-113972 : {(2R, 3S)-isopropyl 3-[(L-prolyl-*p*-iodo-L-phenylalanyl-S-methyl-cysteinyl)amino-4]-cyclohexyl-2-hydroxybutanoate}.

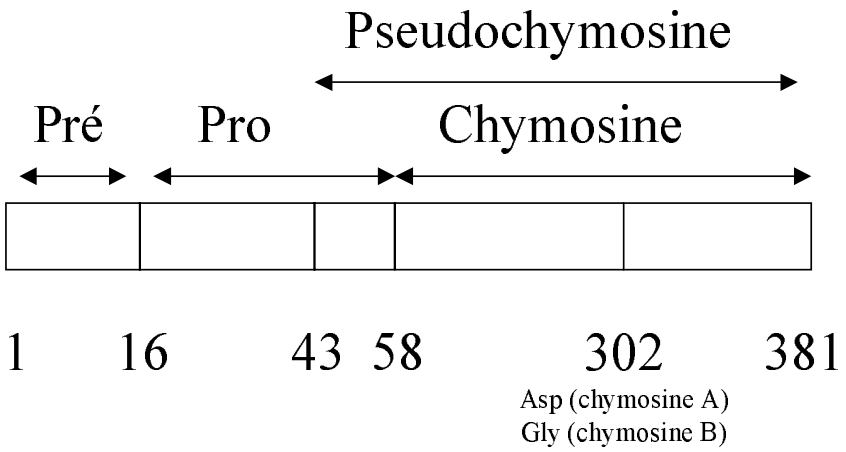


Figure I.2: Schéma de la structure de la préprochymosine. La numérotation est basée sur celle de Moir *et al.* (1982)

La structure tertiaire de la chymosine bovine (**figure I.8**) est caractéristique de celles d´autres protéases à acide aspartique comme la pepsine porcine, l´endothiapepsine et la rhizopupepsine. La molécule peut être divisée en deux lobes comprenant les résidus -2 à 171 et 172 à 326 (numérotation en relation avec la pepsine). Entre les deux lobes, il existe un sillon profond qui contient le centre catalytique et les sites d´interactions avec le substrat. Le site actif est composé de la triade hautement conservée des résidus acide aspartique, thréonine et glycine pour chacun des lobes de l´enzyme. Les deux résidus d´acide aspartique du site actif Asp32 et Asp215 se trouvent à la base du sillon. Les chaînes latérales de ces deux résidus sont impliquées dans de nombreuses liaisons hydrogène. La spécificité de la chymosine est également une conséquence de la structure des sites d´interaction avec le substrat. Nous pouvons citer l´importance du résidu Tyr75 situé sur une anse externe mobile qui recouvre le sillon du site actif, faisant partie des sites S_1 à S'_1. Ce résidu est conservé dans toutes les séquences de protéases à acide aspartique eucaryotes (NEWMAN *et al.*, 1991).

Dans la caillette du veau, la séquence d´ADN chromosomique du gène de la préprochymosine est traduite en ARN messager, processus qui, chez les organismes eucaryotes, est relativement complexe puisque le génôme contient des séquences de nucléotides que l´on ne retrouve pas dans l´ARNm complémentaire matûre. Le gène de la préprochymosine est d´environ 10,5 kb et contient 9 exons et 8 introns (HIDAKA *et al.*, 1986). Les séquences des introns sont éliminées de l´ARNm pendant le processus d´épissage. Le gène contient l´information d´une séquence signal de 16 acides aminés chez la préprochymosine qui permet le transport de la molécule du cytoplasme dans le réticulum endoplasmique. Cette séquence signal est éliminée pendant le processus de transport. La molécule de prochymosine qui en résulte est inactive du fait de la présence d´un fragment de 42 acides aminés à son extrémité N-terminale (**figure I.7**). L´existence de ce zymogène sert à stabiliser l´enzyme et à empêcher l´entrée du substrat au site actif. Au moment de l´ingestion de l´aliment, le zymogène est déchargé dans le lumen gastrique et est converti en enzyme active dans le jus acide de l´estomac. La réaction d´activation est initiée par la suppression d´interactions électrostatiques entre le prosegment et la moitié de l´enzyme active à pH acide. La conversion du zymogène dans la forme active est un processus complexe impliquant une série de changements conformationnels et de clivage de ponts peptidiques qui conduit au dévoilement du site actif et au déplacement et à la dissociation du prosegment du centre actif de l´enzyme (RICHTER *et al.*, 1998). Lorsque l´activation se déroule à un pH plus acide, par exemple 2,3, le processus conduit à la formation d´une molécule de pseudochymosine. Le fragment ainsi libéré n´est que de 28 acides aminés au lieu de 42 acides aminés (**figure I.7**).

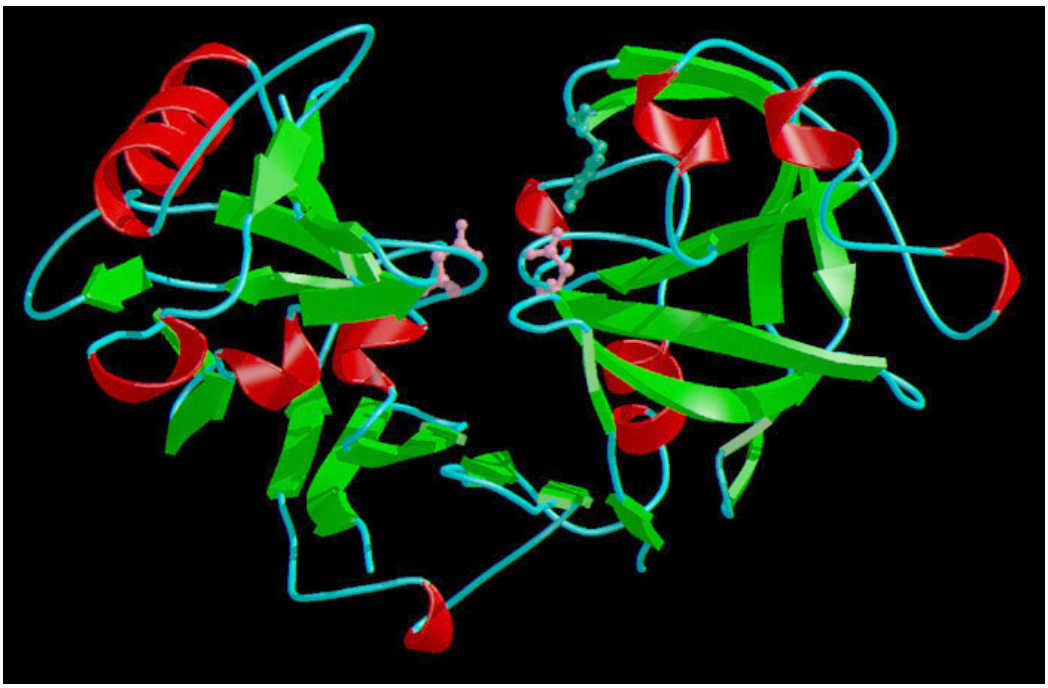


Figure I.8. : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine (figure disponible sur le site internet de MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk/).

La chymosine est une molécule bilobée avec, en son centre, le sillon du site actif.

Ce processus d´activation est beaucoup plus rapide et c´est pour cette raison que, lors des tests d´activation/activité, le pH 2,3 est utilisé.

La chymosine est toujours considérée comme étant la meilleure enzyme pour coaguler le lait pour la production fromagère. Comme nous l´avons déjà mentionné, les substituts de la chymosine qui sont utilisés dans l´industrie ont une activité protéolytique souvent marquée qui conduit alors à de mauvaises saveurs dans les fromages. Celles-ci sont provoquées par l´hydrolyse de la caséine α_{s1} et de la caséine β par l´action de ces enzymes entraînant l´apparition de peptides amers. Il a également été montré que les rendements de fromage obtenus avec les enzymes de champignons ne sont pas aussi bons que ceux de la chymosine. Ainsi, depuis les années 80, les techniques d´ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante. De nos jours, trois compagnies produisent de la chymosine recombinante à partir de trois différents micro-organismes (**tableau I.7**).

Tableau I.7 : La chymosine bovine recombinante est aujourd´hui disponible sur le marché sous trois différentes formules commerciales.

Microorganisme hôte	Nom du produit commercial	Entreprise
Aspergillus niger var *awamori*	CHYMOGEN®	Chr-Hansen (Danemark)
Kluyveromyces lactis	MAXIREN®	Gist-Brocades (France)
Escherichia coli K12	CHY-MAX®	Pfizer (Etats-Unis)

L´isolement de l´ARNm de la prochymosine a été rapportée pour la première fois par le groupe de BEPPU en 1980 (UCHIYAMA *et al.*, 1980). De ce laboratoire proviennent les premières publications sur la production de la chymosine bovine recombinante chez *Escherichia coli* (NISHIMORI *et al.*, 1982 et 1984) qui a été par la suite adoptée par d´autres

groupes utilisant *E. coli* (EMTAGE *et al.*, 1983 ; MARSTON *et al.*, 1984) mais aussi divers micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al.*, 1983 ; GOFF *et al.*, 1984), *Aspergillus spp* (CULLEN *et al.*, 1987 ; WARD *et al.*, 1990 ; DUNN-COLEMAN *et al.*, 1991 ; TSUCHIYA *et al.*, 1993), *Yarrowia lipolytica* (FRANKE *et al.*, 1988), *Proteus mirabilis* (KLESSEN *et al.*, 1989), *Kluyveromyces lactis* (VAN DEN BERG *et al.*, 1990), *Trichoderma reesei* (HARKKI *et al.*, 1989 ; UUSITALO *et al.*, 1991), *Bacillus subtilis* (PARENTE *et al.*, 1991) et chez des cellules de mammifères (KOLMER *et al.*, 1991).

La vente de ces chymosines recombinantes est permise dans de nombreux pays comme l´Australie, la Suisse, les Etats-Unis et certains pays de l´Union Européenne (la Belgique, la Grande-Bretagne, la Grèce, le Portugal). En France, la situation est différente puisque l´utilisation de la chymosine recombinante n´a pas encore été autorisée. Il faut en effet savoir que le dossier de demande d´autorisation d´emploi de la chymosine recombinante a été déposé à la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) en 1988. Malgré les jugements favorables de la Commission du génie biomoléculaire, du Conseil supérieur d´hygiène publique de France et de l´Académie nationale de médecine, sa publication officielle a été suspendue depuis 1990. Les raisons de ce blocage seraient liées à la situation particulière des fromages d´Appellation d´Origine Contrôlée (AOC) dans lesquels seule l´utilisation de la présure traditionnelle est permise. Or, comme il n´existe pas de techniques capables de distinguer dans les fromages, la chymosine native de la chymosine recombinante issue de fermentation, il est alors impossible de vérifier l´origine de la chymosine utilisée dans la fabrication de ces fromages qui bénéficient d´une appellation. Toutefois, un fabricant français peut utiliser la chymosine recombinante s´il justifie à la DGCCRF que le produit fini est destiné à un pays où son utilisation est autorisée et qu´il ne s´agit pas d´un fromage AOC (LEROY, 1997).

La chymosine produite par les micro-organismes est identique en poids moléculaire, séquence d´acides aminés, propriétés immunologiques et profil chromatographique à la chymosine naturelle (TEUBER, 1990). De nombreuses études ont montré que dans la production fromagère, le rendement et la qualité du produit fini est le même quelle que soit la chymosine utilisée (BINES *et al.*, 1989 ; BROOME et HICKEY, 1990. BARBANO et RASMUSSEN, 1992). La chymosine recombinante est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine authentique.

D´un point de vue scientifique et technologique, il n´existe pas de raisons pour que les préparations de chymosine recombinante ne soient pas utilisées pour la fabrication fromagère à partir du moment où leur disponibilité sur le marché se traduit par une offre illimitée et à des

prix compétitifs (TEUBER, 1990). Ces produits restent cependant commercialisés à un prix élevé, qui rend difficile leur utilisation par des petites et moyennes entreprises surtout dans les pays en voie de développement, tel le Brésil.

Ainsi, devant une telle situation, ce projet cherche à établir un procédé de production de chymosine bovine recombinante, permettant l'obtention d'un produit de qualité à prix compétitifs. Il intègre, en effet, un programme de collaboration franco-brésilienne concernant l'INA-PG (France), l'UFRGS (Brésil) ainsi que des entreprises brésiliennes intéressées par ces procédés. Cette collaboration a pour but l'innovation technologique permettant le maintien et le développement d'entreprises agro-alimentaires brésiliennes et des pays du Marché Economique du Cone Sud (MercoSul).

Notre premier objectif a donc été de cloner la séquence codant la préprochymosine bovine à partir d´échantillons de tissus du quatrième estomac d´un jeune veau, utilisant les techniques classiques de biologie moléculaire. Cette séquence a ensuite été introduite dans différents systèmes d´expression chez *Escherichia coli* et *Pichia pastoris*. Nous avons ainsi cloné les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B. Nous avons observé des mutations dans la partie du propeptide concernant la prochymosine A et dans la partie matûre de la protéine concernant la prochymosine B. Parallèlement à notre objectif initial, nous avons ainsi focalisé notre intérêt sur l´étude de ces différentes mutations.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Souches bactériennes et levures

Nous avons utilisé pour cette étude deux souches d'*Escherichia coli*, XL1-blue (Stratagene, La Jolla, Etats-Unis) et DH5α (Gibco BRL, Rockville, Etats-Unis), dont les génotypes sont les suivants:

XL1-blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1* lac [F'*pro*AB *lacI*^{q}ZΔM15Tn*10* (Tet^{r})]

DH5α: *SupE44*, Δ*lacU169* (F80 lacZΔM15) *hsdR17*, *recA1*, *thi-1*, *endA1*, *gyrA46 relA1*.

Ces deux souches portent le gène *lacZΔM15* qui permet l'α-complémentation, permettant ainsi la sélection des clones par criblage blanc/bleu, sur milieu contenant de l´IPTG et du XGal.

La souche de levure utilisée *Pichia pastoris GS115 his4* (Invitrogen Corp., Carlsbad, Etats-Unis) est dérivée de la souche sauvage NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) et possède une mutation dans le gène de l'histidinol déshydrogénase, qui l'empêche de synthétiser l'histidine (CREGG *et al.*, 1985). Les transformants sont ainsi sélectionnés en fonction de leur capacité à se développer sur un milieu minimum sans histidine.

P. pastoris est une levure méthylotrophe, capable de métaboliser le méthanol. La première étape du métabolisme du méthanol est son oxydation par l'alcool oxydase (AOX1) en formaldéhyde en utilisant l´oxygène moléculaire. La réaction génère du formaldéhyde et du péroxyde d´hydrogène. Le métabolisme du méthanol se déroule dans un organite cellulaire spécialisé, le péroxysome qui isole ces produits toxiques du reste de la cellule. L´alcool oxydase possède peu d´affinité pour l´oxygène et la levure *P. pastoris* le compense en produisant une grande quantité d´enzyme à l´aide d´un promoteur qui est donc fort. C'est lui qui contrôle l´expression de protéines hétérologues chez *P. pastoris*.

II.2. Plasmides

II.2.1. Plasmides de séquence

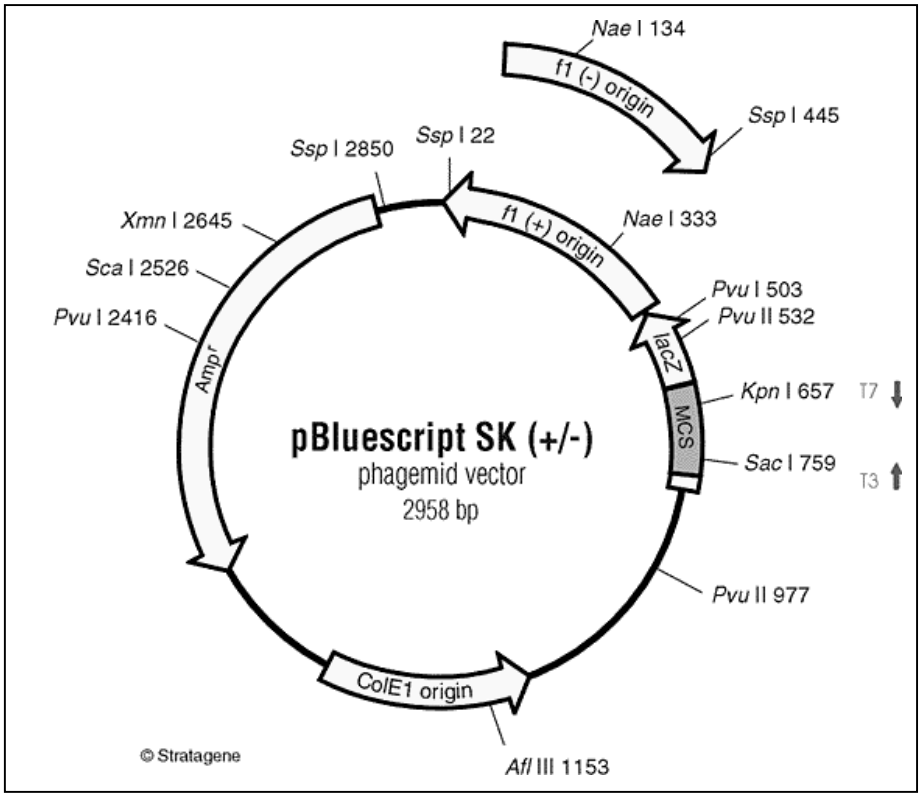
Nous avons utilisé deux plasmides de séquence, les vecteurs commerciaux pBluescript SK (Stratagene, **figure II.1A**) et pZERO-2 (Invitrogen, **figure II.1B**).

Le vecteur pBluescript SK (2958 pb) est porteur du gène LacZ permettant l'α-complémentation et donc la sélection des clones par criblage blanc/bleu. Il est également porteur du gène de résistance à l'ampicilline, marqueur de sélection. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces T3 et T7 s´hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée.

Le vecteur pZERO-2 (3300 pb) porte le gène de résistance à la kanamycine. Il permet une sélection positive des plasmides recombinants. Le gène létal *ccdB* (control of cell death) est incorporé dans le site de multiclonage du vecteur pZERO-2 et est fusionné au fragment lacZα (**figure II.1B**). La protéine CcdB inhibe la capacité de l´ADN gyrase bactérienne de réparer les coupures que cette dernière avait créées dans la molécule d´ADN double brin conduisant à la dégradation du chromosome de la cellule hôte et à la mort de celle-ci. Comme l´expression de la protéine CcdB est toxique, le vecteur pZERO-2 empêche la croissance des bactéries à moins que l'expression de la protéine de fusion lacZα-*ccdB* ne soit interrompue du fait de l'insertion d'une séquence d'ADN en son sein.

Il est important de citer ici l'existence d'un troisième plasmide, le pUC72 (**figure II.2**), construit par l'équipe du professeur Spartaco Astolfi filho de l'Université d'Amazonas au Brésil même si nous avons fini par ne pas l'utiliser. En effet, les amorces qui avaient été synthétisées pour le clonage de la préprochymosine avaient été conçues en vue d'une ligature dans ce vecteur. Ce vecteur est dérivé du plasmide pUC18 dont le site de multiclonage a été altéré pour contenir les sites de reconnaissance des enzymes de restriction *Bgl*II, *Nde*I et *Nco*I.

A



B

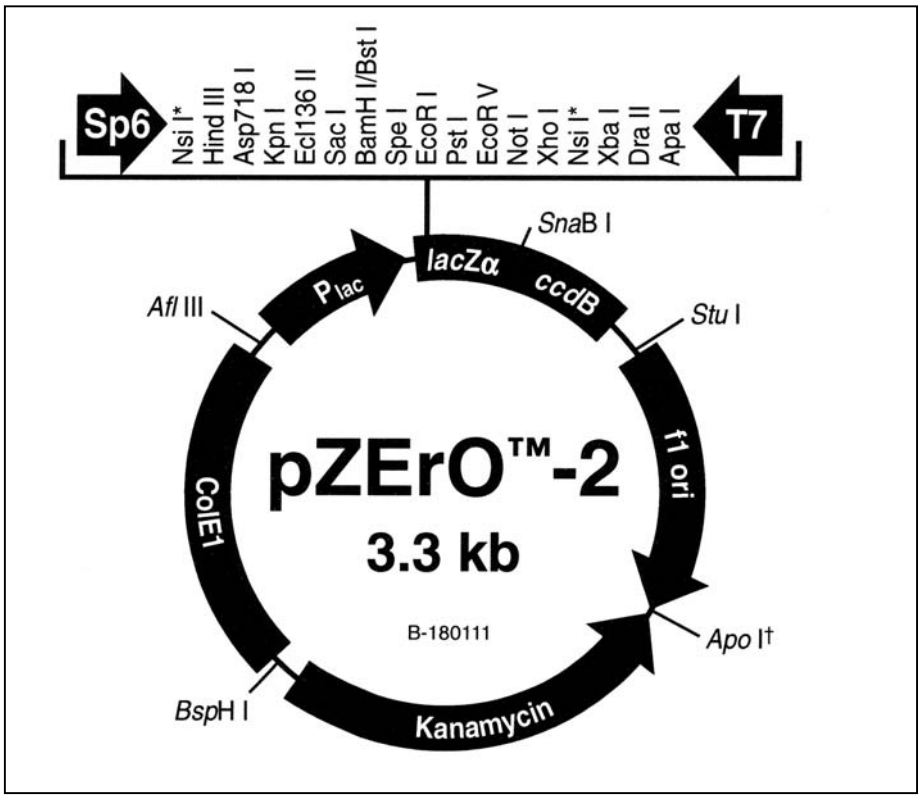


Figure II.1: Vecteurs de séquence, (A) pBluescript SK et (B) pZERO-2. Ces deux vecteurs possèdent un multisite de clonage contenant le site *EcoR*V.

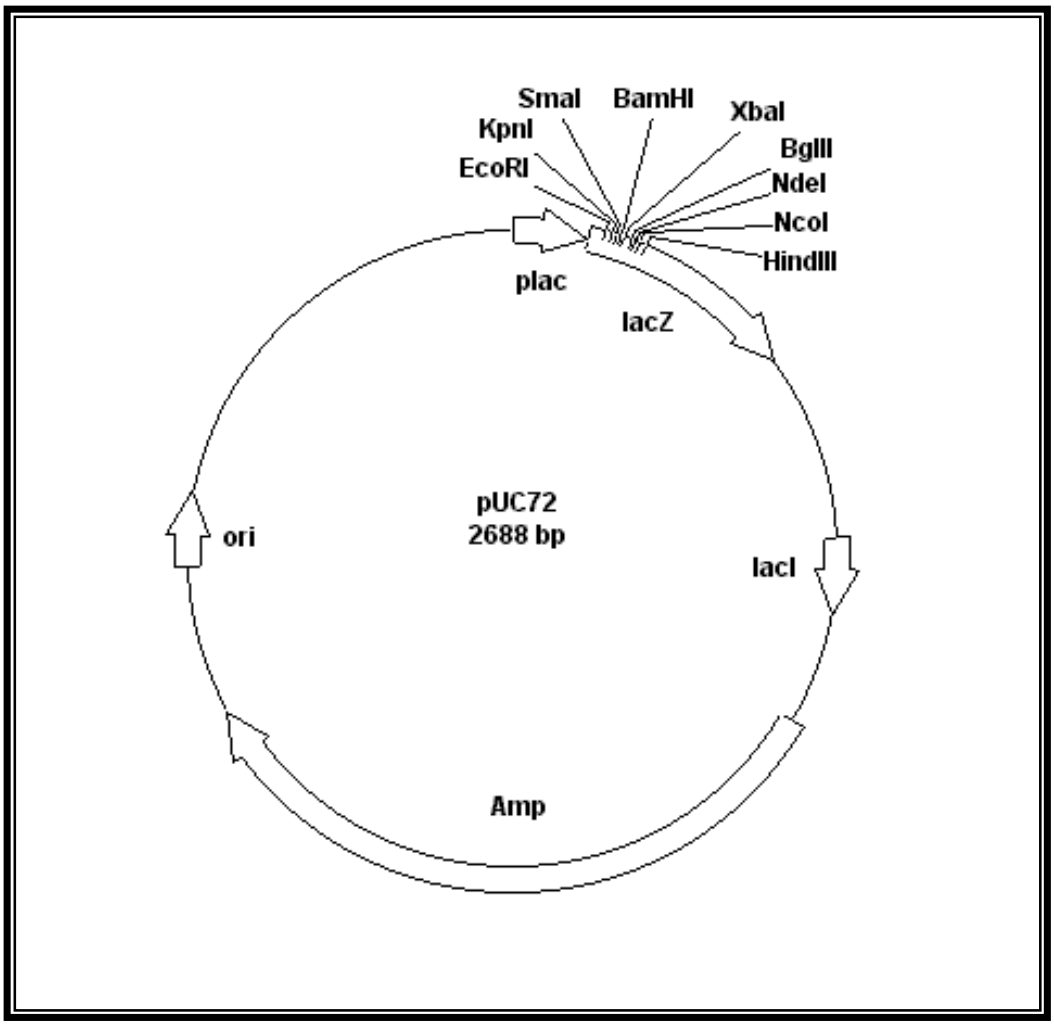


Figure II.2: Vecteur de séquence, pUC72. Ce vecteur possède un multisite de clonage contenant les sites *Nde*I et *Hind*III.

II.2.2. Plasmides d'expression

II.2.2.1. Chez les bactéries

Nous avons utilisé deux vecteurs, l'un commercial le pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède, **figure II.3A**) et l'autre, construit par l'équipe du professeur Spartaco Astolfi filho, le pTIamy (**figure II.3B**).

Le vecteur pGEX-4T-3 (4900 pb) porte le gène de résistance à l'ampicilline, seul marqueur de sélection. Il permet l'expression d'une protéine de fusion couplée à la Glutathione-S-transferase (GST) en présence d'IPTG. Il est ainsi possible d'utiliser les anticorps spécifiques contre la GST lors d'une analyse de l´expression des protéines par Western blot.

Le vecteur pTIamy (6029 pb) a été construit à partir du plasmide pUC18 auquel on a inséré le promoteur L du bactériophage lambda ainsi qu'une cassette "enhancer" (activatrice) du bactériophage T7. Il contient également le gène de l'α-amylase de *Bacillus subtilis* et le gène cI^{857} qui code pour le répresseur thermosensible du bactériophage L (BARROS *et al.*, 1996).

II.2.2.2. Chez les levures

Les deux vecteurs utilisés pour l'expression chez la levure *P. pastoris* sont le pHIL-S1 et le pPIC9 (Invitrogen, **figures II.4A** et **B**). Ces deux plasmides portent le gène *HIS4* qui complémente le gène *his4* chez l'hôte permettant la sélection des clones sur milieu minimum en absence d'histidine. Ils portent le gène de résistance à l'ampicilline, marqueur de sélection utilisé lors des premières phases de multiplication de plasmides et de clonage chez les bactéries. Ces plasmides contiennent également le promoteur du gène de l'alcool oxydase *AOX1*, qui est induit par la présence de méthanol. Le vecteur pHIL-S1 (8260 pb) et le vecteur pPIC9 (8023 pb) se distinguent au niveau du signal de sécrétion. Le vecteur pHIL-S1 porte la séquence signal de sécrétion dérivée du gène de la phosphatase acide (*PHO1*) de *P. pastoris* alors que le vecteur pPIC9 porte la séquence signal de sécrétion du facteur α de *Saccharomyces cerevisiae*, permettant ainsi la sécrétion de la protéine hétérologue. Ces deux plasmides permettent l´insertion du gène d´intérêt dans le génome de la levure par recombinaison entre des régions homologues du plasmide et du génome de *P. pastoris*. Pour cela, ces plasmides sont linéarisés car les extrémités d´ADN linéaire ont une plus grande

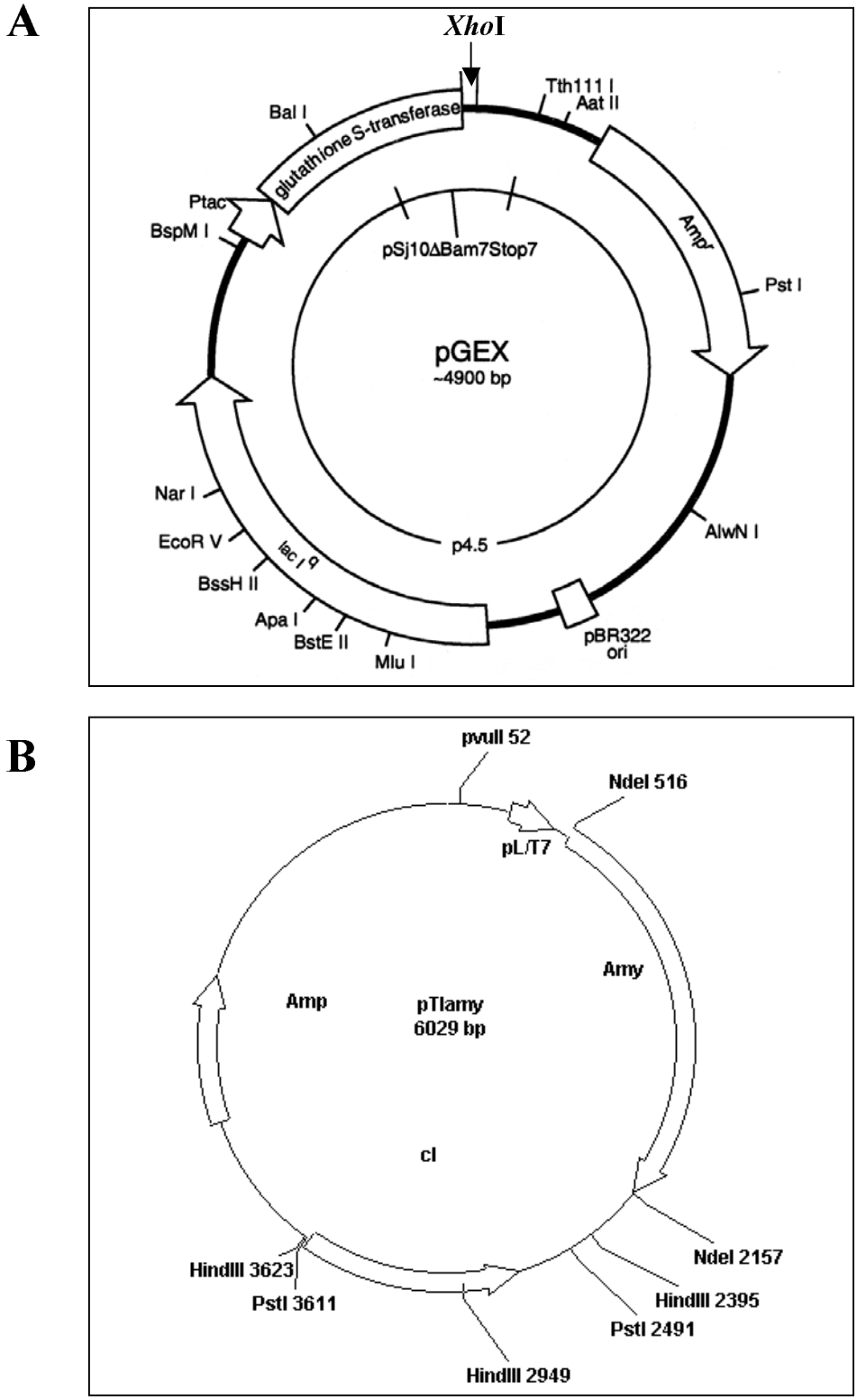


Figure II.3: Vecteurs d'expression chez *E. coli*: (A) pGEX-4T-3 et (B) pTIamy.

Dans le vecteur pGEX-4T-3, le gène d'intérêt est cloné dans le site *Xho*I situé après le gène de la glutathione S-transferase. La protéine d'intérêt est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion. Le vecteur pTIamy est digéré avec l'enzyme de restriction *Nde*I, éliminant ainsi le gène de l'α-amylase et permettant le clonage du gène d'intérêt dans ce même site.

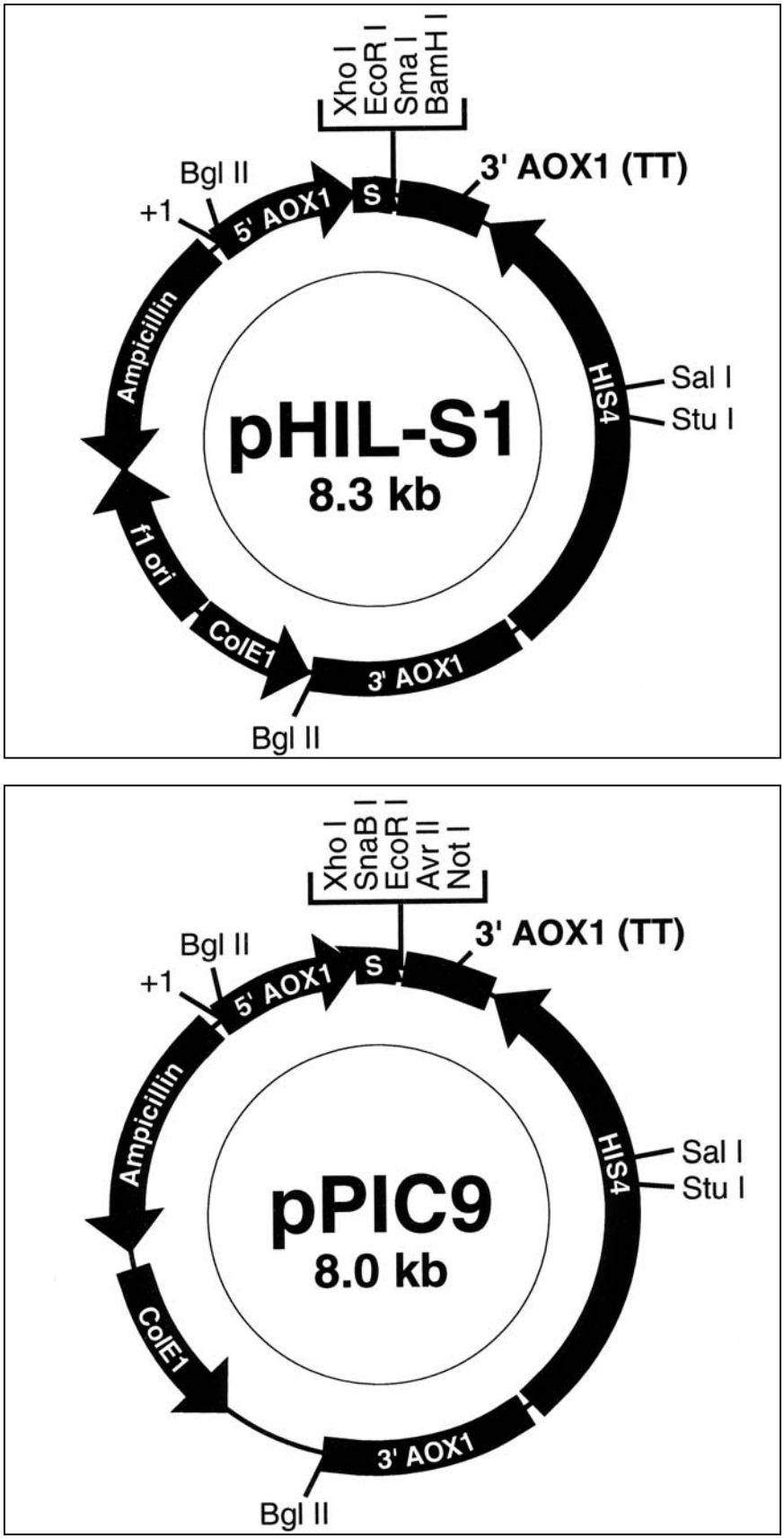


Figure II.4: Vecteurs d'expression chez *P. pastoris*, (A) pHIL-S1 et (B) pPIC9.
Le multisite de clonage du vecteur pHIL-S1 contient le site *Xho*I et celui du vecteur pPIC9, le site *Not*I, qui sont les deux sites utilisés pour le clonage de la prochymosine bovine.

probabilité de s´impliquer dans des évènements de recombinaison. En clivant avec l´enzyme de restriction *Sal*I, dont le site de reconnaissance se situe dans le gène *HIS4* du plasmide, nous favorisons l´intégration par disruption ou par insertion dans le locus *his4* de l´hôte (**figure II.5A**). Les levures recombinées auront alors un phénotype His^+Mut^+, c´est à dire qu´elles seront capables de se multiplier sur milieu minimum sans histidine et résistantes au méthanol. Alternativement, en clivant par l´enzyme de restriction *Bgl*II, nous favorisons l´intégration dans les loci *AOX1* (**figure II.5B**) générant soit des levures His^+Mut^+ dans le cas d´une simple insertion, soit des levures His^+Mut^s, sensibles au méthanol en raison du remplacement du gène *AOX1* par la cassette d´expression. Il est à noter que les phénomènes de simple "crossover" conduisant à une insertion sont plus fréquents que les phénomènes de double "crossover" qui conduisent à un remplacement du gène *AOX1* (**figure II.6A**). Les événements d´insertion multiple sont rares et ont lieu dans 1 à 10% des cas (**figure II.6B**).

II.3. Amorces

Les amorces utilisées dans ce travail sont réunies dans le **tableau II.1**. Les couples d'amorces 216/218 et 217/218 ont été synthétisées pour amplifier la préprochymosine et la prochymosine dans le vecteur pUC72. Pour cloner la séquence codant la prochymosine dans le vecteur pTIamy, il a été nécessaire d'utiliser le couple d'amorces 217/219 et enfin pour cloner la séquence codant la prochymosine dans les vecteurs d'expression chez *P. pastoris*, nous avons utilisé le couple d'amorces 65/66 pour le vecteur pHIL-S1 et le couple d'amorces 67/68 pour le vecteur pPIC9.

Nous avons également utilisé les amorces 5' et 3' *AOX1* spécifiques des vecteurs d'expression chez *P. pastoris*. Ces amorces qui s´hybrident de part et d´autre du site de clonage ont été utilisées pour vérifier la structure des différents vecteurs d´expression chez *P. pastoris* en utilisant les techniques de séquençage et de PCR. D´autre part, les amorces 5´ et 3´ *AOX1*, qui amplifient le gène *AOX1* de la levure *P. pastoris*, permettent de vérifier le génotype des transformants par PCR. En effet, si après transformation, le gène *AOX1* est maintenu, une bande de 2,2 kb (qui correspond à la taille du gène *AOX1*) doit être amplifiée. Dans la cas contraire, lorsqu´il y a remplacement du gène *AOX1* par la cassette d´expression, cette bande disparaît.

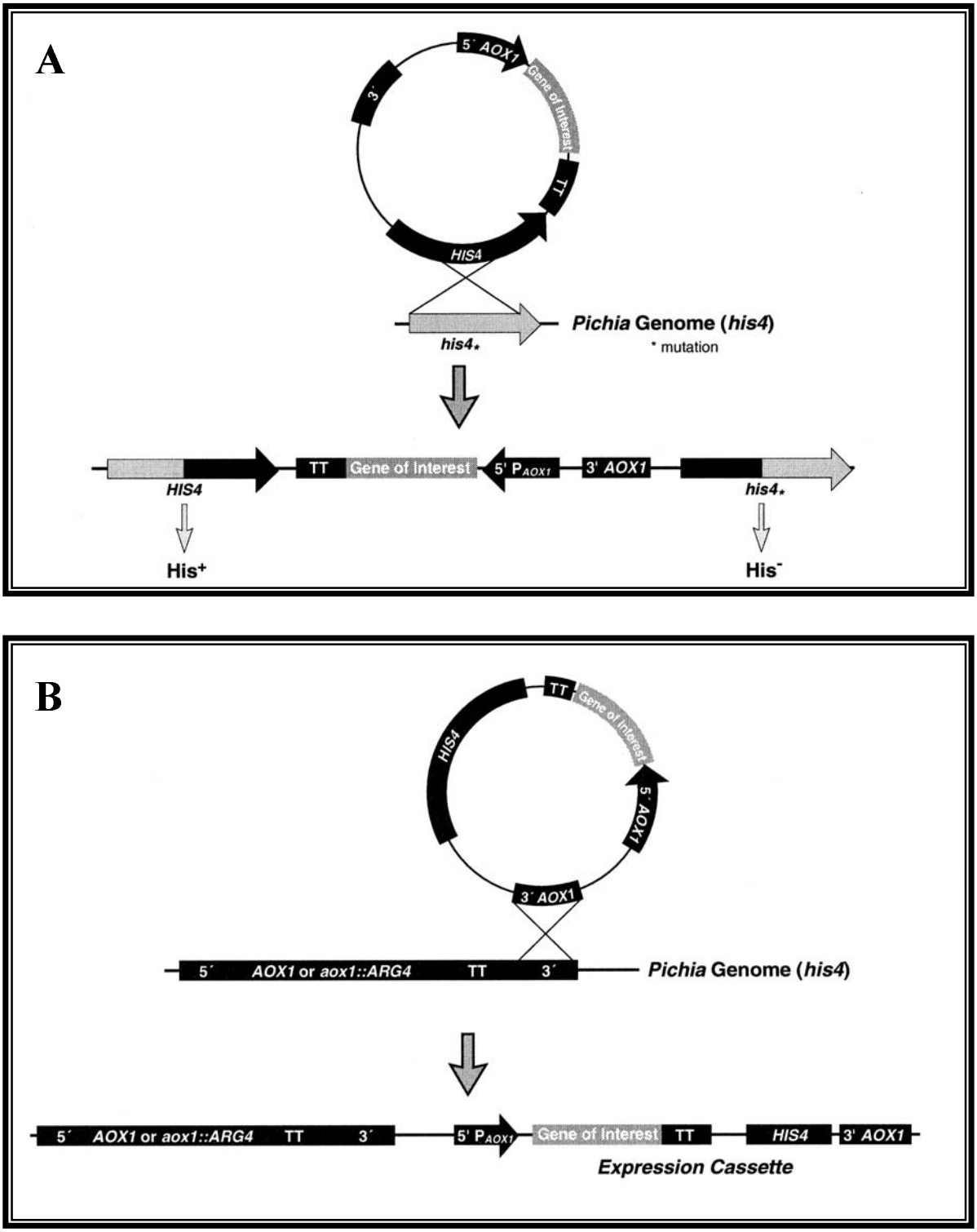


Figure II.5: Insertion du gène d´intérêt dans le génome de *P. pastoris*.

Plusieurs événements peuvent avoir lieu dont l´insertion du gène au locus *his4* (A) ou au locus *AOX1* (B) par simple "crossover" entre les séquences homologues du plasmide et du génome de la levure (selon le manuel d´expression de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* d´Invitrogen).

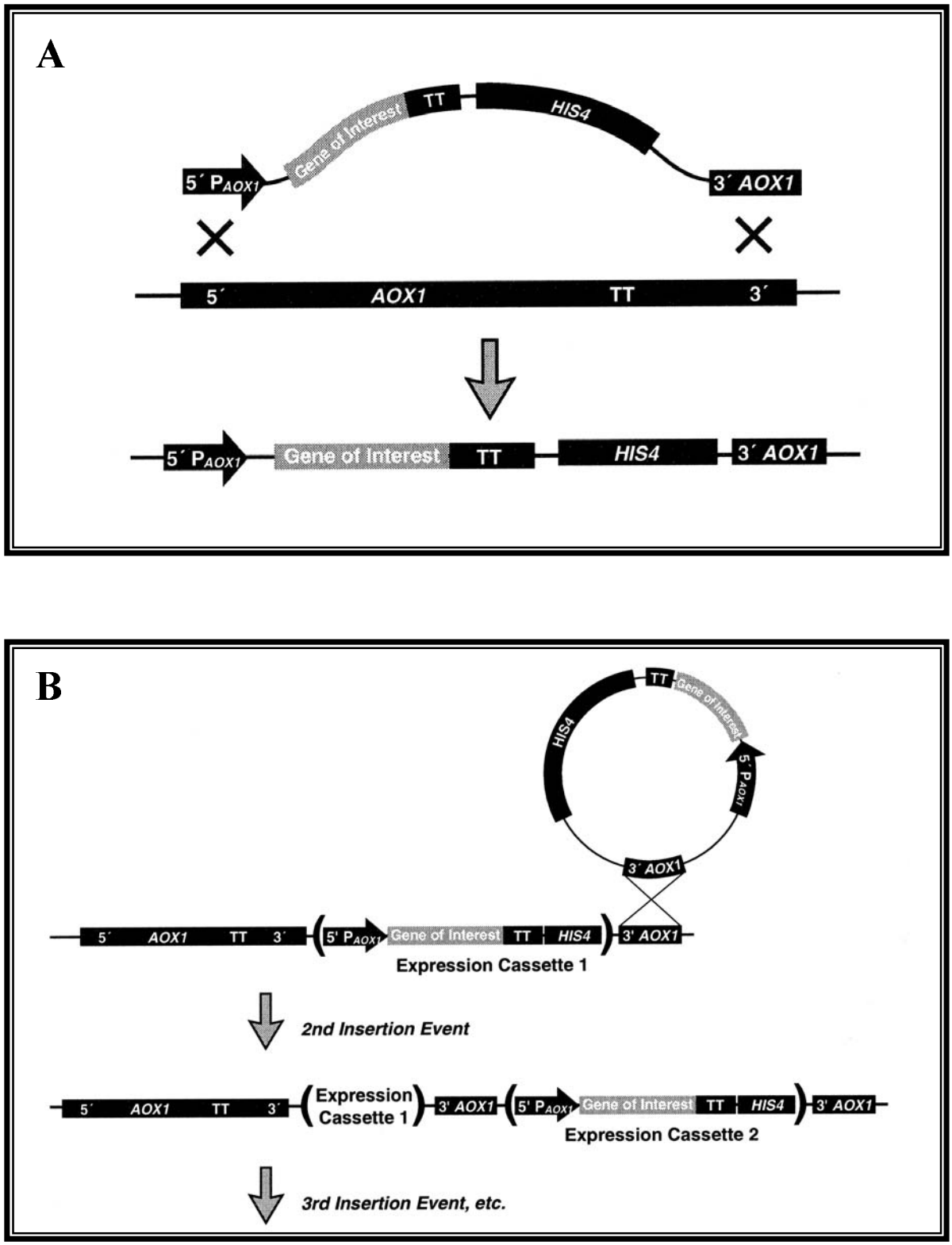


Figure II.6: Insertion du gène d´intérêt dans le génome de *P. pastoris*.

Plusieurs événements peuvent avoir lieu dont l´insertion du gène au locus *AOX1* (A) par double "crossover" qui conduit au remplacement du gène *AOX1* ou l´insertion multiple du gène d´intérêt à des loci différents (B) (selon le manuel d´expression de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* d´Invitrogen).

Tableau II.1: Amorces utilisées dans cette étude. Dans ce tableau sont détaillés les séquences en nucléotides de chaque amorce, les sites de restriction (soulignés) ainsi que les séquences protéiques correspondantes.

216: comporte un site *Nde*I
Séquence nucléique: 5´ C TCG AGT CAT ATG AGG TGT CTC GTG GTG CT 3´
Séquence protéique: Nterm Arg Cys Leu Val Val -> Cterm

217: comporte un site *Nde*I
Séquence nucléique: 5´ C CGA GTT CAT ATG GCT GAG ATC ACC AGG ATC CC 3´
Séquence protéique: Nterm Ala Glu Ile Thr Arg Ile -> Cterm

218: comporte un site *Hind*III
Séquence nucléique: 5´ C TAG AAG CTT TCA GAT GGC TTT GGC CAG CC 3´
Séquence protéique: Nterm <- Ile Ala Lys Ala Leu Cterm

219: comporte un site *Nde*I
Séquence nucléique: 5´ GCA CAT ATG TCA GAT GGC TTT GGC CAG CC 3´
Séquence protéique: Nterm <- Ile Ala Lys Ala Leu Cterm

65: comporte un site *Xho*I
Séquence nucléique: 5´ CCG AGT TCT CGA GAT ATG GCT GAG ATC ACC AGG ATC CC 3´
Séquence protéique: Nterm Met Ala Glu Ile Thr Arg Ile -> Cterm

66: comporte un site *Xho*I
Séquence nucléique: 5´ G CAG AAG CTT CTC GAG TCA GAT GGC TTT GGC CAG CC 3´
Séquence protéique: Nterm <- Ile Ala Lys Ala Leu Cterm

67: comporte un site *Not*I
Séquence nucléique: 5´ G TTC ATT GCG GCC GCT ATG GCT GAG ATC ACC AGG ATC CC 3´
Séquence protéique: Nterm Met Ala Glu Ile Thr Arg Ile -> Cterm

68: comporte un site *Not*I
Séquence nucléique: 5´ AT TTG CAG AAG CTT TGC GGC CGC TCA GAT GGC TTT G 3´
Séquence protéique: Nterm <- Ile Ala Lys Cterm

5´AOX1:
Séquence nucléique : 5´ GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3´
Séquence protéique: Nterm Asp Trp Phe Gln Leu Thr Ser -> Cterm

3´AOX1:
Séquence nucléique: 5´ GC AAA TGG CAT TCT GAC ATC C 3´
Séquence protéique: Nterm <- Phe Pro Met Arg Val Ile Cterm

II.4. Méthodes de base de Biologie Moléculaire

Nous avons choisi d'introduire dans ce paragraphe quelques méthodes de base de la biologie moléculaire qu'il est indispensable de maîtriser et dont nous nous sommes servis continuellement lors de nos expérimentations. La plupart de ces techniques sont décrites dans le livre de SAMBROOK *et al.* (1989).

II.4.1. Electrophorèse en gel d'agarose

Les électrophorèses d'ARN ou d'ADN sont réalisées en gels d'agarose à des concentrations variables. Nous avons le plus souvent utilisé des gels à 1% d'agarose. Le principe de cette méthode est basé sur le fait que les molécules d'ARN et d'ADN se comportent comme des poly-acides dont la charge est négative à pH 8,0, migrant alors, lorsqu'un champs électrique est appliqué, de la cathode (-) à l'anode (+). L'agarose est fondu dans un tampon TAE 1x (0,04M Tris-acetate, 0,001M EDTA) ou TBE 0,5x (0,045M Tris-borate, 0,001M EDTA), ce dernier étant surtout utilisé pour la migration d'ARN) auquel on ajoute du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 µg/ml. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN ou ARN et qui fluoresce quand il est excité par des rayons UV. Il permet donc de détecter au moyen d'un transilluminateur la présence d'ADN ou ARN. Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille. Nous en avons utilisé quatre : λ/*Hind*III, λ/*Hind*III/*EcoR*I, λ/*BstE*II, et λ/*EcoR*301.

II.4.2. Dosage de l'ARN et l'ADN

Les concentrations en ARN et en ADN peuvent être déterminées par spectrophotométrie à 260 nm: 1 A_{260}=50 µg/ml d'ADN double brin, 1 A_{260}=40 µg/ml d'ARN. Le rapport de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm permet d'estimer la pureté de l'ARN ou de l'ADN. Quand la valeur est inférieure à 1,8, les solutions sont considérées comme étant contaminées par des protéines.

Il est également possible de quantifier l'ADN en gel d'agarose. L'estimation de la quantité se fait par comparaison de la fluorescence de l'ADN à étudier par rapport à la fluorescence d'un ADN témoin, en général le propre marqueur de taille dont la quantité déposée est connue.

II.4.3. Préparation d'ADN plasmidique

Nous avons choisi deux méthodes pour la préparation et la purification d'ADN plasmidique. La première ("ébullition") utilisée principalement lors de la sélection de transformants après un clonage consiste en une minipréparation d´ADN et la seconde ("lyse alcaline") nous permet de purifier un ADN de meilleure qualité et en plus grande quantité, utilisée par exemple pour le séquençage ou pour un clonage.

II.4.3.1. Mini-préparations plasmidiques ("ébullition")

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant la nuit dans 2,5 ml de milieu LB (« Luria-Bertani » : 1% de tryptone (p/v), 0,5% d´extrait de levures (p/v), 1% de NaCl (p/v), pH 7,0) contenant l'antibiotique choisi, le plus souvent 100 µg/ml d'ampicilline (dans le cas du vecteur pZERO-2, nous avons utilisé 50 µg/ml de kanamycine). Le lendemain, nous centrifugeons 1,5 ml de culture à 12 000 g pendant 1 min. Les cellules sont ressuspendues dans 350 µl de solution STET (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM d´EDTA, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 5% de Triton X-100) et lysées par 5 µl de lyzozyme à 50 mg/ml. Après une incubation de 15 min dans un bain de glace, les échantillons sont placés dans un bain d'eau bouillante pendant exactement 40 secondes et centrifugées à 12000g pendant 10 min à température ambiante. Il se forme alors une partie visqueuse blanche que nous retirons avec un bâtonnet en bois stérile. La solution est alors précipitée durant 5 min à température ambiante avec 420 µl d'isopropanol et 40 µl d'acétate de sodium 3M pH 4,2. L'échantillon est alors centrifugé pendant 5 min à 12000 g à température ambiante. Le précipité est lavé à l'éthanol 70%, séché environ 15 min à température ambiante puis ressuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ. La RNase est alors ajoutée à une concentration finale de 20 µg/ml et le tout est incubé à température ambiante pendant 15 min.

II.4.3.2. Lyse alcaline

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant la nuit dans 25 ml de milieu LB contenant l'antibiotique choisi. Le protocole utilisé est une modification de la technique décrite par BIRNBOIM et DOLY (1979). Les cellules bactériennes sont centrifugées à 2000 g pendant 15 min à 4°C et sont ressuspendues dans 2,5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM. Les cellules sont alors lysées avec 3,3 ml d´une solution de NaOH 0,2N

contenant 1% SDS (p/v). On ajoute immédiatement 3,3 ml d´acétate de potassium 3 M, pH 4,8 et les cellules sont incubées 15 min dans un bain de glace. La solution est alors centrifugée à 12000 g pendant 20 min à 4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Au surnageant on ajoute 3/5 du volume d´une solution de PEG 20%, 2,5 M NaCl, le tout est alors laissé 1 h à température ambiante. Après une centrifugation à 12000 g pendant 10 min, le précipité est ressuspendu dans 200 µl d´eau MilliQ contenant 200 ng/µl de RNAse et incubé à 37°C pendant 45 min. Après une extraction avec 1 volume de phénol suivie d´une autre extraction avec un volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d´éthanol 100% et 10% d´acétate de sodium 3M pH 5,2 et laissée au moins une heure à –20°C. La solution est alors centrifugée à 12000 g pendant 10 min et le précipité est lavé avec une solution d´éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est ressuspendu dans 20 µl d´eau MilliQ.

II.4.4. Restrictions enzymatiques

Les digestions par endonucléases de restriction sont menées en microtubes. Les réactions de restriction se sont déroulées à 30°C ou 37°C selon l'enzyme utilisée. Le tampon des réactions est donné par le fournisseur en solution concentrée 10x. La durée des réactions est variable et dépend par exemple de la quantité et de la qualité de l'ADN à digérer et de la quantité d'endonucléases de restriction en solution. Nous suivons l´avancement de la réaction de digestion en faisant migrer un faible volume de la réaction sur gel d'agarose après différents temps de réaction.

II.4.5. Purification de fragments d'ADN

La purification de fragment d´ADN a été réalisée utilisant les kits: "QIAquick PCR purification kit" et le "QIAquick gel extraction kit" (Qiagen, Bâle, Suisse), le premier purifiant un fragment de PCR directement et le deuxième purifiant un fragment d´ADN à partir d´un gel d´agarose. Le principe est le même sauf que dans le cas de l´extraction de l´ADN séparé sur gel, il faut dissoudre l´agarose pour pouvoir purifier l´ADN. La solution d´ADN à purifier est donc chargée dans une colonne de silice en présence de grandes quantités de sels. L´ADN est retenu et les contaminants sont élués directement. La colonne est

ensuite lavée afin d´éliminer toutes impuretés et l´ADN pur est élué avec une solution de Tris-HCl 10 mM pH 8,5 ou de l´eau MilliQ. Le volume élué est de 30 µl.

II.4.6. Clonage

Le clonage se déroule en deux étapes. La première étape est la ligature entre le gène d'intérêt et un vecteur digérés auparavant qui aboutit à la formation d'une molécule recombinée et la deuxième est la propagation, la multiplication de cette molécule à travers la transformation d'un hôte, le plus souvent *E. coli*.

II.4.6.1. Ligature

Nous avons réalisé deux types de ligatures, la première utilisant des extrémités franches (c'est le cas du clonage de produit de PCR) et la seconde utilisant des extrémités cohésives libérées par restriction enzymatique. Dans les deux cas, le vecteur préalablement digéré avec l'endonucléase de restriction choisie est soumis à une déphosphorylation avec une phosphatase alcaline thermosensible (Gibco BRL, Rockville, Etats-Unis) pour éviter que le vecteur vide ne se recircularise lors de l'étape de ligature. Pour le clonage de produit PCR, nous avons utilisé l'enzyme *EcoR*V que ce soit dans le vecteur pBluescript ou dans le vecteur pZero-2 et pour les autres clonages, nous avons utilisé les enzymes de restriction *Nde*I, *Xho*I et *Not*I. En parallèle, le fragment d'ADN à cloner est préparé pour la ligature. Quand il s'agit d'un produit de PCR, celui-ci est soit purifié directement utilisant un kit de purification de produit PCR "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) ou en le purifiant sur gel d'agarose à l´aide d´un kit de purification d'extraction d'ADN, le "QIAquick gel extraction kit" (Qiagen).

Dans les autres cas, des plasmides sont digérés avec l'endonucléase de restriction de choix pour libérer le fragment d'ADN à cloner, qui sera purifié après électrophorèse en réalisant l'extraction de la bande d'intérêt du gel d'agarose. Afin de réaliser la réaction de ligature, les concentrations du fragment d'ADN et du vecteur sont déterminées le plus souvent par estimation sur gel après migration. Nous utilisons alors un rapport molaire de 3:1 entre l'insert et le plasmide. La ligature a lieu à 16°C pendant la nuit dans un tampon de ligature livré par le fournisseur avec 1 U de T4 DNA ligase.

II.4.6.2. Transformation d'*Escherichia coli*

Nous avons utilisé deux techniques de transformation d'*E. coli*, la transformation au $CaCl_2$ et l'électroporation.

II.4.6.2.1. Transformation $CaCl_2$

Une colonie isolée de la souche d´*E. coli* désirée est inoculée dans 1,5 ml de milieu LB et incubée durant la nuit à 37°C. Le lendemain, 25 ml de milieu LB sont inoculés avec 250 µl de ce pré-inoculum et incubés environ 3 h à 37°C sous une agitation de 200 rpm jusqu´à atteindre une A_{600} comprise entre 0,4 et 0,8. Les cellules sont alors centrifugées à 2000 g durant 15 min à 4°C et ressuspendues dans 25 ml d´une solution de $CaCl_2$ 0,1M strérile et préalablement refroidie. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Les cellules sont de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et ressuspendues dans 2,5 ml de $CaCl_2$ 0,1 M. Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, 200 µl de cellules sont utilisés pour une réaction de transformation. L´ADN est ajouté aux cellules dans un microtube et le tout est incubé 45 min dans un bain de glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42°C durant 2 min et on ajoute immédiatement 200 µl de milieu LB préalablement préchauffé à 37°C. Les cellules sont alors incubées une heure à 37°C puis étalées sur milieu sélectif pour la sélection des transformants.

II.4.6.2.2. Transformation par électroporation

Une colonie isolée de la souche d´*E. coli* désirée est inoculée dans 1,5 ml de milieu LB et incubée durant la nuit à 37°C. Le lendemain, 100 ml de milieu LB sont inoculés avec 1 ml de ce pré-inoculum et incubés environ 3 h à 37°C avec une agitation de 200 rpm jusqu´à atteindre une A_{600} comprise entre 0,4 et 0,8. Les cellules sont alors incubées 30 min dans un bain de glace puis centrifugées à 2000 g durant 15 min à 4°C et ressuspendues dans 100 ml d´eau distillée stérile glacée. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Les cellules sont de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et ressuspendues dans 50 ml d´eau. Après avoir été centrifugées, les cellules sont ressuspendues dans 2 ml de glycérol 10% (v/v) stérile et glacé. Elles sont une dernière fois centrifugées et ressuspendues dans 200 µl de solution glycérol 10% (v/v) glacé. Les cellules sont alors prêtes

à être transformées. On utilise 40 µl de cellules pour une réaction de transformation. 1 à 2 µl d´une solution d´ADN (de 10 à 50 ng) sont ajoutés aux cellules dans un microtube et le tout est transféré dans une cuvette d´éléctroporation. Les cellules sont alors soumises à l´électroporation utilisant un électroporateur (Biorad, Richmond, Etats-Unis) en réglant l´appareil sur 25 µF, 200Ω et 2,5 kV. Immédiatement après le choc électrique (d´une durée de 4,5 msec), on ajoute 500 µl de milieu SOC (2% de tryptone (p/v), 0,5% d´extrait de levures (p/v), 0,05% de NaCl (p/v), 2,5 mM de KCl, 20 mM de glucose, 10 mM de $MgCl_2$, pH 7,0) préalablement préchauffé à 37°C. Les cellules sont alors incubées une heure à 37°C puis étalées sur milieu sélectif.

II.5. Clonage de la séquence codant la préprochymosine

II.5.1. Collecte du tissus animal

Pour le clonage de la séquence codant la préprochymosine bovine, on a sacrifié un veau de race Hollandaise de deux mois non sevré. Tout de suite après la mort de l´animal, on a collecté les échantillons de tissus de la région fondique du quatrième estomac, appelé abomasum (ANDREN *et al.*, 1982). Les échantillons ont été lavés avec de l´eau MilliQ autoclavée, conditionnés en sacs plastiques et immédiatement congelés dans du N_2 liquide. Tout le matériel utilisé lors de cette étape a été préalablement stérilisé pendant 2 h à 180°C, les manipulateurs portaient des gants et tout le matériel utilisé était neuf.

II.5.2. Extraction de l'ARN total de tissus animal

Nous avons utilisé la méthode de CHOMCZYNSKI et SACCHI (1987). 0,2 g de tissus ont été broyés dans un homogénisateur autoclavé et refroidi avec 2 ml de solution D (50 g de guanidine, 58,6 ml d´eau MilliQ, 3,52 ml de citrate de sodium 0,75 M pH 7,0 et 5,28 ml de sarkosyl 10% (v/v) à 65°C stérilisé par filtration. 0,72 ml de β-mercaptoéthanol sont ajoutés avant utilisation). Le broyat de tissus est transféré dans un tube Corex autoclavé de 15 ml auquel on a ajouté 0,2 ml d´acétate de sodium 2 M pH 4,0, 2 ml de phénol et 0,4 ml de chloroforme/alcool isoamylique 24 :1 (v/v). Le tout est agité vigoureusement pendant 10 min et laissé dans un bain de glace 15 min. Le tube est agité de temps en temps pour éviter une précipitation. L´échantillon est alors centrifugé à 10000 g pendant 20 min à 4°C. La phase

aqueuse est transférée dans un autre tube Corex auquel on a ajouté 1 volume d´isopropanol. L´échantillon est alors incubé au moins 1 h à –20°C et centrifugé à 10000 g pendant 20 min à 4°C. Le précipité est ensuite ressuspendu dans 600 µl de solution D.

L´échantillon est transféré dans un microtube de 1,5 ml et précipité avec 1 volume d´isopropanol à – 20°C pendant la nuit. L´échantillon est centrifugé à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Le précipité est séché à 42°C, lavé avec 500 µl d´éthanol 75% pendant 10 min, centrifugé une dernière fois à 10000 g pendant 5 min à 4°C, séché de nouveau et ressuspendu dans 60 µl d´une solution contenant 1,2 µl de DTT 1 M, 1,5 µl d´inhibiteur de ribonucléases ARNguard à 32,6 u/µl (Amersham Pharmacia Biotech) et 97,3 ml d´eau MilliQ. La concentration d´ARN total est alors estimée par spectrophotométrie.

II.5.3. RT-PCR

L´ADNc simple brin a été transcrit directement à partir de la solution d´ARN total. 5 µg d´ARN total ont été utilisés. On a ajouté 0,66 µM d´amorces 216 et 218, 500 µM de dNTP´s, 10 mM de DTT, 0,8 U/µl d´inhibiteur de ribonucléases ARNguard, 8 U/µl de Superscript™ II RNase H⁻ (Gibco BRL) et le tampon Superscript 1X, dans un volume total de 20 µl. La réaction est réalisée à 42°C pendant 50 min puis l´enzyme est inactivée 15 min à 70°C. Afin de réaliser la synthèse du second brin de l´ADNc et l´amplification de ce dernier, 10 µl de réaction de transcriptase inverse sont utilisés pour la réaction de PCR. On ajoute 400 µM de dNTP´s, 0,4 µM d´amorces 216 et 218 (ou non), 1,5 unités de Taq polymérase et le tampon de la Taq polymérase 1X dans un volume de 50 µl. Nous avons choisi d´utiliser différentes températures d´hybridation pour augmenter la probabilité d'hybridation entre les amorces et l´ADN cible. Trois températures ont été utilisées: 45, 40 et 35°C. Le programme de PCR utilisé est donc le suivant:

94°C 1 min	
***45 °C** 1:30 min	
72°C 2 min	10x
94 °C 1 min	
***40 °C** 1:30 min	
72°C 2 min	10x
94 °C 1 min	
***35 °C** 1:30 min	
72°C 2 min	10x
94 °C 1 min	
*35 °C 1:30 min	
72°C 10 min	

II.5.4. Clonage du produit de PCR

La stratégie utilisée pour le clonage du produit de PCR est basée sur le fait que la Taq polymérase ajoute un résidu terminal dAMP aux extrémités 3´de l´ADN en fin de transcription. Ainsi, le produit PCR pourra être cloné dans un vecteur qui aura été préalablement digéré avec une enzyme de restriction qui génère des bords francs (dans notre cas *EcoR*V), et sera traité de manière à ajouter aux extrémités une extension T en 3´ (MARCHUK *et al*, 1990). Pour cela, le vecteur, après la digestion par l´enzyme de restriction *EcoR*V, est traité avec 2 mM de dTTP et 2 unités de Taq polymérase dans un volume de 20 µl pendant 2 h à 37°C. Le vecteur est alors quantifié et utilisé pour la réaction de ligature avec le produit de PCR qui aura été préalablement purifié.

II.6. Criblage des bactéries transformées

Le choix d'une méthode de criblage des bactéries transformées est basé sur le type de vecteur qui a été utilisé lors du clonage. Nous ne reviendrons pas ici sur le criblage blanc/bleu permis par exemple par le plasmide pBluescript ou sur le criblage sans "bruit de fond" (« zero background ») permis par le vecteur pZero-2. La difficulté de certains clonages réside donc dans l'utilisation de plasmides qui ne nous permettent pas d'identifier les bactéries qui contiennent le gène d'intérêt des bactéries qui ont été transformées avec le vecteur recircularisé, ce qui est en fait le cas pour la majorité des plasmides d'expression. Une des méthodes que nous avons utilisée consiste à hybrider à l´aide d´une sonde spécifique l´ADN de colonies bactériennes après leur transfert sur membranes de nylon, méthode que nous développerons donc dans ce chapitre. Il existe une autre difficulté rencontrée dans le criblage des bactéries transformées lorsqu'on utilise un clonage non orienté, c'est-à-dire lorsque qu'un unique site de restriction est utilisé, la difficulté étant alors de sélectionner les véritables clones, c'est-à-dire ceux dont le gène d'intérêt a été cloné dans le sens du cadre de lecture dans le vecteur d'expression. Pour cela, les moyens utilisés sont l'analyse des profils d´électrophorèse des vecteurs digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction et le séquençage.

Le criblage des colonies à l´aide de sondes permet donc d'identifier les clones recombinants possédant le gène d'intérêt. Après transformation, les boîtes de culture à cribler sont mises à 4°C pendant 1 heure, puis une membrane en nylon ronde est déposée sur chaque boîte pendant 5 min. Ensuite, les colonies transférées sur membranes sont lysées et leur ADN

est dénaturé en les déposant sur du papier Whatman 3MM imbibé d'une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), puis la soude est neutralisée en posant les membranes sur du papier Whatman imbibé d'une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M) pendant 5 min. Enfin, les membranes sont déposées sur papier Whatman imbibé de tampon SSC 2X. L'excès de liquide est enfin absorbé sur du papier Whatman sec et la membrane est alors placée dans un four à 80°C pendant deux heures pour fixer l'ADN. La technique utilisée pour l'hybridation est la même que nous avons utilisée pour l'analyse de Southern-blot que nous retrouvons dans le chapitre II.13.3.3. La sonde utilisée est un produit d´amplification de la séquence codant la prochymosine par PCR. Cet ADN est couplé avec de la péroxydase.

II.7. Séquençage

Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode classique de SANGER *et al.* (1977) avec le kit de la T7 polymérase (Amersham Pharmacia Biotech) utilisant le ^{35}S. Nous avons utilisé les amorces universelles et inverses de M13 car les fragments que nous avions à séquencer étaient clonés dans le vecteur pBluescript, ainsi que les amorces spécifiques de la séquence codant la préprochymosine.

Cette méthode de séquençage ne nous permettant que de séquencer environ 400 nucléotides à partir de chaque extrémité du gène (donc un total de 800) et la séquence codant la préprochymosine possédant environ 1200 pb, nous avons du réaliser un sous-clonage afin de séquencer les nucléotides restants. Les gènes ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoR*I dont le site de clivage se situe environ au milieu de la séquence codant la préprochymosine et les deux parties du gène ont été sous-clonées de nouveau dans le vecteur pBluescript ce qui nous a permis de séquencer le gène en entier.

Nous avons également utilisé la ThermoSéquénase® (Amersham Pharmacia Biotech) et les amorces spécifiques 3´et 5´*AOX1* des vecteurs pHIL-S1 et pPIC9 afin de vérifier les constructions de nos clonages dans *P. pastoris*. Finalement, nous avons exploité des résultats obtenus par séquençage automatique réalisé par MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne), par Molecular Genetics Instrumentation Facility (Athens, GA, Etats-Unis) et par le Centre de Biotechnologie (Porto Alegre, Brésil).

II.8. Expression chez *Escherichia coli*

Nous avons utilisé deux vecteurs d'expression différents, le vecteur pGEX 4T-3 et le vecteur pTIamy, que nous traiterons donc séparément. Dans le premier cas, la préprochymosine est exprimée sous forme d'une protéine de fusion avec la Glutathione-S-transferase (GST) alors que dans le second cas, la met-prochymosine est exprimée sans protéine associée. Dans les deux cas, nous avons transformé deux souches d'*E. coli*, XL1-blue et DH5α. Nous n´avons pas observé de différences de niveaux d´expression entre les deux souches.

II.8.1. Induction de l'expression

II.8.1.1. A l´aide du plasmide pGEX 4T-3

Dans ce système, la température est maintenue à 37°C. Un clone approprié est pré-inoculé dans un tube contenant 3 ml de milieu DYT (« Double Yeast Tryptone », 1,6% de tryptone, 1% d´extrait de levures, 0,5% de NaCl, pH=7,0) contenant 100 µg/ml d'ampicilline pendant la nuit. Le lendemain, un inoculum de 15 ml est réalisé dans un Erlenmeyer de 125 ml à partir de 1,5 ml de pré-inoculum et laissé à 37°C à 200 rpm. Avant de commencer l'induction, il est nécessaire que les cellules bactériennes se multiplient afin d'atteindre la phase exponentielle qui correspond à une A_{600} de 0,6 à 1. Puis, l'induction est initiée en ajoutant des concentrations variables d'IPTG, en général de l'ordre de 1 à 3 mM pendant des temps compris entre 2 et 4 heures. Des échantillons de 1 ml sont prélevés avant et après induction, centrifugés à 12000 g pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont alors ressuspendues dans 75 µl de tampon TE (Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 10 mM) et 15 µl de tampon 5x sont ajoutés (Tris-HCl 0,625 M pH 6,8, bleu de bromophénol 0,2%, SDS 2,3%, glycérol 10%, β-mercaptoethanol 5%). Les échantillons sont ainsi prêts à être séparés par électrophorèse SDS-PAGE.

II.8.1.2. A l´aide du plasmide pTIamy

Dans ce système d'expression, la température est maintenue à 30°C et l'induction est thermoinduite. C'est en effet la grande différence avec le système pGEX 4T-3 que nous venons de décrire. La première phase de multiplication bactérienne est identique mais a lieu à

30°C et enfin l'induction est provoquée par une augmentation de la température à 42°C. Dans ce cas, le temps d'induction est le plus souvent 2 heures.

II.8.2. Purification et solubilisation des corps d'inclusion

Afin de déterminer si la protéine d'intérêt est exprimée sous forme insoluble dans les systèmes d´expression utilisés chez *E. coli*, nous avons, dans un premier temps, utilisé la technique décrite par STREBEL *et al.* (1986). A partir de 5 ml de culture, nous induisons l´expression de la protéine recombinante comme décrit dans le paragraphe II.8.1. Tout le volume de culture est alors centrifugé pendant 5 min à 10000 g et les cellules sont ressuspendues dans 1 ml de tampon TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM). Les cellules sont de nouveau centrifugées à 12000 g pendant 5 min et ressuspendues dans 100 µl de solution de Tris-saccharose (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, saccharose 25%). Nous ajoutons alors, à cette solution, lysozyme et EDTA à des concentrations finales de 1 mg/ml et 100 mM, respectivement. Le tout est incubé 30 min à 37°C. Ensuite, nous ajoutons 2 volumes de solution Triton 3X (Triton X-100 0,3%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 60 mM), le tout étant incubé 15 min dans un bain de glace. L´échantillon est alors soniqué à l´aide d´un sonicateur Cole-Parmer 4710 avec 3 pulsations de 30 sec avec amplitude maximale. Le matériel était alors centrifugé à 12000 g pendant 10 min. Le surnageant (fraction soluble) est séparé et gardé à –20°C. Le précipité (fraction insoluble) est extrait séquenciellement dans des volumes de 100 µl d´urée de concentrations 1 et 7 M avec des incubations de 10 min à température ambiante. On centrifuge alors les échantillons à 12000 g pendant 10 min. Le surnageant de chacune de ces extractions a été analysé par SDS-PAGE et Western-blot.

Nous avons également utilisé la méthode décrite par NISHIMORI *et al.* (1984). Les cellules, correspondant à 10 ml de milieu induit, sont récupérées par centrifugation à 12000 g pendant 5 min et ressuspendues dans 3 ml de tampon PBS (150 mM NaCl, tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,0) avec 1 mM de PMSF, 60 µl d'EDTA 250 mM et 30 µl de lysozyme à 10 mg/ml. Le tout est incubé dans un bain de glace pendant 30 min. Les cellules sont alors soniquées comme décrit précédemment. Après cette lyse cellulaire, on ajoute de l´urée au lysat à une concentration finale de 8 M et le tout est incubé à 37°C pendant une heure. Puis, les échantillons sont dialysés contre 1 l de tampon carbonate de sodium 25 mM pH 10,0 toute la nuit pour retirer l'urée. Les échantillons sont alors dialysés une nouvelle fois contre 1 l de ce même tampon durant 8 h puis contre 1 l de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5

durant la nuit. Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont alors activés afin de tester leur activité de coagulation du lait.

II.9. Activation et tests d'activité

II.9.1. Activation de la prochymosine

Nous avons réalisé l'activation de la prochymosine recombinante soit après solubilisation des corps d'inclusion dans le cas de l'expression par *E. coli*, soit directement à partir du milieu de culture concernant l'expression par *P. pastoris*. Nous avons également réalisé l'activation de la prochymosine purifiée. Dans tous les cas, les échantillons contenant la prochymosine sont acidifiés par l'addition d'un volume de tampon glycine 0,4 M pH 2,3 et par incubation à température ambiante pendant 15 min (NISHIMORI *et al.*, 1984). Le pH est alors ajusté à 6,3 par l'addition de KOH 1M et les échantillons sont incubés pendant une heure supplémentaire à 37°C.

II.9.2. Test d'activité sur le lait

II.9.2.1. Test de coagulation du lait

Le test de coagulation du lait est réalisé dans des microtubes suivant la méthode de EMTAGE *et al.* (1983) avec quelques modifications. 50 µl des échantillons qui ont été activés sont ajoutés à 200 µl d'une solution de lait écrémé en poudre à 12% (p/v) contenant 20 mM de $CaCl_2$ et incubés à 37°C jusqu'à l'apparition d'un caillé. Une unité d'activité est définie comme la quantité de chymosine active nécessaire pour former un caillé en 10 min dans les conditions précédentes.

II.9.2.2. Test de turbidimétrie

Nous avons adapté ce test selon la méthode décrite par NUGENT *et al.* (1996). Des échantillons (10µl) contenant 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 µg de chymosines purifiées sont additionnés à 100 µl d'une solution d'acétate de sodium 200 mM, pH 5,4 contenant 10 mM de $CaCl_2$ et 0,5% (p/v) de lait écrémé. La coagulation du lait est alors suivie à 30°C et à 550 nm (changement de turbidité de la solution) à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques

SPECTRAmax250. Le temps T (en seconde) nécessaire pour atteindre une absorbance (A_{550nm}) de 0,2 est déterminé. La droite de l'inverse du temps T (1/T) en fonction de la quantité de protéine est alors tracée.

II.9.3. Test d'activité sur la caséine κ

Nous avons préparé une solution stock de caséine κ (Sigma, C0406) à 1% (p/v) dans de l'eau MilliQ ce qui correspond à une solution de 0,527 mM (masse moléculaire de la caséine κ de 18974 daltons). Nous avons vérifié la concentration protéique de la solution à l'aide du spectrophotomètre en se basant sur le fait qu'une solution de caséine κ possède un $\epsilon_{0,1\%}$ de 0,907 à 280 nm.

Les réactions d'hydrolyse de la caséine κ par la chymosine ont été réalisées dans un tampon citrate 50 mM, NaCl 75 mM pH 5,3 à 30°C (MARTIN *et al.*, 1980). Nous avons utilisé 8 concentrations de substrat, de 0,013 à 0,21 mM. Nous avons suivi le changement d'absorbance à 650 nm sur un spectrophotomètre à microplaques SPECTRAmax 250 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

II.9.4. Test d'activité sur substrat synthétique

II.9.4.1. Préparation du substrat

Nous avons utilisé l'héxapeptide chromogénique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe (Bachem, Saffron Walden, Royaume-Uni) comme substrat synthétique pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme (RAYMOND *et al.*, 1973). Seule la liaison Phe(NO_2)-Nle du peptide est hydrolysée par la chymosine. On suit l'apparition du groupement pNO_2-phényl libéré grâce à un effet bathochrome.

Nous avons préparé la solution stock du peptide selon la méthode de MARTIN *et al.* (1980). Pour cela, une solution 0,7 mM a été préparée dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,7 en laissant agiter durant la nuit à 4°C. Cette solution a ensuite été filtrée sur un filtre de 0,45 µm de Millipore et la concentration exacte de cette solution peptidique a été déterminée au spectrophotomètre en utilisant le coefficient d'absorption ϵ_{max} = 8300 ±100M^{-1} à 279,5 nm. Les réactions d'hydrolyse du peptide par la chymosine ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,7 à 30°C et le changement d'absorbance à 310 nm

a été suivi sur un spectrophotomètre à microplaques SPECTRAmax 250 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, Etats-Unis) toutes les 9 secondes.

Afin de déterminer la corrélation entre l'absorbance lue à 310 nm dans les puits des microplaques et la quantité de produit de la réaction enzymatique formé Leu-Ser-Phe(NO_2), nous avons préparé une solution de produit de réaction en ajoutant à 0,3 mM de substrat, 2 mg de chymosine bovine non recombinante purifiée de Sigma la laissant toute la nuit à 30°C. Puis, nous avons réalisé une lecture de l´absorbance de cette solution au spectrophotomètre UV-160A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) à 310 nm avec $\Delta\epsilon$=1000±100$M^{-1}.cm^{-1}$ qui nous a alors permis de déterminer la concentration en produit de cette solution. Enfin, nous avons réalisé cette même lecture d´absorbance à l´aide du spectrophotomètre à microplaques ce qui nous a permis de calculer la corrélation qui existe entre les lectures d´absorbance à 310 nm à l´aide du spéctrophotomètre et du spéctrophotomètre à microplaques et la quantité de produit formé.

II.9.4.2. Activité sur substrat synthétique en fonction du pH

SALESSE et GARNIER (1976) ont étudié l´effet du pH sur l´activité de la chymosine sur l´héxapeptide chromogénique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe. En effet, le pH de la solution affecte d´une part les groupes catalytiques de la chymosine et d´autre part le spectre d´absorbance des produits d´hydrolyse. La **figure II.7** illustre le changement du coefficient molaire d´absorption $\Delta\epsilon$ à 310 nm du produit d´hydrolyse du peptide synthétique par la chymosine en fonction du pH. C´est en fonction de ces données que nous avons alors déterminé le $\Delta\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$) pour les différents pH utilisés dans notre étude :

pH	2,7	3,0	3,2	3,5	3,7	4,0	4,2	4,5	4,7	5,0	5,2
$\Delta\epsilon_{310\ nm}$	300	382	473	564	664	755	850	945	1000	1082	1145

Ces changements de coefficients molaires seront pris en compte lors des calculs des vitesses initiales à chaque pH étudié. Pour étudier l´effet du pH, nous avons utilisé une unique concentration de substrat, 0,4 mM. De plus, la solution de substrat utilisée dans cette étude a été préparée dans un tampon d'acétate de sodium 10 mM pH 4,7 (et non 100 mM comme nous venons de le décrire) pour minimiser l´effet tampon de cette solution de substrat dans la réaction enzymatique et pouvoir atteindre les valeurs de pH souhaitées. Nous avons utilisé

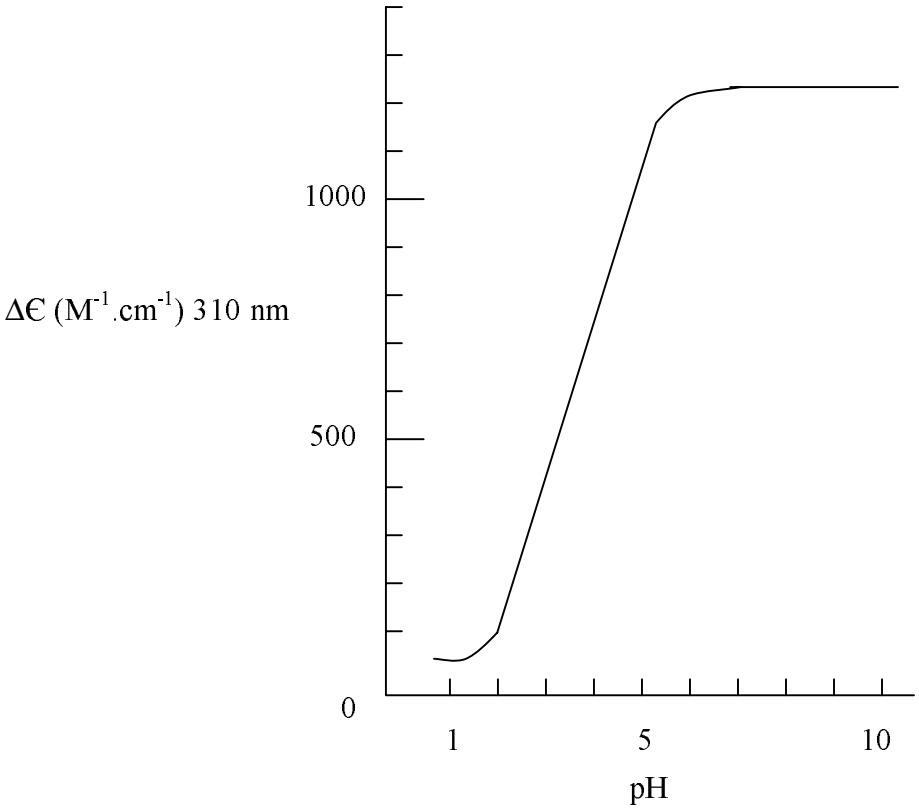


Figure II.7: Changement du coefficient molaire d'absorption à 310 nm des produits d'hydrolyse du peptide synthétique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe par la chymosine en fonction du pH (SALESSE et GARNIER, 1976).

différents tampons de réactions. Pour obtenir des pH inférieurs à 4, nous avons utilisé des tampons de formate de sodium 300 mM (pH 2,7, 3,0, 3,2, 3,5, 3,7 et 4,0) et pour les pH supérieurs à 4, nous avons utilisé des tampons d´acétate de sodium 300 mM (pH 4,2, 4,5, 4,7, 5,0 et 5,2).

Ainsi, de la même manière, nous avons suivi le changement d´absorbance à 310 nm sur un spectrophotomètre à microplaques SPECTRAmax 250.

II.9.5. Analyses des données

Les calculs des vitesses initiales d´hydrolyse du peptide synthétique et de la caséine κ ont été réalisés à l´aide du programme SOFTmax®PRO version 3.1.2 (Molecular Devices). Nous avons obtenu les paramètres cinétiques de la chymosine K_m et V_m à l´aide du programme Slide Write Plus (Advanced Graphics Software Inc., Encinitas, CA, Etats-Unis) utilisant deux méthodes. La première méthode est un ajustement non linéaire des données expérimentales à l´équation de Michaelis-Menten basée sur l´algorithme de Levenberg-Marquardt. La seconde méthode employée est basée sur la représentation graphique d´Eadie-Hofstee. Comme il n´est pas possible de titrer le site actif de la chymosine (absence d´inhibiteur spécifique), nous avons calculé les valeurs de k_{cat} en nous basant sur l´estimation de la concentration enzymatique utilisant la valeur $\epsilon_{1\%}$ 1 cm de 14 pour une solution de chymosine B purifiée (ROTHE *et al.*, 1976).

II.9.6. Thermostabilité

Afin de tester la thermostabilité des différentes chymosines, des échantillons (10µl) de chymosines purifiées ont été placés à 40°C et à 50°C pendant 1, 5, 10, 15, 20, 30 et 60 min. Les échantillons ont alors été placés dans un bain de glace pendant 5 min avant de tester leur activité de coagulation du lait à 37°C comme décrit précédemment dans le chapitre II.9.2.

II.10. Analyses par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et immuno-empreintes (Western-blot)

Les protéines ont été analysées par SDS-PAGE utilisant des gels de 10% et 12,5% avec un gel de concentration de 5% (LAEMMLI, 1970). Les gels sont colorés avec du bleu de

Coomassie G250. Pour les analyses de Western-blot, les échantillons sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose sous une tension de 70V pendant 1h15 min à 4°C dans un tampon carbonate de 12 mM pH 9,9 (DUNN, 1986). La membrane de nitrocellulose est alors bloquée avec une solution BLOTTO de 5% pendant 1 h à température ambiante. Le sérum de lapin anti-chymosine (1:600) est incubé dans la solution de BLOTTO 5% durant la nuit à 4°C. L'excès d'anticorps est éliminé en réalisant trois lavages successifs de 10 min dans une solution de BLOTTO 5%. Ensuite, le conjugué peroxydase anti-IgG de lapin est incubé pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages successifs de 10 min avec du tampon PBS, le chromogène et le substrat sont additionnés (5 mg de 3,3'-diaminobenzidine dans 30 ml de PBS avec 150 µl d'H_2O_2 et 100 µl de $COCl_2$ 1% p/v) et incubés jusqu'à l'apparition de bandes (TOWBIN *et al.*, 1979 ; BURNETTE, 1981).

II.11. Anticorps polyclonaux anti-chymosine

II.11.1. Obtention des anticorps

Pour obtenir des anticorps de lapin anti-chymosine, nous avons dans un premier temps procédé à la purification de la protéine afin de pouvoir immuniser le lapin. Pour cela, 0,5 g de chymosine bovine recombinante de la marque MAXIREN de Gist-Brocades sous forme de poudre a été diluée dans 5 ml de tampon histidine 20 mM pH 5,8 puis dialysée contre ce même tampon. L'échantillon a alors été appliqué sur une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech) équilibrée avec le même tampon de l'échantillon et les protéines adsorbées ont été libérées avec un gradient de NaCl de 0 à 1 M. Nous avons alors testé la présence de la chymosine dans les fractions par électrophorèse en gel SDS et test de coagulation du lait. 5 fractions ont été retenues et la pureté de la protéine a été jugée suffisante pour l'immunisation du lapin. Un test ELISA a été réalisé avant l'immunisation afin de s'assurer que le lapin ne possédait pas d'anticorps anti-chymosine. Le lapin a alors été immunisé par injection sous-cutanée avec une première dose de 100 µg de protéine purifiée émulsionnée dans 500 µl d'adjuvant complet de Freund. Après 15 jours, une deuxième dose de 100µg de protéine est injectée, émulsionnée avec l'adjuvant incomplet. Une troisième dose est appliquée 15 jours après et enfin un rappel intraveineux est réalisé 15 jours après la troisième immunisation. Le lapin a été alors sacrifié une semaine après ce rappel soit environ

1 mois et demi après la première immunisation. Le sérum est préparé à partir du sang récupéré puis est testé avec le test ELISA et par Western blot.

II.11.2. Adsorption des anticorps polyclonaux avec un lysat d'*Escherichia coli*

Les préparations d'anticorps polyclonaux contiennent souvent des anticorps qui sont réactifs avec les protéines d'*E. coli*. Ces anticorps contaminants augmentent le bruit de fond des analyses par Western-blot affectant leur sensibilité. Pour éliminer ce problème, il est possible d'adsorber les anticorps polyclonaux avec un lysat d'*E. coli*. Dans ce protocole, le lysat bactérien est dans un premier temps lié à des membranes de nitrocellulose. La solution d'anticorps polyclonaux est alors incubée avec ces membranes afin d'adsorber les anticorps contaminants.

II.11.2.1. Préparation du lysat bactérien et saturation des membranes de nitrocellulose

Une colonie isolée de la souche d'*E. coli* XL1-blue est inoculée dans 10 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml de tétracycline et incubée durant la nuit à 37°C. Le lendemain, 90 ml de milieu LB sont inoculés avec les 10 ml de ce pré-inoculum et incubés 3 h à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Les cellules sont centrifugées à 5000 g pendant 15 min à 4°C et sont ressuspendues dans 7,5 ml de tampon TE (Tris-HCl, pH 8,0, EDTA 10 mM) avec 400 µl de SDS 10%. Les échantillons sont alors placés dans un bain en ébullition pendant 5 min. Cette préparation est diluée 5 fois dans un tampon PBS (150 mM NaCl, tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,0).

Nous immergeons alors 5 membranes de nitrocellulose dans cette solution de lysat bactérien pendant 30 min à température ambiante en agitant de temps en temps. Nous retirons alors les membranes et les laissons sécher sur du papier Whatman. Les membranes sont alors lavées 3 fois avec 50 ml de tampon PBS pendant 5 min et placées dans 50 ml de solution BLOTTO de 5% pendant 1 h à température ambiante sous agitation.

II.11.2.2. Epuisement des anticorps non spécifiques

Les membranes sont lavées 3 fois avec du tampon PBS. La solution d'anticorps polyclonaux est diluée 5 fois dans du tampon PBS et une membrane y est immergée sous

agitation pendant 10 min à 37°C. On retire cette membrane et immerge une autre membrane en continuant l´incubation. Nous répétons ces étapes jusqu´à utiliser les 5 membranes de nitrocellulose. Nous récupérons alors la solution d´anticorps, prête à être utilisée.

II.12. Détermination de la concentration protéique

Trois méthodes ont été utilisées pour déterminer la concentration protéique de nos échantillons. La première est la lecture de l´absorbance des échantillons à 280 nm, la seconde est la méthode de dosage de Bradford et enfin la troisième est la méthode BCA.

II.12.1. Spectrophotométrie

L'absorbance à 280 nm est une caractéristique physique de la tyrosine et du tryptophane qui possèdent un noyau aromatique chromophore. Leur présence permet de détecter une molécule protéique à cette longueur d'onde de 280 nm et aussi d'en déterminer la concentration utilisant la valeur $\epsilon_{1\%}$ 1 cm de 14 pour une solution de chymosine B purifiée (ROTHE *et al.*, 1976). Les absorbances sont lues à l´aide d´un spectrophotomètre UV-160A (Shimadzu).

II.12.2. Méthode de Bradford

En se fixant sur le bleu de Coomassie, une protéine déplace le spectre d'absorbance du bleu de Coomassie de 465 nm à 595 nm. Le complexe ainsi formé est stable pendant 5 à 10 minutes et son absorbance peut ainsi être mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations connues et croissantes (0 à 70 µg) de la protéine de référence (BSA) associée au bleu de Coomassie. La corrélation de la mesure de l'absorbance du complexe de concentration inconnue avec la gamme d'étalonnage permet la quantification de la solution en protéine. Le réactif utilisé est le produit "Coomassie Protein Assay Reagent" (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Etats-Unis). Les réactions sont réalisées dans des plaques ELISA et sont dupliquées. Les absorbances sont lues à l´aide d´un spectrophotomètre à microplaques SPECTRAmax 250 (Molecular Devices).

II.12.3. Méthode BCA

Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA) et sur la réduction de l'ion Cu^{2+} en ion Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin. Le produit de la réaction est formée par la complexation (chélation) de deux molécules de BCA avec un ion Cu^{+}. Ce complexe montre une forte absorbance à 562 nm qui est reliée linéairement avec l'augmentation de la concentration protéique. De la même manière que pour la méthode de Bradford, une courbe d'étalonnage est réalisée avec de la BSA. Les réactions sont réalisées en plaques ELISA et sont dupliquées. On ajoute 10 µl d'échantillon à 200 µl d'un mélange des réactifs A et B du "BCA Protein Assay Kit" (Pierce) puis on incube pendant 30 min à 37°C. Le mélange du réactif A (acide bicinchoninique) avec le réactif B (sulfate de cuivre) est réalisé dans une proportion de 50 pour 1. Les absorbances sont lues à l´aide d´un spectrophotomètre à microplaques SPECTRAmax 250 (Molecular Devices).

II.13. *Pichia pastoris*

Toutes les méthodes de manipulation de *P. pastoris* sont regroupées dans le « manuel des méthodes d´expression de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* » (Invitrogen).

II.13.1. Transformation de *Pichia pastoris*

La méthode que nous avons utilisée pour la transformation de *P. pastoris* est l'électroporation, choisie pour être l'une des plus efficaces et aussi l'une des plus simples à mettre en oeuvre.

II.13.1.1. Préparation de cellules compétentes pour l'éléctroporation

De la même façon que pour les bactéries, les cellules de levures doivent être "préparées" à recevoir l'ADN exogène, les rendant "compétentes". Le principe de préparation de cellules compétentes de levures est très semblable à celui utilisé dans le cas d'*E. coli*, utilisant des lavages successifs à l'eau glacée. 500 µl d'un pré-inoculum de 5 ml de *P. pastoris GS115* réalisé durant la nuit à 30°C, sont utilisés pour inoculer 500 ml de milieu YEPD (« Yeast Extract Peptone Dextrose » : 2% de peptone (p/v), 1% d´extrait de levures (p/v), 2% de glucose) frais dans un erlenmeyer de 2 litres. Cette culture est laissée de nouveau

durant la nuit à 30°C avec une agitation de 200 rpm afin d´atteindre une A_{600} de 1,3-1,5. Les levures sont alors soumises à une première centrifugation à 1500g durant 5 min à 4°C et à un premier lavage avec le même volume initial de milieu de culture, 500 ml d'eau stérile préalablement glacée. Il est important de noter ici que toutes les étapes de cette préparation de cellules compétentes sont effectuées dans un bain de glace afin de maintenir les cellules au froid. Une seconde centrifugation est alors réalisée utilisant les mêmes conditions que la première et les cellules sont de nouveau lavées mais cette fois-ci avec un volume inférieur, c'est-à-dire 250 ml d'eau stérile glacée. Les levures sont centrifugées une troisième fois et ressuspendues dans 20 ml d'une solution de sorbitol 1M glacée. Enfin, les cellules sont soumises à une dernière centrifugation et ressuspendues dans 1 ml de sorbitol 1M glacé. Les levures sont alors considérées "compétentes", prêtes à être transformées. Il est possible de congeler les cellules compétentes, cependant l´efficacité de transformation décroit significativement.

II.13.1.2. Préparation de l'ADN à être transformé

Après avoir cloné les séquences codantes pour la met-prochymosine bovine dans les vecteurs pHIL-S1 et pPIC9 et vérifié la construction de ces clones par analyses de restriction et par séquençage, les préparations d'ADN plasmidique sont réalisées utilisant la méthode de lyse alcaline. Les concentrations d'ADN obtenues sont de l'ordre de 1 à 2 µg/µl. Les plasmides sont alors linéarisés avant transformation comme nous l´avons décrit précédemment dans le chapitre II.2.2.2. Nous avons utilisé deux endonucléases de restriction. *Sal*I est utilisée pour générer des transformants de levures His^+Mut^+ et *Dra*I est utilisée pour générer des transformants de levures His^+Mut^s. L´enzyme de restriction normalement utilisée pour générer des transformants His^+Mut^s est *Bgl*II, mais cette enzyme possèdant un site de reconnaissance dans la séquence codant la met-prochymosine, nous avons du choisir une autre enzyme de restriction, *Dra*I comme proposé dans le « manuel de méthodes d´expression de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* » (Invitrogen).

Les plasmides pHIL-S1 et pPIC9 ne possédant qu'un seul site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Sal*I, la digestion ne génère alors qu'un seul fragment d'environ 9460 pb pour les clones pHIL-S1 et de 9220 pb pour les clones pPIC9. En ce qui concerne la digestion par l'enzyme *Dra*I, le cas est différent car les vecteurs pHIL-S1 et pPIC9 possèdent plusieurs sites de coupure (5 pour le vecteur pHIL-S1 et 6 pour le vecteur pPIC9). Dans les deux cas (*Sal*I et *Dra*I), les produits de la réaction de digestion sont précipités en ajoutant

2 volumes d´éthanol 100% et 10% de tampon d´acétate de sodium 3 M pH 5,2 et ressuspendus dans un volume de 10 µl d'eau milliQ et utilisés tels quels lors de la transformation.

II.13.1.3. Transformation

Dix µg d'ADN linéarisé sont ajoutés à 80 µl de cellules compétentes. Ce mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm préalablement refroidie et incubé dans la glace durant 5 min. Ce mélange ADN/cellules est alors soumis à l'électroporation en utilisant un électroporateur de Biorad (1,5 kV, 25 µF). Après le choc électrique, on ajoute 1 ml de sorbitol 1M glacé et on transfère le tout dans un microtube. La solution est alors étalée sur un milieu minimum MD ne contenant pas d'histidine (« Minimal Dextrose » : 1,34% de « yeast nitrogen base » sans acides aminés (p/v), $4x10^{-5}$ % de biotine (p/v), 2% de glucose (p/v)). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies (de 3 à 5 jours). Un témoin négatif est également réalisé en étalant 100µl de cellules compétentes non transformées sur milieu minimum sans histidine (MD) pour vérifier la présence du marqueur de sélection mais aussi sur milieu minimum avec histidine MDH (« Minimal Dextrose + Histidine» : 1,34% de « yeast nitrogen base » sans acides aminés (p/v), $4x10^{-5}$ % de biotine (p/v), 2% de glucose (p/v), 0,004% d´histidine (p/v)) pour s'assurer de la non-contamination des cellules compétentes.

II.13.2. Sélection des transformants

II.13.2.1. Mut^+/Mut^s

Comme nous l'avions déjà vu, l'intégration du gène d'intérêt dans le génome de la levure peut avoir lieu dans différents loci, se traduisant par une "résistance" (Mut^+) ou par une "sensibilité" (Mut^s) au méthanol. Les colonies capables de se multiplier sur milieu minimum sans histidine sont donc testées pour leur capacité à se développer sur milieu avec méthanol. Chaque colonie est repiquée sur milieu minimum MM contenant du méthanol (« Minimal methanol » : 1,34% de « yeast nitrogen base » sans acides aminés (p/v), $4x10^{-5}$ % de biotine (p/v), 0,5% de méthanol (v/v)) et sur milieu minimum contenant du glucose (MD) et leur croissance est comparée sur les deux milieux. Si la croissance en présence de méthanol est inférieure à celle en présence de glucose, le transformant est considéré Mut^s, c'est-à-dire

sensible au méthanol. Cette sélection est importante à réaliser car les techniques de culture utilisées par la suite sont choisies en fonction de la capacité du transformant à utiliser le méthanol.

II.13.2.2. Expression de la met-prochymosine

Les colonies de *P. pastoris* transformées capables de se développer sur milieu minimum sans histidine sont finalement testées pour leur capacité à exprimer de la prochymosine bovine.

Les cellules des clones appropriés (9 clones par transformation, sauf les témoins où 1 clone uniquement a été sélectionné) sont inoculées dans 50 ml de milieu tamponné complexe contenant du glycérol BMGY (« Buffered Glycerol-complex Medium » : 1% d´extrait de levures (p/v), 2% de peptone (p/v), 1,34% de "yeast nitrogen base" (p/v), $4x10^{-5}$ % de biotine (p/v), 1% de glycérol (v/v), 100 mM de tampon phosphate de potassium, pH 6,0) dans un Erlenmeyer de 250 ml (MISTRY *et al.*, 1997). Les cellules sont alors incubées à 30°C durant deux jours pour atteindre une haute densité cellulaire. Après avoir été centrifugées, les cellules sont ressuspendues dans 20 ml de milieu tamponné complexe avec méthanol BMMY (« Buffered Methanol-complex Medium » : 1% d´extrait de levures (p/v) , 2% de peptone (p/v), 1,34% de "yeast nitrogen base" (p/v), $4x10^{-5}$ % de biotine (p/v), 0,5% de méthanol (v/v), 100 mM de tampon phosphate de potassium, pH 6,0) pour l´induction. Les levures retournent dans l´agitateur un jour de plus. A la fin de cette période, nous mettons en évidence la présence de la prochymosine bovine par analyses SDS-PAGE, Western-blot et par la mise en évidence d'une activité de coagulation du lait. Nous avons analysé le surnageant de culture mais aussi le précipité cellulaire. Dans ce dernier cas, 1 ml de milieu de culture est centrifugé à 12000g pendant 2 min à température ambiante et les cellules sont alors placées dans un bain de glace. Elles sont ensuite ressuspendues dans 100µl d´un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4 contenant 1 mM de PMSF, 1 mM d´EDTA et 5% de glycérol (v/v). Puis, on ajoute des billes de verre (de taille environ 0,5 mm) et le tout est agité vigoureusement pendant 30 s et laissé dans un bain de glace 30 s. Cette opération est répétée 8 fois au total. Enfin, l´échantillon est centrifugé à 12000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un autre microtube et est alors prêt à être analysé.

II.13.3. Intégration de la séquence codant la met-prochymosine dans le génome de *Pichia pastoris*

Après avoir sélectionné les transformants qui nous paraissaient avoir un meilleur niveau d'expression après analyses en SDS-PAGE, nous avons vérifié l'intégration de la séquence codant la prochymosine dans le génome de la levure. Dans un premier temps, nous avons réalisé une réaction de PCR à partir de l'ADN génomique de *P. pastoris* utilisant les propres amorces du gène de la prochymosine mais également les amorces 5′ et 3′ bordant le gène *AOX1*. Puis, toujours afin de vérifier l'intégration de la séquence codant la prochymosine bovine, nous avons utilisé la technique de Southern-blot.

II.13.3.1. Extraction de l'ADN génomique de *Pichia pastoris*.

L'ADN génomique est extrait à partir d'1 ml d'une culture de 5 ml réalisée durant la nuit utilisant le kit WIZARD® (Promega Corporation, Madison, Etats-Unis). Les cellules sont centrifugées à 10 000g durant 2 min et ressuspendues dans 293 µl d´une solution d'EDTA 50 mM. Les levures sont alors lysées en ajoutant 7,5 µl d´une solution de lyticase à 20 mg/ml et incubées à 37°C durant 30 à 60 min. Les échantillons sont alors centrifugés à 13000 g durant 2 min. Nous ajoutons 300 µl de solution de lyse nucléique au culot et le tout est pipeté en douceur pour ressuspendre le culot. Nous ajoutons alors 100 µl d´une solution de précipitation protéique et le tout est mélangé vigoureusement au vortex à grande vitesse pendant 20 s. Les échantillons sont alors incubés dans un bain de glace pendant 5 min et centrifugés à 13000 g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un microtube avec 300 µl d´isopropanol. Le tout est mélangé en renversant le microtube plusieurs fois et les échantillons sont de nouveau centrifugés à 13000g pendant 2 min. Le précipité est lavé avec 300 µl d´éthanol 70% et centrifugé à 13000g pendant 2 min. Le précipité est alors séché à température ambiante durant 10 à 15 min et nous ajoutons 50 µl de solution de réhydratation d´ADN (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, pH 8,0) et 1,5 µl de solution de RNase à 4mg/ml. Le tout est incubé 15 min à 37°C et l´ADN génomique est réhydraté à 65°C pendant 1 heure. L´ADN obtenu est alors conservé à 2-8°C.

II.13.3.2. Réaction de PCR

Deux cents ng d'ADN génomique sont utilisés pour chaque réaction. Nous avons, dans certains cas, « cassé » l'ADN génomique avant la réaction en l'homogénéisant durant 5 min avec des billes de verre de 0,3-0,5 mm sur un vortex à grande vitesse. Des fragments plus petits d´ADN génomique (de 1 à 50 kb) sont, en effet, des cibles plus efficaces pour une amplification par PCR. On ajoute à l'ADN 400 µM de dNTP's, 3 mM de $MgCl_2$, 300 ng d'amorces et 3 unités de Taq polymérase (Cenbiot, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brésil). Le programme utilisé est le suivant:

94°C, 2 min
94°C, 1 min
55°C, 1 min } 25 fois
72°C, 1 min
72°C, 7 min.

II.13.3.3. Southern blot

Nous avons choisi pour la réalisation de l'analyse par Southern-blot, une méthode non radioactive basée sur l'utilisation de la péroxydase dans le kit "ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems" (Amersham Pharmacia Biotech). Le principe de l´utilisation de cette méthode est illustré dans la **figure II.8**. Des complexes de peroxydases chargés positivement se lient électrostatiquement à l´ADN qui est chargé négativement. Une solution de glutaraldéhyde est alors ajoutée pour lier de manière covalente la péroxydase à l´ADN sonde. La membrane portant l´ADN à marquer est alors hybridée avec la sonde utilisant un tampon d´hybridation dont la formule a été spécialement étudiée pour stabiliser l´activité de l´enzyme péroxydase. La détection de la sonde hybridée est basée sur la production de lumière à travers l´oxydation du luminol catalysée par la péroxydase avec l´utilisation d´un activateur qui maximise le rendement d´émission de la lumière. L'analyse par Southern-blot peut être divisée en cinq principales étapes: (1) digestion de l'ADN génomique et migration des réactions de digestion sur gel d'agarose, (2) transfert de l'ADN du gel d'agarose sur membrane de nylon, (3) préparation de la sonde d'ADN, (4) hybridation des membranes en nylon et (5) détection du signal.

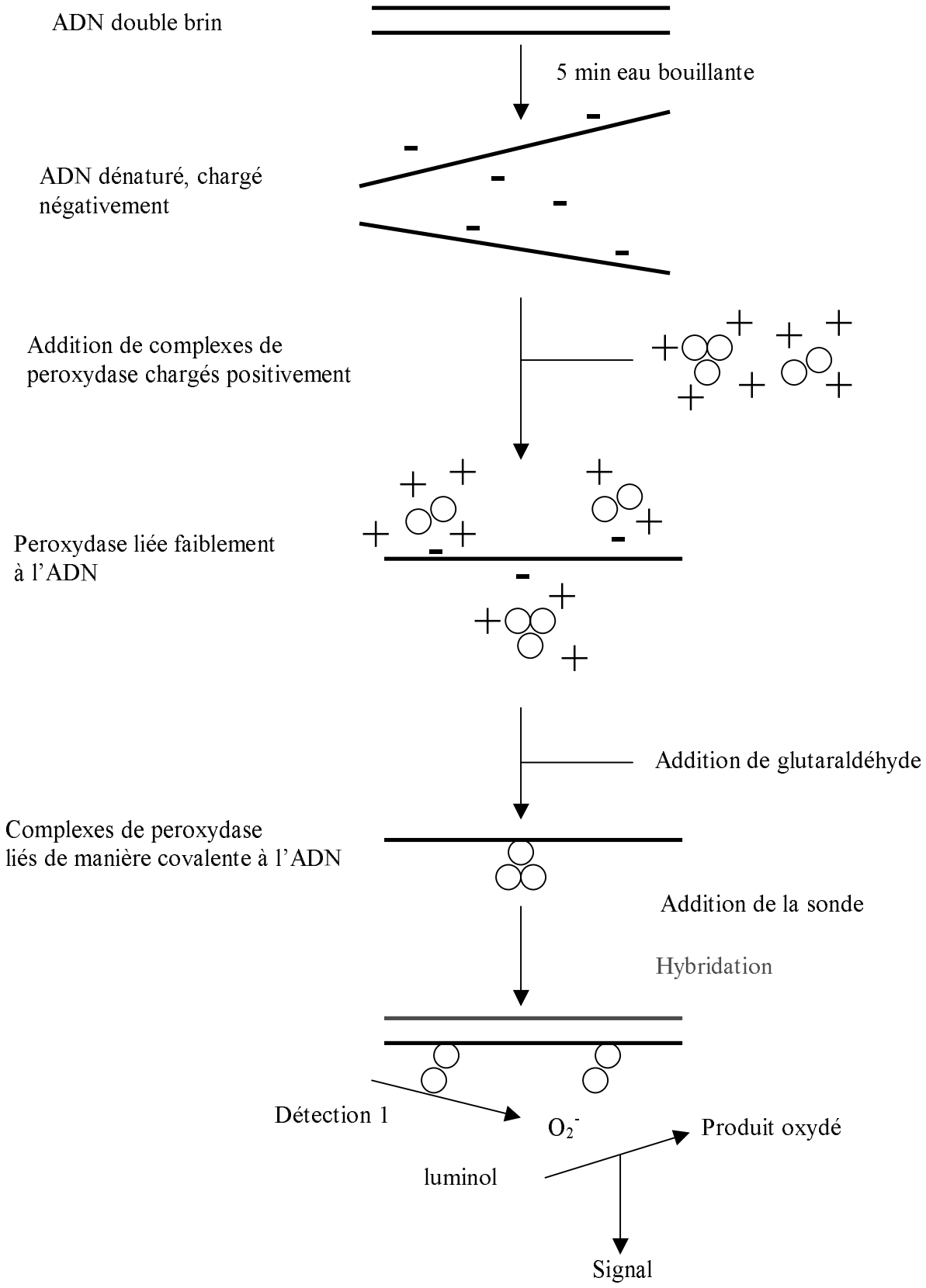


Figure II.8 : principe du kit « ECL direct nucleic acid labelling and detection system » qui est basé sur le marquage de la sonde d´ADN avec l´enzyme péroxydase.

II.13.3.3.1. Digestion de l'ADN génomique

Cinq µg d'ADN génomique ont été digérés dans un volume de 100 µl par 10 unités d'enzyme de restriction *Bgl*II à 37°C durant 4 heures. Ensuite, les produits de digestion ont été précipités avec 1 volume d'isopropanol et ressuspendus dans 30 µl d'un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Les produits de digestion ont été séparés par migration sur gel d'agarose TAE 1% de 20 cm de longueur. On a également déposé 100 ng du marqueur de taille λ/HindIII du propre kit ECL et 0,2 µl d'un témoin positif qui est un produit PCR correspondant à la séquence codant la prochymosine. Le gel a migré durant la nuit sous une tension de 30V.

II.13.3.3.2. Transfert de l'ADN du gel d'agarose sur membrane de nylon

Il est possible de transférer après électrophorèse de l'ADN d'un gel sur une membrane dans le but de réaliser une hybridation des fragments séparés d'ADN par une sonde. L´ADN contenu dans le gel est dépuriné en utilisant 400 ml d'une solution d´HCl 250 mM sous agitation environ 10 min. Cette étape facilite le transfert de fragment d'ADN de grande taille (>10 kb). Après rinçage du gel avec de l'eau distillée, le gel est dénaturé dans 400 ml d'une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) pendant 25 min sous agitation. Le gel est à nouveau rincé avec de l'eau distillée puis est transféré dans 400 ml d'une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5) pendant 30 min sous agitation. Durant cette dernière étape, le "montage" du transfert par capillarité, méthode que nous avons choisie, est préparé. Le gel au contact de la membrane est monté en "sandwich" et l'ADN sera transféré du gel à la membrane par le phénomène de capillarité. C'est un transfert relativement lent et pour cela, il aura lieu durant toute une nuit. La membrane utilisée est une membrane en nylon Hybond-N+. Une fois le transfert achevé, la membrane est rincée dans une solution SSC 6X pendant 1 min pour retirer les restes d'agarose, et la membrane est alors placée dans un four à 80°C pendant deux heures pour fixer l'ADN.

II.13.3.3.3. Préparation de la sonde d'ADN

Nous avons utilisé trois sondes différentes, une correspondant au gène de la prochymosine, une correspondant au gène *HIS4* et une correspondant au gène *AOX1*. La sonde du gène de la prochymosine a été préparée en digérant le plasmide pHIL-S1 contenant

le gène de la prochymosine par l'enzyme de restriction *Xho*I afin de libérer le fragment correspondant au gène de la prochymosine. Ce fragment d´ADN d´une longueur de 1200 pb a alors été purifié à partir du gel d'agarose en utilisant le kit « QIAquick gel extraction kit » (Qiagen). La sonde *HIS4* a été préparée en digérant le vecteur pHIL-S1 à l´aide de l´endonucléase de restriction *Kpn*I afin de libérer un fragment de 612 pb. Enfin, la sonde *AOX1* a été préparée en digérant le plasmide pHIL-S1 par deux enzymes de restriction, *Bgl*II et *EcoR*I, libérant un fragment de 1010 pb qui correspond à la région promoteur du gène *AOX1*. La sonde d'ADN est alors diluée à une concentration de 10 ng/µl. 100 ng d'ADN (10 µl) sont dénaturés en les chauffant dans de l'eau bouillante durant 5 min puis l'ADN est immédiatement refroidi dans de la glace pour 5 min. On ajoute alors 10 µl de réactif marqueur d'ADN (complexes de péroxydase) puis 10 µl de solution de glutaraldéhyde et le tout est laissé à 37°C pendant 10 min. La sonde d'ADN est alors prête à être utilisée.

II.13.3.3.4. Hybridation des membranes en nylon

L'hybridation sera réalisée en tube dans un four à hybridation en maintenant la température à 42°C. La membrane est dans un premier temps humidifiée dans un tampon SSC 5X et placée dans le tube à hybridation. Un petit volume de ce tampon y est ajouté afin de bien positionner la membrane dans le tube évitant la formation de bulles entre la paroi du tube et la membrane. La membrane sera alors pré-hybridée pendant 1 heure à 42°C dans le tampon d'hybridation (0,125 ml/cm^2 de membrane) qui avait été préalablement préparé et chauffé à 42°C. En effet, au volume nécessaire de solution d'hybridation (prête à l'emploi), on ajoute 0,5 M de NaCl et 5% d'agent bloquant et ce mélange reste sous agitation durant 1 heure puis est pré-chauffé à 42°C pendant une heure supplémentaire. A la fin de la pré-hybridation, nous ajoutons la sonde préalablement marquée et nous hybridons la membrane pendant la nuit à 42°C. Le lendemain, la solution d'hybridation est jetée et 50 ml de SSC 5X sont ajoutés durant 5 min puis ils sont remplacés par 50 ml du premier tampon de lavage (urée 6M, SDS 0,4%, SSC 5X) préalablement chauffé à 42°C durant 20 min, puis deux fois 10 min changeant la solution de tampon entre chaque lavage. Puis, la membrane est retirée du tube et sera lavée deux fois de plus durant 5 min avec le second tampon de lavage SSC 2X.

II.13.3.3.5. Détection du signal

Un volume de réactif de détection 1 est mélangé avec le même volume de réactif de détection 2. Le volume est calculé pour recouvrir la surface de la membrane (0,125 ml/cm^2 de membrane). Après avoir retiré l'excès du second tampon de lavage SSC 2X, la solution de détection est versée sur la membrane et laissée 1 min. L'excès de solution est ensuite retiré et la membrane est alors placée dans une cassette d'amplification entre deux films en plastique, évitant la formation de bulles d'air puis est exposée contre un film d'autoradiographie Hyperfilm-ECL et laissée durant la nuit. Le lendemain, le film est alors révélé et la membrane peut-être hybridée de nouveau sans aucun traitement.

II.13.4. Production de la met-prochymosine chez *Pichia pastoris*

Les clones ayant le meilleur niveau d'expression ont donc été utilisés pour la réalisation de production dans des volumes supérieurs. Le phénotype de ces clones a été vérifié par PCR en utilisant les amorces 5′ et 3′ *AOX1*. Les transformants ont été inoculés dans 25 ml de BMGY durant la nuit à 30°C. Les cellules après avoir été centrifugées à 2000 g pendant 5 min, ont été ressuspendues dans 100 ml de BMMY contenant 0,5% de méthanol afin d'induire l'expression de la protéine. Cette expression a été suivie à 24, 48, 72 et 96 h par analyses par SDS-PAGE et Western-blot. La concentration de 0,5% de méthanol a été maintenue en ajoutant du méthanol 100% toutes les 24 h.

II.13.5. Purification de la met-prochymosine

Le milieu de culture contenant la prochymosine est concentré avec 70% de sulfate d′ammonium suivi d′une centrifugation à 8000g pendant 30 min à 4°C. Le précipité est alors ressuspendu dans un tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3 avec 0,1 M NaCl. L′échantillon est ensuite dialysé contre ce même tampon et chargé sur une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech). Après que la colonne ait été lavée avec ce tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3, 0,1 M NaCl, les protéines adsorbées sont décrochées avec un gradient linéaire de NaCl de concentration 0,1 à 1 M en tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3. Les fractions obtenues sont activées et testées pour leur activité de coagulation du lait. La présence de prochymosine dans les fractions montrant une activité de coagulation de lait est confirmée par SDS-PAGE. Les fractions

d'intérêt sont réunies et concentrées avec des filtres Microcon YM-10 (Millipore Corp., Bedford, Etats-Unis) afin de pouvoir être appliquées dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3, 0,1 M NaCl. Les fractions recueillies sont alors de nouveau testées pour la présence de la prochymosine, par analyse en gel SDS-PAGE et par test d'activation/activité.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Clonage de la séquence codant la préprochymosine bovine chez *Escherichia coli*

III.1.1. Extraction de l'ARN total du tissus animal et RT-PCR

La première étape de ce travail a été le clonage de la séquence codant la préprochymosine bovine. La stratégie adoptée consistait, dans un premier temps, en l´extraction de l´ARN total de tissus prélevés dans la région fondique du quatrième estomac d´un jeune veau sacrifié à cet effet, suivie de la synthèse de l´ADN complémentaire (ADNc) utilisant la technique de RT-PCR à l´aide d´amorces spécifiques de la séquence codant la préprochymosine bovine. Les amorces 216 et 218 utilisées (voir **tableau II.1**, Matériels et Méthodes) ont été synthétisées en accord avec la séquence publiée de la préprochymosine bovine (FOLTMANN *et al.*, 1979).

Pour cette première étape, il était indispensable de choisir un jeune animal non sevré. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le lait est directement responsable de l´activation de la sécrétion de la chymosine (GARNOT *et al.*, 1977; ANDREN *et al.*, 1982; NICHOLSON et JONES, 1984). Utilisant des techniques d´immunofluorescence à l´aide d´anticorps spécifiques, ANDREN *et al.* (1982) ont localisé les cellules contenant la prochymosine dans la muqueuse de la caillette, le nombre de cellules contenant la prochymosine étant fortement lié à l´alimentation lactée de l´animal. Selon GARNOT *et al.* (1977), la sécrétion de la chymosine est indépendante de l´âge de l´animal, toutefois, les résultats de NICHOLSON et JONES (1984) ont montré que la synthèse d´ARNm pour la chymosine cessait à trois mois même quand l´alimentation lactée était maintenue. C´est pour ces différentes raisons que nous avons choisi de sacrifier un veau non sevré de deux mois d´âge. Juste après la mort de l´animal, nous avons collecté les échantillons de tissus et les avons congelés dans de l´azote liquide comme décrit dans le chapitre II.5.1. "Collecte du tissus animal" du Matériels et Méthodes.

L´ARN total a été isolé à l´aide d´une extraction unique avec un mélange de thiocyanate de guanidine/phénol/chloroforme suivie d´une précipitation avec de l´isopropanol pour purifier et concentrer l´ARN. Cette méthode permet l´obtention d´une préparation pure d´ARN non dégradé avec un grand rendement (CHOMCZYNSKI et SACCHI, 1987). La concentration en ARN total a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm à 2 µg/µl, le volume final de l´extraction étant de 100 µl. Le rapport des lectures à 260 nm et 280 nm nous a permis d´estimer la pureté de notre préparation, jugée satisfaisante puisque le rapport des

valeurs A_{260}/A_{280} était de 2. De plus, nous avons fait migrer 10 µl de la solution d´ARN total dans un gel TBE 0,5x 1% et nous avons pu vérifier que l´ARN total isolé était entier, non dégradé (résultats non montrés).

Nous avons alors réalisé les réactions de RT-PCR directement à partir de l´ARN total. Nous avons utilisé, lors de la réaction de transcription inverse, l´enzyme transcriptase inverse Superscript™ RNase H^- (GIBCO BRL), modifiée afin d´éliminer son activité RNase H. Cette modification empêche la dégradation de la molécule d´ARN pendant la synthèse du premier brin d´ADNc permettant ainsi une meilleure performance de l´enzyme (KOTEWICZ *et al.*, 1988). En ce qui concerne la réaction de PCR, nous avons utilisé deux conditions différentes: avec ou sans ajout d´amorces supplémentaires dans le milieu réactionnel. La **figure III.1** montre les produits d´amplification de l´ADNc obtenus par les réactions de RT-PCR. Nous pouvons observer des produits d´amplification d´environ 1200 pb, dont la taille est en accord avec celle du fragment codant la préprochymosine. Nous pouvons également observer une meilleure amplification dans les réactions sans ajout d´amorces supplémentaires. L´excès d´amorces pourrait en effet entraîner un déséquilibre en ions, conduisant à une "capture" des ions Mg^{2+}. Leur disponibilité dans le milieu réactionnel serait alors plus réduite contribuant à une diminution de l´activité de la Taq polymérase. Les amorces contenues dans la réaction de transcription inverse ont donc été suffisantes en quantité pour réaliser la réaction de PCR.

III.1.2. Clonage et séquençage des produits d´amplification

Les produits d´amplification ont ensuite été purifiés et clonés dans le vecteur pBluescript SK. Nous avions, dans un premier temps, tenté de cloner les produits d´amplification digérés avec les endonucléases de restriction *Nde*I et *Hind*III dans le plasmide pUC72 digéré avec ces mêmes enzymes (les amorces 216 et 218 ayant été conçues à cet effet) mais sans succès. Nous avons alors choisi de changer de stratégie de clonage, basée sur l´activité "terminal transferase like" de la Taq polymérase qui catalyse l´addition d´un nucléotide unique aux extrémités 3´ de l´ADN, conduisant à un résidu terminal dAMP. La méthode de clonage utilisée réalise la ligature entre l´extension T en 3´ d´un vecteur de clonage traité à cet effet (vecteur pBluescript SK) et l´extension A en 3´ qui est ajoutée aux produits d´amplification par la Taq polymérase. Deux clones ont ainsi été isolés, dénommés 23 et 40. La **figure III.2** montre la libération d´un fragment d´environ 1200 pb après digestion par l´enzyme de restriction *Xho*I de préparations plasmidiques à partir des clones 23 et 40.

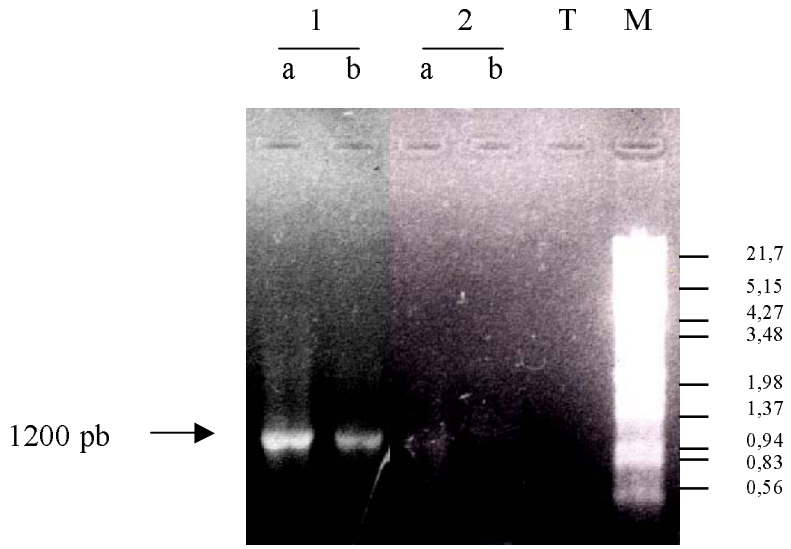


Figure III.1: Analyse des produits d´amplification d´ADNc obtenus par RT-PCR à l´aide d´amorces spécifiques de la séquence codant la préprochymosine observés après migration de 15 µl des produits par électrophorèse en gel d´agarose 1%, TAE 1x.

Dix µl d´une réaction de transcription inverse ont été utilisés pour chaque réaction de PCR utilisant les amorces 216 et 218 spécifiques de la séquence codant la préprochymosine.

Pistes 1: Réactions de PCR faites sans ajout d´amorces
Pistes 2: Réactions de PCR faites avec ajout d´amorces
Piste T: Témoin négatif
Pistes a et b: les réactions ont été dupliquées.
Piste M: Marqueur de taille, λ/*Hind*III/*Eco*RI (en kb).

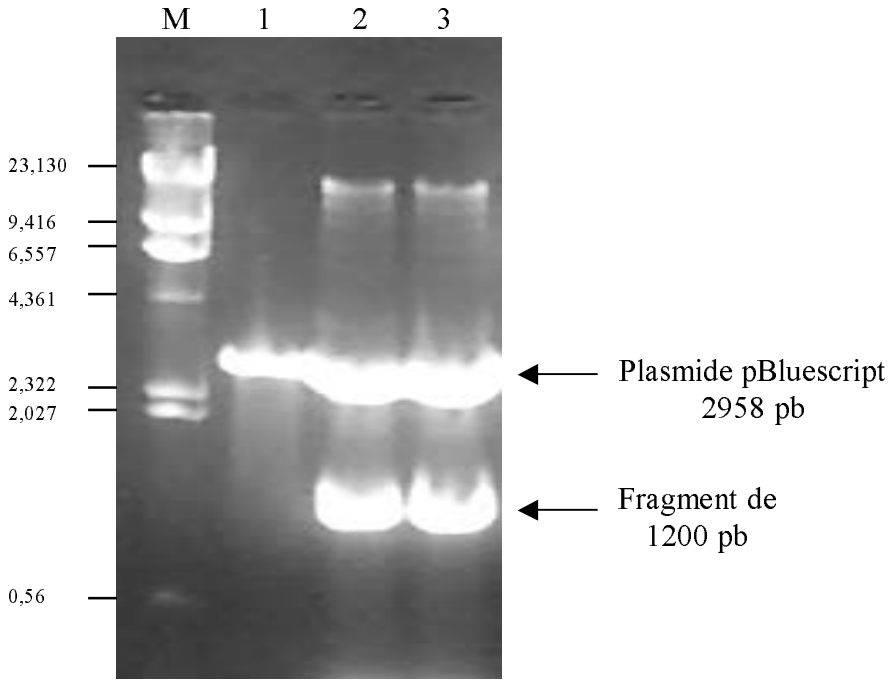


Figure III.2: Vérification de l´insertion des produits d´amplification obtenus par RT-PCR à l´aide des amorces spécifiques de la séquence codant la préprochymosine dans le vecteur pBluescript.

Les produits d´amplification ont été purifiés et clonés dans le vecteur pBluescript. Ce dernier avait été préalablement digéré avec l´enzyme de restriction *EcoR*V de manière à libérer des bords francs et auquel nous avions ajouté un T en 3´ à l´aide de la Taq polymérase. Deux clones ont été sélectionnés puis ont été digérés avec l´enzyme de restriction *Xho*I afin de libérer les fragments clonés.

Piste 1: plasmide pBluescript
Piste 2: clone 23
Piste 3: clone 40
Piste M: Marqueur de taille, λ/*Hind*III (en kb).

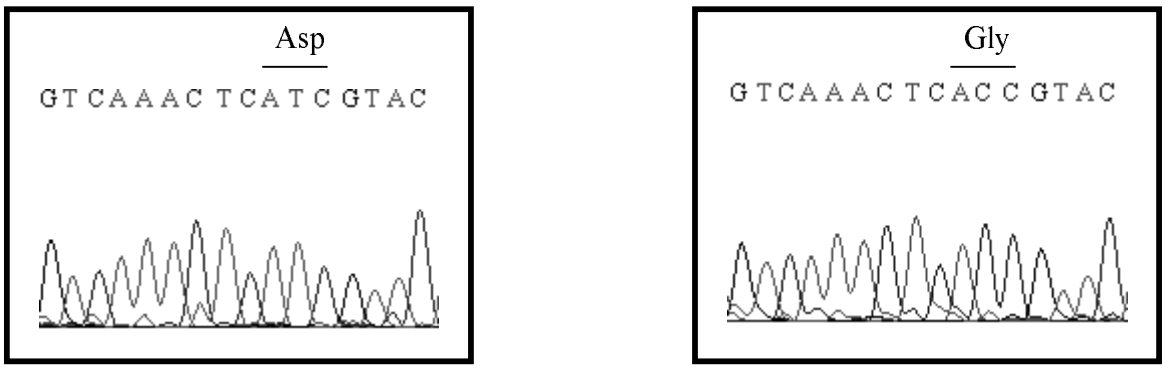
Nous avons alors réalisé une première étude utilisant diverses enzymes de restriction (*Pst*I, *BamH*I, *EcoR*I) avec laquelle nous avons obtenu des profils de restriction correspondant aux profils attendus.

Nous avons ensuite séquencé les deux clones pour avoir la confirmation de la séquence amplifiée utilisant la méthode de SANGER *et al.* (1977). Les séquençages ont été réalisés à l´aide des amorces du vecteur pBluescript et des amorces spécifiques de la séquence codant la préprochymosine. Les résultats ainsi obtenus ont été par la suite confirmés par séquençage automatique (**figure III.3**). Les séquences ont alors été comparées avec la séquence de la préprochymosine publiée par MOIR *et al.* (1982, **figure III.4**). Nous avons pu observer que le premier clone (clone 23) possède, dans la position 905, une guanosine et le second clone (clone 40) une adénosine. Si nous considérons à présent les acides aminés, le clone 23 possède dans la position 302, une glycine et le clone 40, un acide aspartique. Ainsi, le clone 23 correspond à la chymosine B et le clone 40 correspond à la chymosine A (FOLTMANN *et al.*, 1979). Nous avons pu observer l´existence d´autres mutations dans les deux clones. Dans le clone 40, dans la position 79, nous observons une adenosine au lieu d´une guanosine, c´est à dire une sérine au lieu d´une glycine dans la position 27 et dans la position 85, nous observons une cytosine au lieu d´une thréosine, c´est à dire une proline au lieu d´une sérine dans la position 29. Le clone 23, dans la position 416, possède une adénosine au lieu d´une guanosine. On obtient ainsi une asparagine au lieu d´une sérine dans la position 139. Les mutations dans le clone 40 (G27S et S29P) se trouvent dans la région du propeptide et dans le clone 23 (S139N) dans la partie matûre de la protéine.

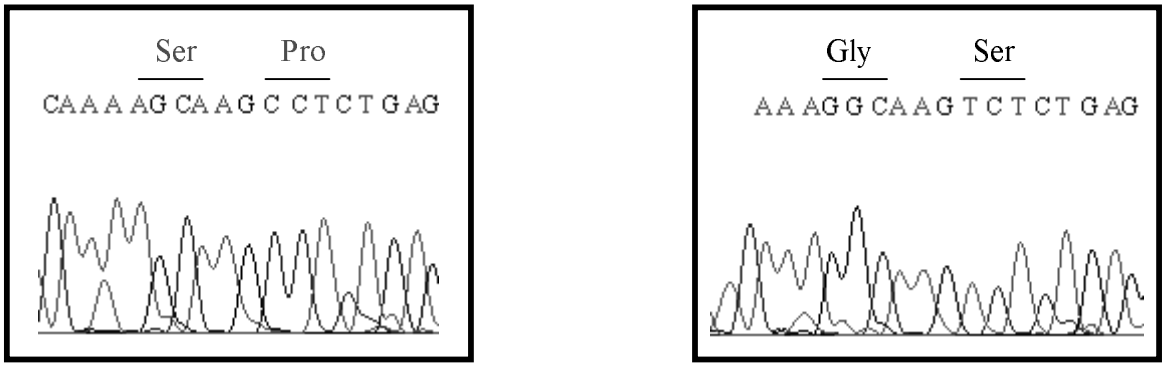
Il est difficile de conclure ici s´il s´agit de variants de la chymosine ou de mutants. En effet, nous avons amplifié l´ADNc correspondant à la séquence codant la préprochymosine bovine à l´aide de la Taq polymérase qui pourrait introduire des erreurs dans la séquence. Nous avons cependant trouvé dans la littérature la description de plusieurs variants de la chymosine que nous avons regroupés dans le **tableau III.1**. Dans la partie du propeptide, HARRIS *et al.* (1982) observent dans la position 17 une alanine au lieu d´une thréonine. McGUIRE (1986) cité par MOHANTY *et al.* (1999) a comparé les séquences d´ADNc correspondant à la séquence codant la préprochymosine bovine publiées par 6 différents groupes. Ces séquences diffèrent au total dans 22 positions nucléotidiques. Sur 14 différences de nucléotides, 4 résultent dans des variants d´acides aminés : Q159E, D230N, A380T et D302G (cette dernière correspondant à la différence entre chymosine A et chymosine B). Plusieurs variants de la chymosine bovine ont donc déjà été décrits dans la littérature et il est

Clone 40 (Chymosine A) | **Clone 23 (Chymosine B S139N)**

Mise en évidence de la différence entre chymosine A et chymosine B dans la position 302 par séquençage du brin non codant



Mise en évidence des mutations G27S et S29P dans la partie du propeptide de la chymosine A par séquençage du brin codant



Mise en évidence de la mutation S139N de la chymosine B par séquençage du brin codant

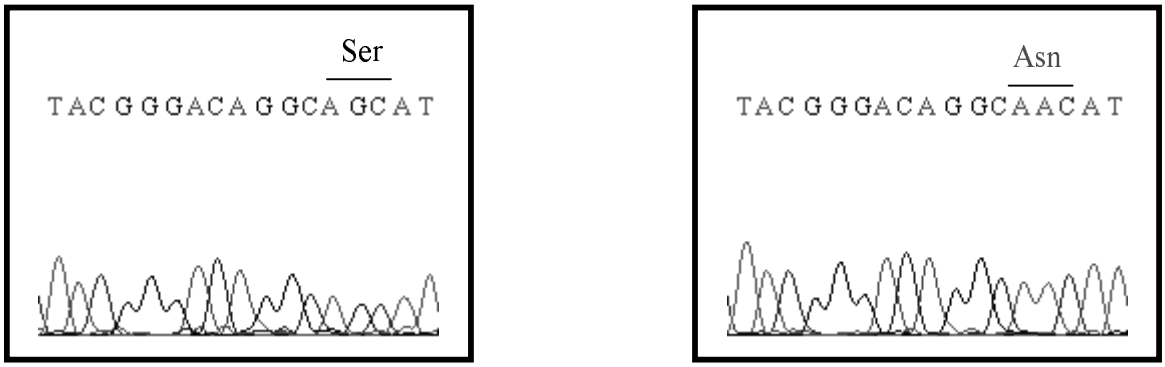


Figure III.3: Détails du séquençage du clone 40 (chymosine A) et du clone 23 (chymosine B S139N). Les mutations sont signalées en rouge. La numérotation est basée sur la séquence de la préprochymosine publiée par MOIR *et al.* (1982).

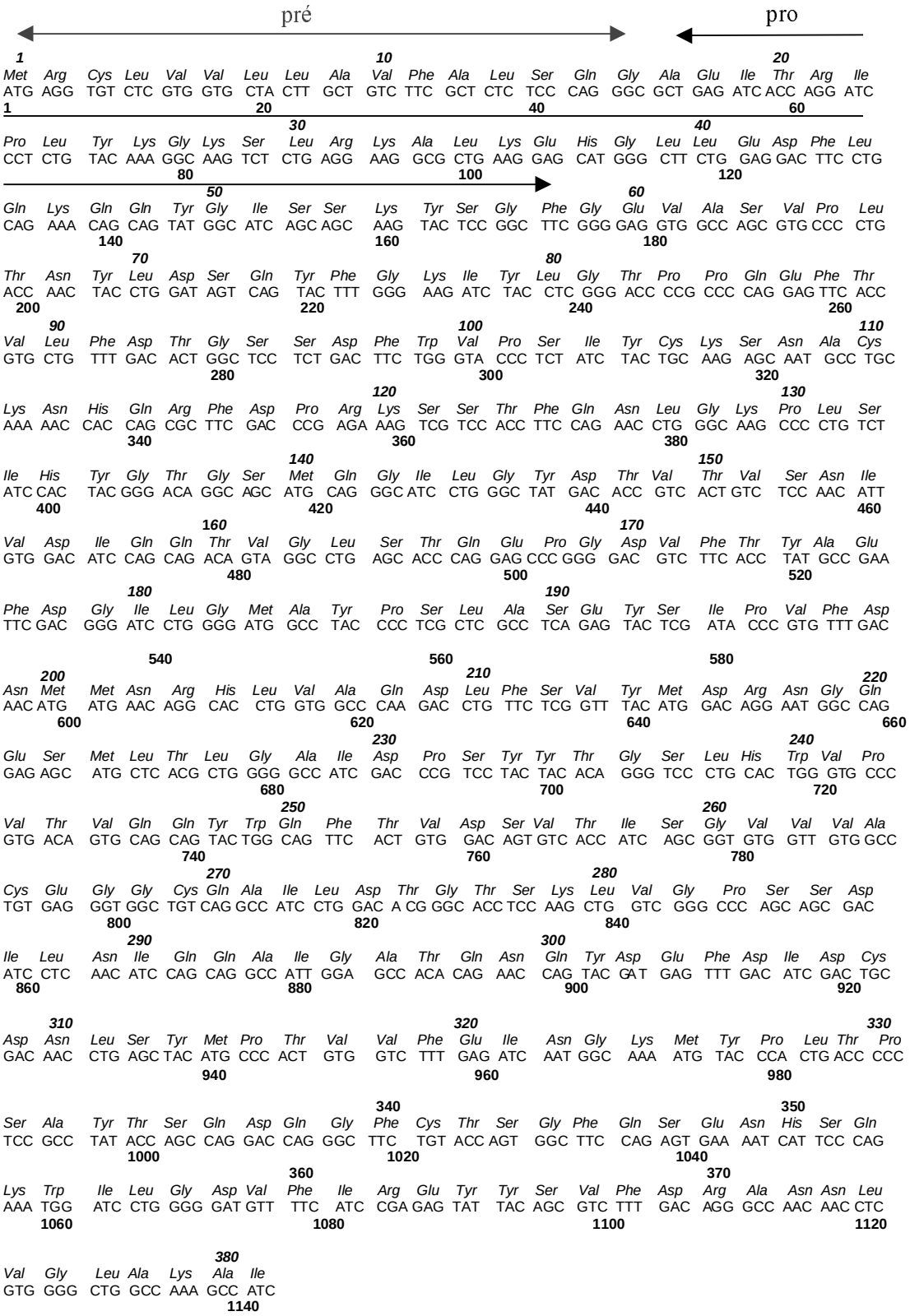


Figure III.4: Séquence de la préprochymosine bovine A selon Moir *et al.* (1982). Les parties prépropeptide et propeptide sont soulignées en bleu (-) et en noir (-).

Tableau III.1 : Variants de la chymosine bovine (numérotation selon séquence de MOIR *et al.*, 1982, voir figure III.4).

Mutations	Références	Gene bank	Commentaires
A17T	HARRIS *et al.*, 1982 ZINOVIEVA *et al.*, 2002	P00794C AAL99906 à 12	préprochymosine B mutation dans le pro-peptide
Q159E	McGUIRE, 1986	pas de référence	cité par MOHANTY *et al.*, 1999
D230N	McGUIRE, 1986	pas de référence	cité par MOHANTY *et al.*, 1999
A380T	McGUIRE, 1986	pas de référence	cité par MOHANTY *et al.*, 1999
D302G	FOLTMANN *et al.*, 1979	pas de référence	cité par MOHANTY *et al.*, 1999 Asp302: chymosine A Gly 302: chymosine B

possible que les séquences que nous avons obtenues correspondent à d´autres variants, non encore décrits.

III.1.3. Analyse des mutations

Il est important de souligner ici que, afin de faciliter les comparaisons, notamment avec les résultats publiés dans la littérature, nous avons adopté le système de numérotation des acides aminés de la pepsine porcine (3PEP), qui sert de référence pour les protéases à acide aspartique. Ainsi, jusqu´à présent, nous avons utilisé la numérotation de la séquence publiée par MOIR *et al.* (1982) où, dans la position 139, comme nous venons de le voir, nous observons une asparagine au lieu d´une sérine. Si nous utilisons la numérotation de la pepsine, cet acide aminé se trouve dans la position 79 (S79N). En ce qui concerne les deux mutations observées dans la préprochymosine A, G27S et S29P qui se situent dans la partie du propreptide, il était plus difficile dans ce cas de numéroter les acides aminés car en général les comparaisons de séquences sont réalisées avec la pepsine sans la région du propeptide. Nous avons ainsi choisi d´utiliser la numérotation de RICHTER *et al.* (1998) qui ont aligné des séquences d'acides aminés de prosegments de zymogènes gastriques en prenant comme référence le pepsinogène A porcin. Ainsi la mutation G27S devient G9pS et S29P devient S11pP, le "p" indiquant l´appartenance au propeptide. Pour une meilleure compréhension, nous adopterons tout au long de cette dissertation les dénominations de préprochymosine A (clone 40) et préprochymosine B S79N (clone 23).

Nous nous sommes ainsi intéressés de manière plus détaillée aux mutations rencontrées dans les séquences codant la préprochymosine que nous avons clonées. Pour cela, nous avons réalisé des alignements de séquences en acides aminés à l´aide du programme "BioEdit Sequence Alignment Editor" version 5.0.3 (Tom Hall, Département de Microbiologie, Université de la Caroline du Nord, Etats-Unis). En ce qui concerne les mutations observées dans la région du prosegment de la prochymosine A, nous avons réalisé un alignement de séquences de propeptides de la prochymosine bovine B (CMBO) avec différentes protéases à acide aspartique (**figure III.5**) : pepsinogène A porcin (AAA31096), progastricsine porcine (P30879), pepsinogène A bovin (PEBO) et progastricsine humaine (PEPC). Nous pouvons observer que les résidus de la région du propeptide montrent une grande identité entre eux. Certains résidus sont conservés dans toutes les séquences étudiées, notamment la sérine dans la position 11 qui est remplacée par une proline dans le clone de la prochymosine A.

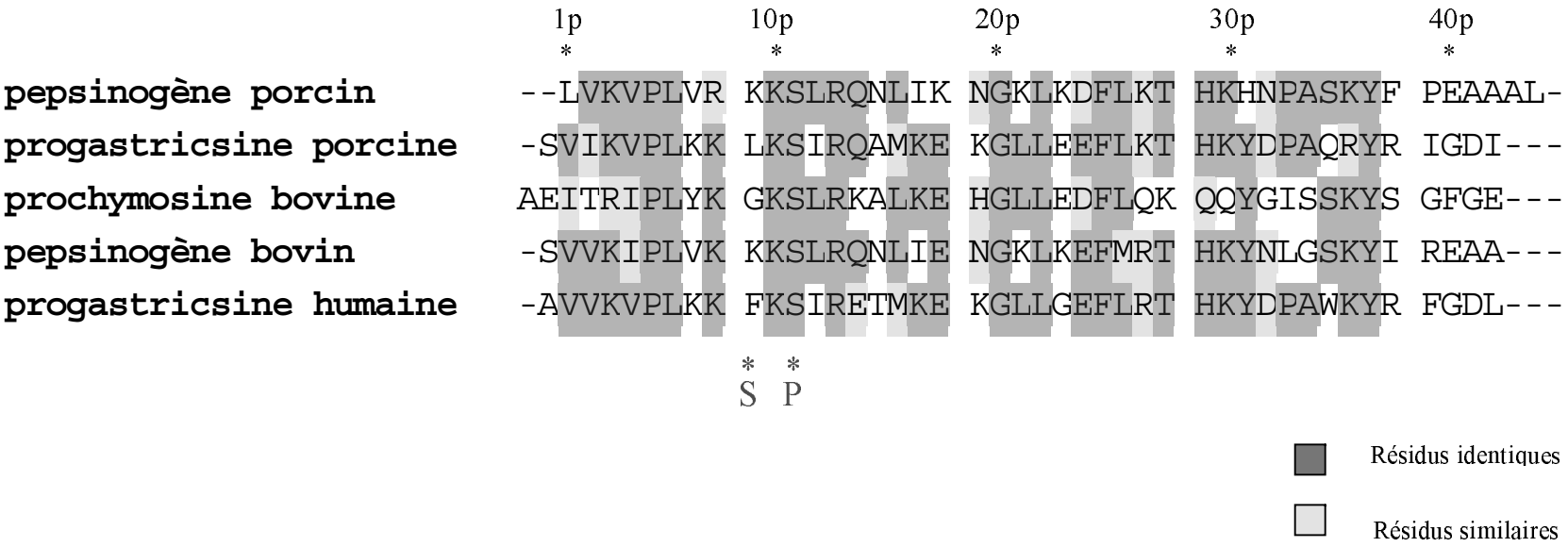


Figure III.5: Alignement des séquences de propeptides de différentes protéases à acide aspartique : le pepsinogène A porcin (AAA31096), la progastricsine porcine (P30879), la prochymosine B bovine (CMBO), le pepsinogène A bovin (PEBO) et la progastricsine humaine (PEPC). La numérotation est basée sur la séquence du pepsinogène du porc et le suffixe « p » indique les résidus du prosegment (selon RICHTER *et al.*, 1998). Les mutations rencontrées dans le prosegment du clone de la prochymosine A sont également indiquées (*).

En ce qui concerne la glycine dans la position 9, il s´agit d´un résidu non conservé. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de ces mutations dans le processus d'activation de la prochymosine. Toutefois, nous avons choisi de privilégier l´étude sur la mutation S79N de la chymosine B, qui se situe dans une région importante de la protéine, comme nous allons pouvoir en juger.

Nous avons ainsi réalisé un autre alignement de séquences en acides aminés de la chymosine bovine B (4CMS) avec différentes protéases à acide aspartique (**figure III.6**) : pepsine porcine (3PEP), gastricsine humaine (1AVF-A), penicillopepsine (3APP) et protéase à acide aspartique de *Rhizopus chinensis* (2APR). Seuls environ 40 résidus d´acides aminés sont conservés (identiques) chez les 5 protéases étudiées. Parmi ces résidus, la S79 est située dans un contexte particulier. Elle fait partie d'un tampon (résidus 72 à 86) qui constitue une anse externe mobile qui couvre le sillon du site actif (SUZUKI *et al.*, 1989). La **figure III.7**, obtenue à l´aide du programme Swiss-Pdb Viewer version 3.7b2 (GUEX et PEITSCH, Suisse), représente une structure tridimensionnelle de la chymosine bovine (4CMS), indiquant la position de ce tampon dans la protéine en relation avec le sillon du site actif composé des résidus D32 et D215. Dans le cas de la chymosine bovine, la présence de ce tampon est d´autant plus intéressante car les études de cristallographie ont montré qu´il présentait un réarrangement considérable par comparaison avec les structures de la pepsine porcine et d'autres protéases à acide aspartique. Ceci pourrait expliquer les différences de comportement fonctionnel qui existent entre la chymosine et les autres protéases à acide aspartique. En effet, la chymosine présente une activité protéolytique générale modérée mais hydrolyse spécifiquement la liaison Phe_{105}-Met_{106} de la caséine κ du lait. Cette activité protéolytique modérée permet de préserver certaines protéines du colostrum ingérées par les nouveau-nés parmi lesquelles les immunoglobulines alors que la pepsine et la gastricsine, par exemple, possèdent une large spécificité et digèrent efficacement toutes les protéines du lumen gastrique (GUSTCHINA *et al.*, 1996).

Devant l´importance de ce tampon chez la chymosine bovine, il nous a donc paru intéressant d'analyser l'effet de cette mutation S79N qui se trouve dans ce tampon. Selon ANDREEVA *et al.* (1992), il existe une liaison H entre ce résidu S79 et le résidu H74. Une mutation dans cette position (S79N) éliminerait donc cette liaison et pourrait influencer la conformation de cette anse externe mobile. Pour étudier l´effet de la mutation S79N, il nous a fallu reconstruire la séquence codant la met-prochymosine B sauvage à partir des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N, comme nous le décrirons dans un chapitre ultérieur.

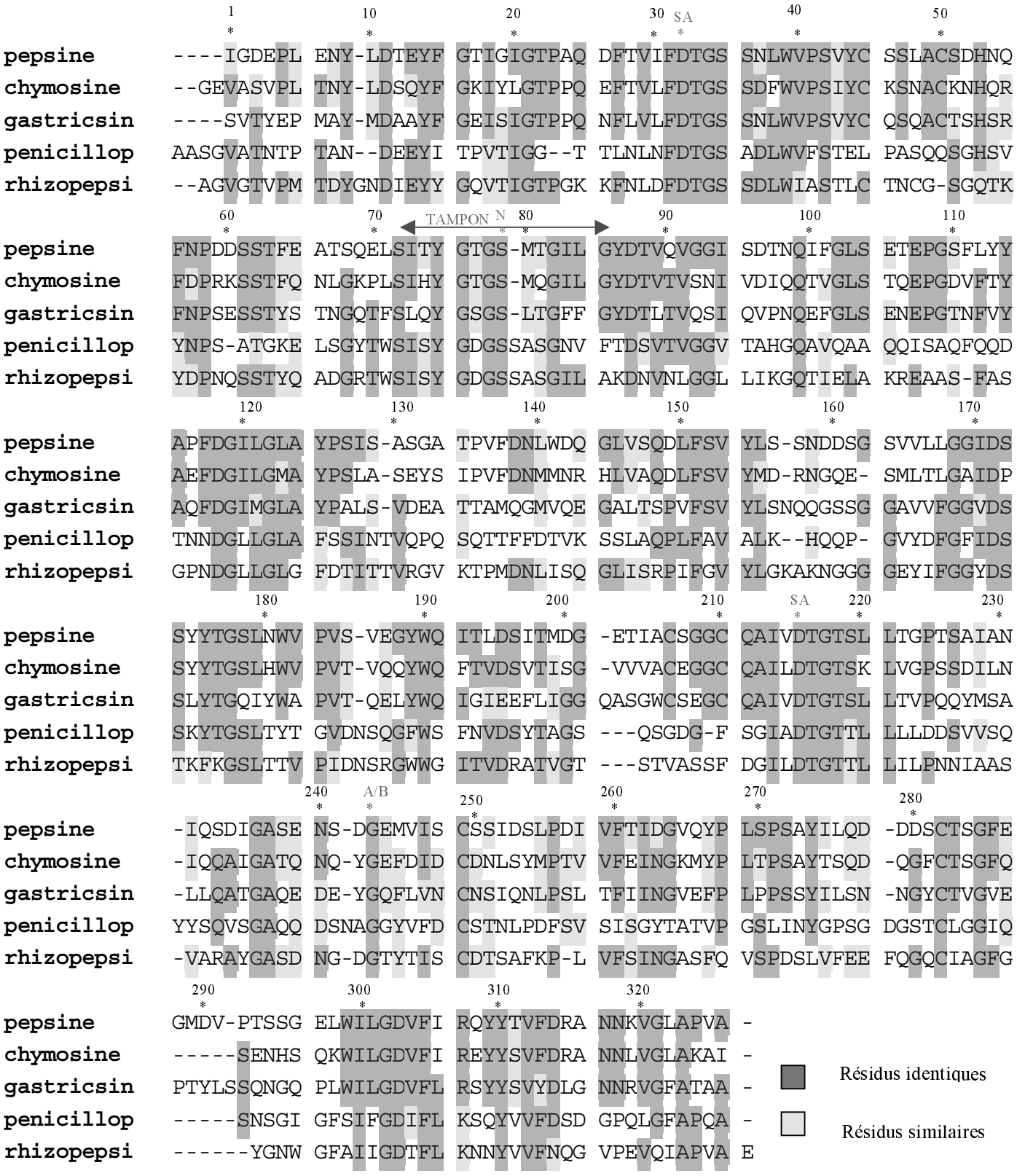


Figure III.6: Alignement des séquences en acides aminés de différentes protéases à acide aspartique : la pepsine porcine (3PEP), la chymosine bovine B (4CMS), la gastricsine humaine (1 AVF-A), la penicillopepsine (3APP) et la rhizopepsine (2APR). La numérotation est basée sur la séquence de la pepsine du porc. D32 et D215 (*) sont les résidus catalytiques du site actif (SA). Les résidus 72 à 86 forment le tampon du site actif. La chymosine A diffère de la B dans la position 243 (*) où nous retrouvons alors un acide aspartique pour la chymosine A. Enfin, le détail de la mutation S79N est donné (*).

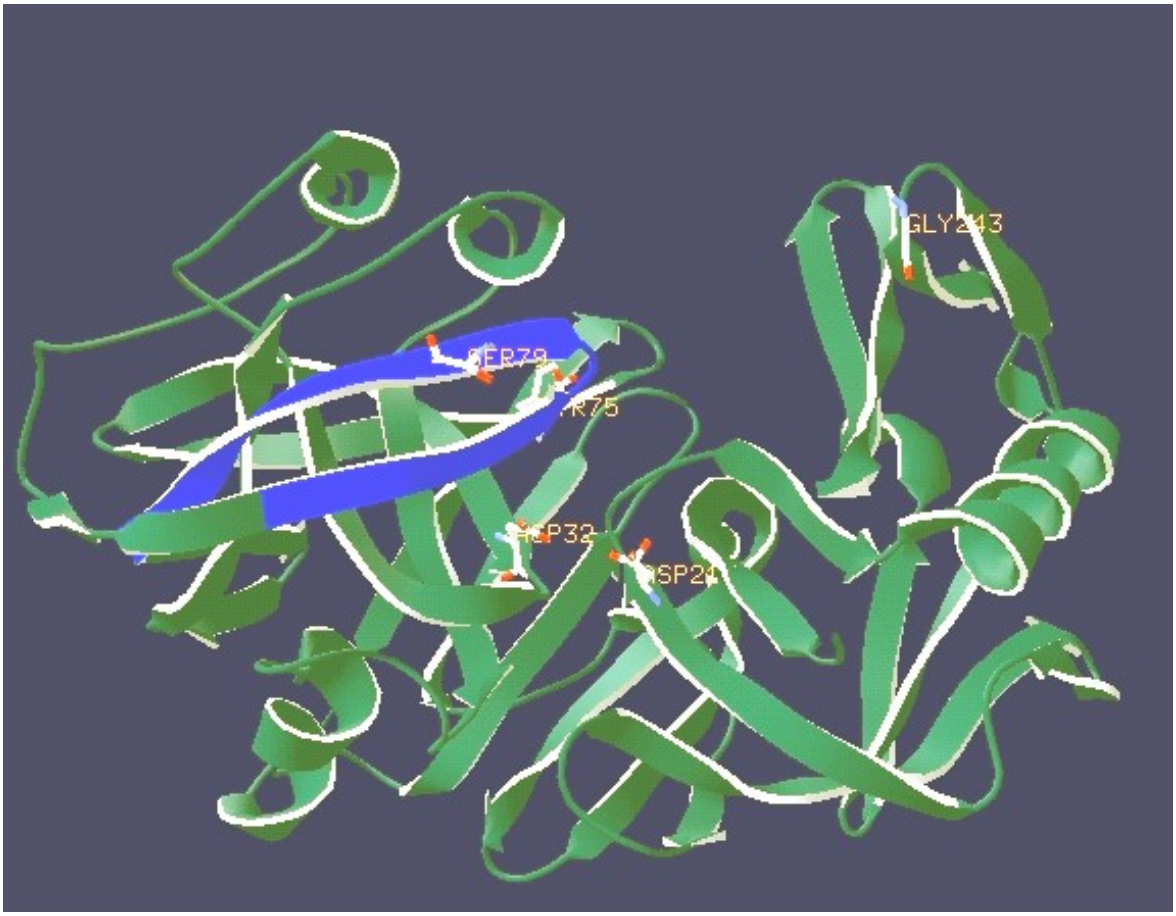


Figure III.7: Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine (4CMS).

Les positions des acides aminés Ser79, Tyr75, Asp32, Asp215 et Gly 243 sont indiquées. En bleu est représenté le tampon qui recouvre le sillon du site actif.

III.2. Expression de la préprochymosine bovine chez *Escherichia coli*

III.2.1. A l´aide du plasmide pGEX-4T-3

III.2.1.1. Clonage des séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le pGEX-4T-3

Nous avons choisi, pour l´expression des séquences codant la préprochymosine, le vecteur pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech). Pour le clonage, la stratégie employée consistait en l´utilisation d´extrémités cohésives générées par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Xho*I. La méthode de criblage utilisée a été l´hybridation de l´ADN de colonies bactériennes transférées sur membranes de nylon, puis la détection de cet ADN à l´aide du kit ECL utilisant une sonde spécifique de la séquence codant la prochymosine. Nous avons ainsi cloné les deux fragments codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le vecteur pGEX-4T-3. On a vérifié la structure des plasmides par analyse de restriction à l´aide de l´enzyme *Xho*I (**figure III.8**). On a obtenu pour les clones considérés la libération d´un fragment d´environ 1200 pb, correspondant donc aux séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N.

III.2.1.2. Expression des séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le pGEX-4T-3

L´expression de la protéine de fusion (préprochymosine + glutathione S-transferase) a été induite à l´aide de différentes concentrations d´IPTG pendant des temps variables. Nous avons utilisé des concentrations de 0,5 mM d´IPTG pendant 4, 5 et 6 h et 5 mM d´IPTG pendant 2, 3 et 4 h pour l´induction de l´expression de la protéine de fusion du clone 23 et nous avons utilisé des concentrations de 0,3, 0,5 et 1 mM d´IPTG pendant 2 et 3 h pour le clone 40. Les extraits protéiques bruts des bactéries (*E. coli* XL1-blue) ont été analysés par éléctrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS 10 % (SDS-PAGE 10 %) et Western-blot utilisant les anticorps monoclonaux contre la GST. Nous avons pu observer l'expression d'une protéine d'environ 67 kDa (**figure III.9**, clone 23, préprochymosine B S79N, **figure III.10**, clone 40, préprochymosine A) qui correspond à la protéine de fusion de la glutathione S-transferase (GST, 26 kDa) et de la préprochymosine (41 kDa).

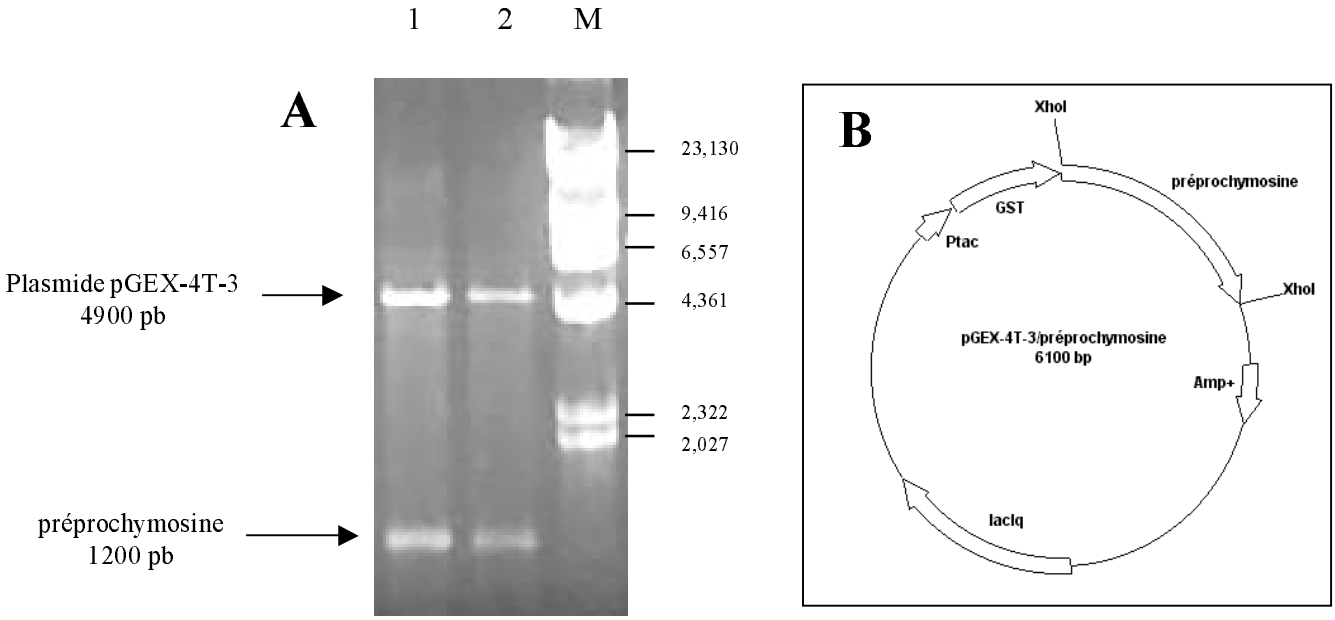


Figure III.8: Analyse des plasmides pGEX-4T-3 contenant les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N.

Les ADN codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N clonés dans le vecteur pBluescript ont été purifiés après digestion des plasmides par l´enzyme de restriction *Xho*I. Ils ont alors été clonés dans le vecteur pGEX-4T-3 préalablement clivé par la même enzyme de restriction.
(A) Les plasmides pGEX-4T-3 contenant les séquences d´intérêt ont été digérés avec l´enzyme de restriction *Xho*I afin de libérer les fragments clonés, que l´on a analysés par électrophorèse en gel d´agarose à 1%, TAE 1x.

Piste 1: plasmide pGEX-4T-3/préprochymosine A
Piste 2: plasmide pGEX-4T-3/préprochymosine B S79N
Piste M: Marqueur de taille, λ/*Hind*III (en kb).

(B) Représentation schématique d´un plasmide pGEX-4T-3 contenant la séquence codant la préprochymosine.

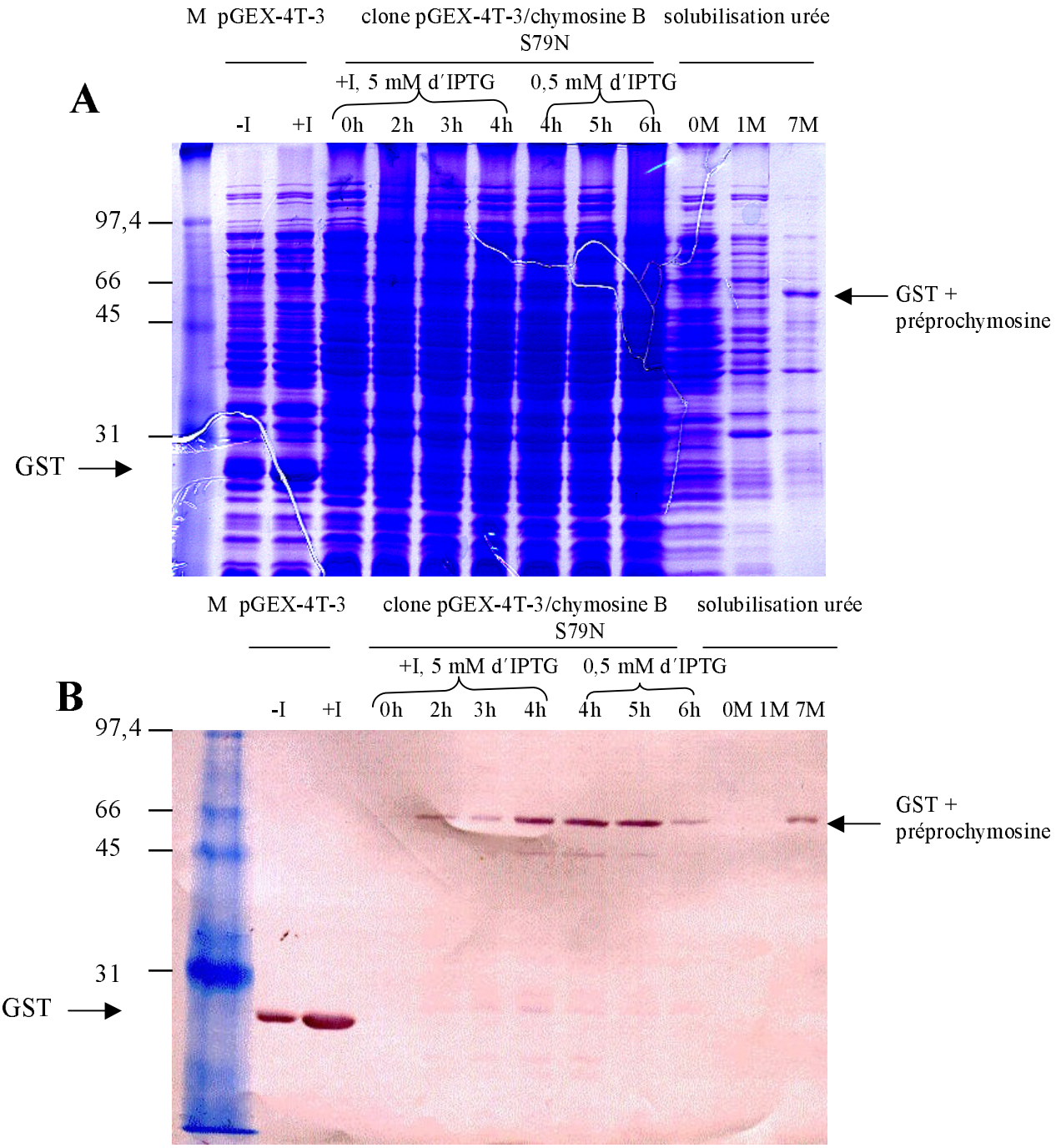


Figure III.9: Analyses par électrophorèse SDS-PAGE 10% (A) et par Western-blot utilisant les anticorps monoclonaux anti-GST (B), de l´expression de la protéine de fusion préprochymosine bovine B S79N et GST par *E. coli* à l´aide du plasmide pGEX-4T-3 et de la solubilisation des corps d´inclusion par différentes concentrations d´urée.

La piste "–I" correspond à 16 µl d´extraits de cellules bactériennes non induites provenant d´une culture de clone pGEX-4T-3 (sans insert).
Les pistes "+I" correspondent à 16 µl d´extraits de cellules bactériennes induites 2 h avec 1 mM d´IPTG provenant d´une culture de clones pGEX-4T-3 (sans insert) et induites avec 5 mM d´IPTG durant 0, 2, 3 et 4 h et avec 0,5 mM d´IPTG durant 4, 5 et 6h provenant de cultures du clone pGEX-4T-3/prochymosine B S79N. Une solubilisation des corps d´inclusion a été réalisée avec 0 M, 1 M et 7 M d´urée pendant 10 min.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).

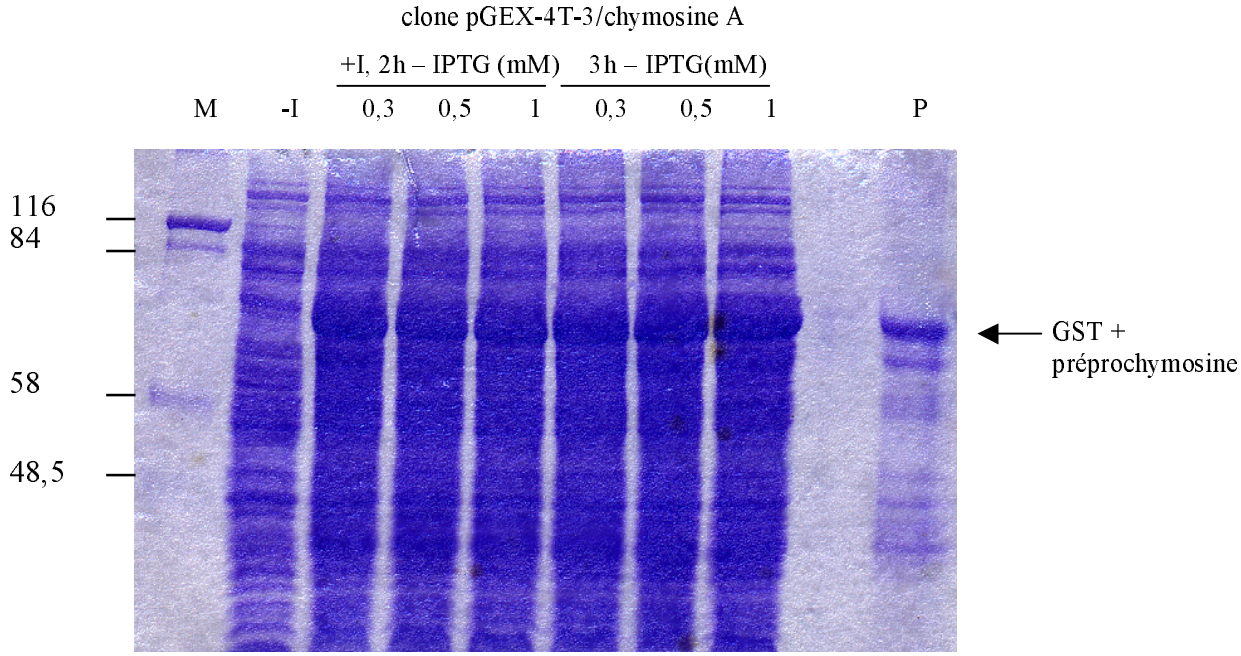


Figure III.10: Analyses par électrophorèse SDS-PAGE 10% de l´expression de la protéine de fusion: préprochymosine bovine A et GST par *E. coli* à l´aide du plasmide pGEX-4T-3 et de la purification partielle de la protéine de fusion.

La piste "-I" correspond à 16 µl d´extraits de cellules bactériennes non induites provenant d´une culture de clones pGEX-4T-3/préprochymosine A.
Les pistes "+I" correspondent à 16 µl d´extraits de cellules bactériennes induites 2 h avec 0,3, 0,5 et 1 mM d´IPTG et induites durant 3 h avec 0,3, 0,5 et 1 mM d´IPTG provenant de cultures du clone pGEX-4T-3/préprochymosine A.
La piste "P" correspond à 16 µl d´une solution purifiée de protéine de fusion selon le protocole de NISHIMORI *et al.* (1984).
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).

Ces résultats ont été confirmés par une analyse de Western blot à l'aide des anticorps dirigés contre la GST (**figure III.9**). Nous avons alors comparé les différents niveaux d'expression en fonction des différentes conditions d'induction utilisées (IPTG/durée de l'induction) et nous avons choisi d'utiliser 1 mM d'IPTG pendant 3 h pour les inductions ultérieures.

Dans un premier temps, nous avons déterminé si la préprochymosine était exprimée sous forme soluble ou insoluble. Pour cela, les extraits protéiques d'*E. coli* ont été solubilisés avec des concentrations en urée de 1 et 7 M et analysés en SDS-PAGE 10 % et Western blot (**figure III.9**). Nous avons pu ainsi observer que la protéine de fusion est exprimée sous une forme insoluble, la solubilisation de celle-ci n'étant obtenue qu'en présence de fortes concentrations d'urée. Ce résultat est en accord avec ceux de EMTAGE *et al.* (1983) qui, exprimant la prochymosine chez *E. coli*, ont obtenu des formes insolubles. L'insolubilité résulte de la formation d'agrégats protéiques intracellulaires sous la forme de corpuscules d'inclusion, appelés corps d'inclusion.

III.2.1.3. Purification partielle et tests d'activation/activité de la préprochymosine A et de la préprochymosine B S79N

Nous avons ensuite purifié la protéine de fusion (GST/préprochymosine) à partir des extraits protéiques bruts d'*E. coli* selon le protocole de NISHIMORI *et al.* (1984), l'isolement des corps d'inclusion étant la principale étape de purification de cette méthode. La majorité des protéines contaminantes est éliminée en lavant les corps d'inclusion avec du Triton X-100 et de l'EDTA. De cette manière, nous avons obtenu une protéine de fusion partiellement purifiée (**figure III.10**). La protéine de fusion, exprimée sous une forme insoluble, a donc été purifiée et solubilisée avec de l'urée 8M. Il est important de rappeler ici que le produit primaire de traduction de l'ARNm est la préprochymosine, qui possède un peptide signal de 16 acides aminés. Cette séquence signal est supprimée pour produire la prochymosine qui, à son tour, est convertie en chymosine active sous les conditions d'acidité rencontrées dans l'estomac du jeune veau par élimination du peptide formé par 42 acides aminés de l'extremité N-terminale.

Se basant sur ces mécanismes, la préprochymosine obtenue à partir d'*E. coli* est convertie en chymosine par acidification/neutralisation (EMTAGE *et al.*, 1983). Le test d'activité de la chymosine est basée sur sa capacité à hydrolyser une liaison spécifique de la caséine κ du lait, la clivant en deux peptides. La caséine κ normalement stabilise les micelles du lait mais quand elle est clivée, les micelles précipitent conduisant à la coagulation du lait.

Différentes stratégies d'activation de la protéine recombinante ont été utilisées (activation directe de la préprochymosine liée à la GST ou après clivage avec la thrombine pour la libération de la préprochymosine) mais il n'a pas été possible de déterminer, dans ces conditions, si les protéines recombinantes obtenues étaient actives ou non. Il est difficile de savoir pour quelles raisons nous n´avons pas réussi à observer une activité de coagulation du lait de la part des protéines recombinantes. Nous avions observé que lors de l´activation, au moment de la neutralisation à pH 6,3, il se formait un précipité important. Comme nous avions choisi d´exprimer la préprochymosine, il est possible que la présence du peptide signal empêche l´activation de la protéine et conduise à une précipitation des protéines. Nous avons également émis l´hypothèse que les mutations observées dans les séquences codant la préprochymosine pouvaient affecter l´activité des protéines recombinantes. Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons choisi de cloner les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans un deuxième système d'expression, le pTIamy, chez *E. coli* dont l'avantage est de produire la protéine recombinante sous forme non fusionnée afin de pouvoir faciliter la réalisation des tests d'activité.

III.2.2. A l´aide du plasmide pTIamy

III.2.2.1. Clonage des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans le pTIamy

Nous avons amplifié les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N (clonées dans le vecteur pBluescript) à l´aide des amorces 217 et 219 afin de générer les séquences codant la prochymosine bordées par un site de restriction *Nde*I aux deux extrémités. Les produits d´amplification obtenus ont été dans un premier temps sous-clonés dans le vecteur pBluescript. Les plasmides ainsi générés ont été digérés avec l´endonucléase de restriction *Nde*I. Après purification, les fragments libérés ont été sous-clonés dans le vecteur pTIamy. Ce dernier avait été préalablement digéré avec l´endonucléase de restriction *Nde*I afin de purifier le fragment de 4388 pb (**figure III.11A**) utilisé alors pour la ligature. La **figure III.11B** montre les deux clones correspondant aux séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans le vecteur pTIamy. On a vérifié la structure des plasmides par analyse de restriction à l´aide de l´enzyme *Nde*I. On a obtenu, pour les clones considérés, la libération d´un fragment d´environ 1200 pb, correspondant donc aux séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N.

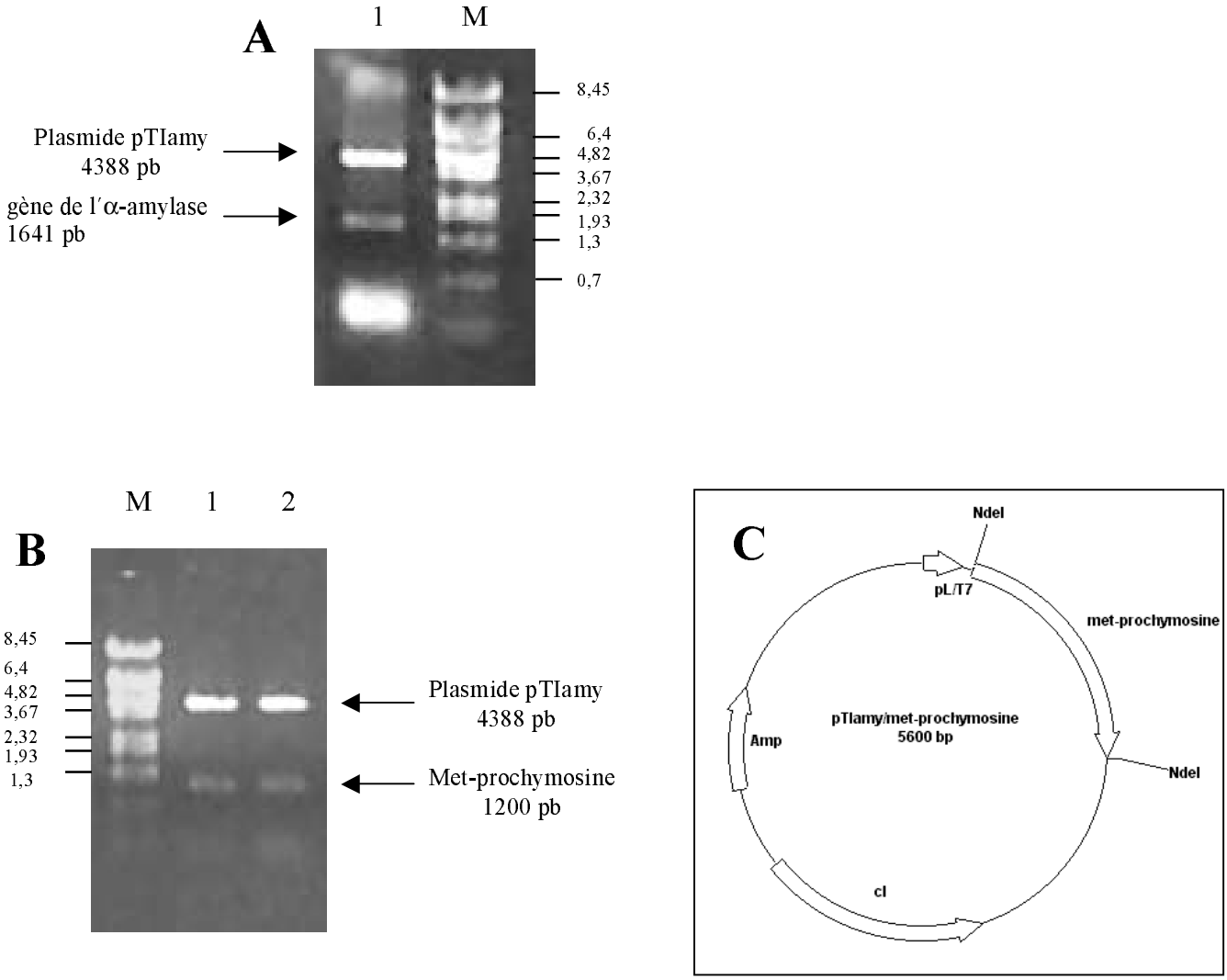


Figure III.11: Analyse des plasmides pTIamy contenant les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N.

(A) Le vecteur pTIamy est digéré par l'enzyme de restriction *Nde*I afin de purifier le fragment de 4388 pb (piste 1).
Les séquences codant les préprochymosines clonées dans le vecteur pGEX-4T-3 ont été amplifiées à l'aide des amorces 217 et 219 afin de gérer des fragments bordés par un site de restriction *Nde*I aux deux extrémités pour le clonage dans le vecteur pTIamy. Les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le vecteur pBluescript avant d'être clonés dans le vecteur pTIamy dans le site *Nde*I.
(B) Les plasmides purifiés correspondant aux séquences codant la met-prochymosine A (piste 1) et la met-prochymosine B S79N (piste 2) dans le vecteur pTIamy ont été digérés par l'enzyme de restriction *Nde*I.
Piste M: Marqueur de taille, λ/*BstE*II (en kb).
(C) Représentation schématique d'un plasmide pTIamy contenant la séquence codant la met-prochymosine.

III.2.2.2. Expression des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans le pTIamy

Nous avons alors induit l'expression des protéines recombinantes par une augmentation de la température du milieu de culture à 42°C pendant deux heures. Nous avons, dans un premier temps, analysé par SDS-PAGE 10% et Western-blot les extraits protéiques bruts des bactéries (*E. coli* XL1-blue) avant et après induction sans toutefois pouvoir observer de différences entre les bactéries induites et non induites et entre les bactéries transformées avec le vecteur pTIamy « vide » (témoin négatif) et les bactéries transformées avec les plasmides contenant les séquences codant la met-prochymosine. Même si l'analyse des extraits protéiques bruts de bactéries par SDS-PAGE est toujours un peu délicate en raison de la présence d'un grand nombre de protéines à séparer électrophorétiquement dans un mini-gel d'environ 5 cm, nous devrions être capable d'observer l'expression de la prochymosine par Western-blot. Toutefois, contrairement à l'expression à l'aide du plasmide pGEX-4T-3 où nous avons utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre la GST, nous avons, ici, utilisé des anticorps polyclonaux dirigés contre la chymosine. En réalisant l'analyse des extraits protéiques bruts des bactéries par Western-blot, nous avons pu observer l'apparition d'un grand nombre de bandes sans être capable d'affirmer la présence de la prochymosine ou non. En effet, les anticorps polyclonaux que nous avons utilisés semblent reconnaître les protéines des bactéries. Afin de diminuer cet artefact, nous avons réalisé l'adsorption des anticorps polyclonaux avec un lysat d'*E. coli* comme décrit dans le chapitre II.11.2. du matériels et méthodes. En utilisant cette nouvelle solution d'anticorps, nous avons réussi à améliorer la qualité des analyses par Western-blot mais le résultat n'a toutefois pas a été jugé satisfaisant. Ainsi, nous avons choisi d'analyser non plus les extraits protéiques bruts des bactéries mais les échantillons partiellement purifiés comme précédemment décrit dans le chapitre de l'expression à l'aide du plasmide pGEX-4T-3.

III.2.2.3. Purification partielle et tests d'activation/activité de la met-prochymosine A et de la met-prochymosine B S79N

Nous avons ainsi partiellement purifié les échantillons selon le protocole de NISHIMORI *et al.* (1984) sans savoir alors si la prochymosine était exprimée ou non. Nous n'avons pas été capables d'observer l'apparition de bandes protéiques par analyses SDS-PAGE. Par contre, nous avons observé, par analyses de Western-blot utilisant les anticorps

polyclonaux contre la chymosine, l´apparition de bandes pour les échantillons provenant des bactéries induites transformées avec les séquences codant la met-prochymosine qui n´apparaissent pas dans le cas de l´échantillon provenant des bactéries induites transformées avec le vecteur pTIamy sans insert (**figure III.12A**). Une des bandes semble correspondre à la prochymosine si nous comparons sa taille avec celle de la chymosine témoin (**figure III.12A**). Les autres bandes, de taille inférieure, nous font penser à une dégradation protéolytique de la prochymosine.

Afin de confirmer la présence de la chymosine, nous avons alors réalisé les tests d´activation/activité et nous avons observé une coagulation du lait pour les échantillons provenant des bactéries induites transformées avec les séquences codant la met-prochymosine et non pour les échantillons provenant des bactéries non induites transformées avec les séquences codant la met-prochymosine et pour l´échantillon provenant des bactéries induites et non induites transformées avec le vecteur pTIamy sans insert, confirmant l´analyse par Western-blot. Nous observons une activité de 2 u/ml d´échantillon purifié et activé pour la chymosine B S79N et une activité de 5 u/ml pour la chymosine A. Il est intéressant de noter que nous étions capables d´observer une activité de coagulation sans même activer l´échantillon. Et si nous analysons plus en détails la **figure III.12A** du Western-Blot, nous pouvons effectivement observer la présence de deux bandes au niveau de la chymosine. Elles pourraient correspondre à la prochymosine, à la chymosine ou à la pseudo-chymosine. Quant à la **figure III.12B**, la bande majoritaire observée semble avoir migré à la hauteur de celle correspondant à la chymosine recombinante de Maxiren.

Nous avons alors tenté d´améliorer le niveau d´expression de la met-prochymosine à l´aide du vecteur pTIamy chez *E. coli*, notamment en faisant varier le temps d´induction, de 1 à 5 h, mais le niveau d´expression est resté le même. Nous avons également testé pour l´expression de la met-prochymosine une autre souche d´*E. coli* DH5α mais, encore une fois, sans amélioration du niveau d´expression.

Même si le niveau d´expression de la prochymosine s´est avéré faible, l´important est que nous avons montré que la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N exprimées à l´aide du plasmide pTIamy chez *E. coli* présentaient une activité de coagulation sur le lait. Ce résultat, que nous n´avions pas réussi à obtenir utilisant le système d´expression pGEX-4T-3, est intéressant car il montre que les protéines mutantes sont actives. Comme nous l´avons précédemment écrit dans le chapitre III.1.3. « Analyse des mutations », nous voulons analyser l'effet de la mutation S79N qui se trouve dans le tampon qui couvre la fente du site actif de la protéine. Pour cela, nous avons construit la séquence codant la

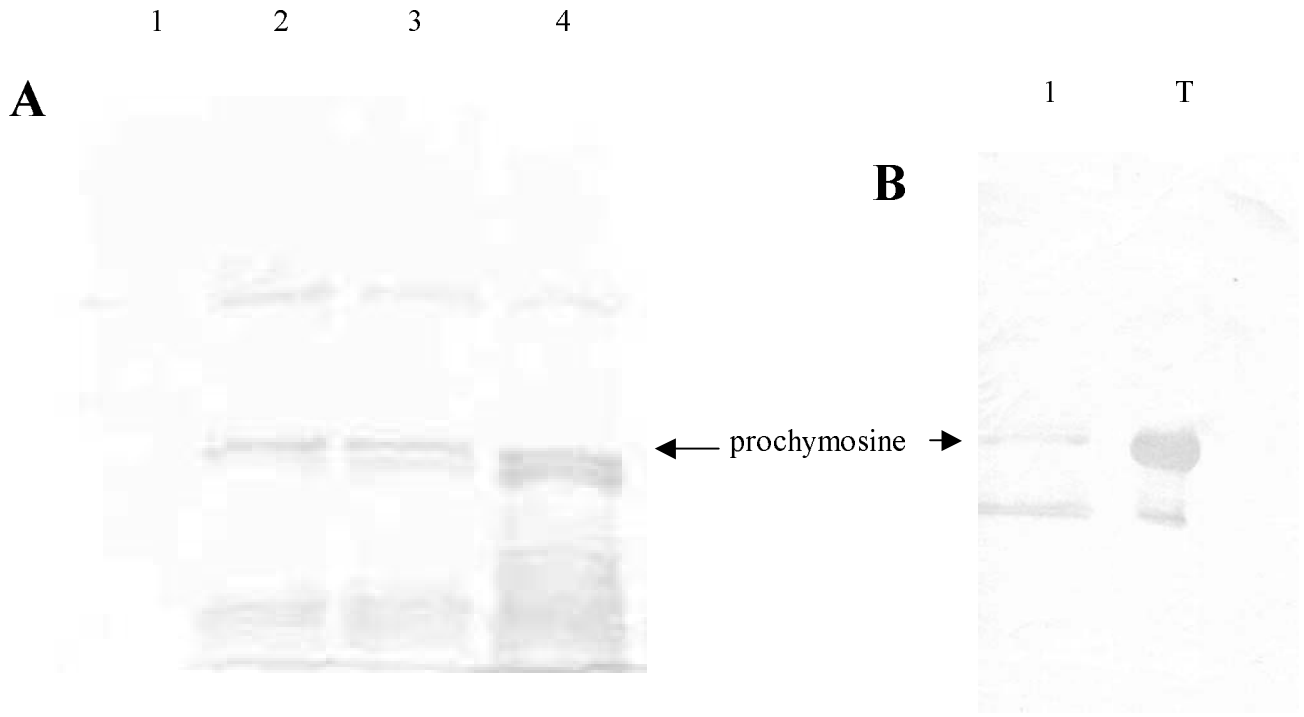


Figure III.12: Analyses par Western-blot utilisant les anticorps polyclonaux anti-chymosine de l´expression de la met-prochymosine A, de la met-prochymosine B S79N et de la met-prochymosine B par *E. coli* à l´aide du plasmide pTIamy.

L´expression a été induite à 42°C pendant deux heures. Les cellules ont alors été centrifugées et la prochymosine a été purifiée selon le protocole de NISHIMORI *et al.* (1984).

(A) Piste 1 : 16 µl d´une solution purifiée à partir de cellules bactériennes induites provenant d´une culture de clone pTIamy (sans insert).
Pistes 2, 3 et 4 : 16 µl d´une solution purifiée à partir de cellules bactériennes induites 2 h à 42°C provenant d´une culture de clones pTIamy/met-prochymosine A, pTIamy/met-prochymosine B S79N et pTIamy/met-prochymosine B.

(B) Piste 1: 16 µl d´une solution purifiée à partir de cellules bactériennes induites 2 h à 42°C provenant d´une culture du clone pTIamy/met-prochymosine A
Piste T: 2 µg de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

met-prochymosine B sauvage à partir des séquences de la met- prochymosine A et met-prochymosine B S79N clonées dans le vecteur pTIamy maintenant que nous savons que celles-ci sont actives.

III.2.3. Construction de la séquence codant la met-prochymosine B

Nous avons construit la séquence codant la met-prochymosine B « sauvage », en restaurant la sérine 79 par remplacement de la région mutée de la chymosine B par la région sauvage provenant de la chymosine A. Les deux séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N (clonés dans le vecteur pTIamy – *E. coli*) ont été digérées avec les enzymes de restriction *Apa*I et *Bgl*II. Le fragment de 662 bp et le vecteur digéré moins ce fragment ont été purifiés et ligaturés de manière à reconstruire la séquence codant la met-prochymosine B « sauvage » (**figure III.13A**). Le plasmide issu de la transformation a été analysé par restriction utilisant l'enzyme *Nde*I. On a obtenu la libération d'un fragment d'environ 1200 pb, correspondant donc à la séquence codant la met-prochymosine B (**figure III.13B**). De plus, par séquençage automatique, nous avons pu vérifier que notre construction était correcte et que nous avions effectivement réussi à restaurer la sérine dans la position 79 de la met-prochymosine B.

De la même manière que pour la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N, nous avons réalisé les tests d'induction et analysé les échantillons partiellement purifiés. Nous avons ainsi observé l'apparition de bandes par analyses de Western-blot qui n'apparaissent pas dans le cas de l'échantillon provenant des bactéries induites transformées avec le vecteur pTIamy sans insert (**figure III.12A,** pistes 1 et 4). Comme pour la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N, une des bandes semble correspondre à la prochymosine et les autres bandes, de taille inférieure, pourraient correspondre à une dégradation protéolytique de la prochymosine. Il semblerait néanmoins que cette dégradation soit plus importante dans le cas de la met-prochymosine B (plus grand nombre de bandes). Enfin, les tests d'activation/activité ont montré que la met-prochymosine B « reconstruite » présentait une activité de coagulation du lait du même ordre que celles obtenues avec la met-prochymosine A et la met-prochymosine B (3 u/ml).

Dès lors, nous avons choisi de cloner ces trois séquences codantes dans un système d'expression qui, d'une part, permet l'expression d'une protéine recombinante sous une forme soluble et qui, d'autre part permet la sécrétion de la protéine recombinante, facilitant alors les étapes de purification.

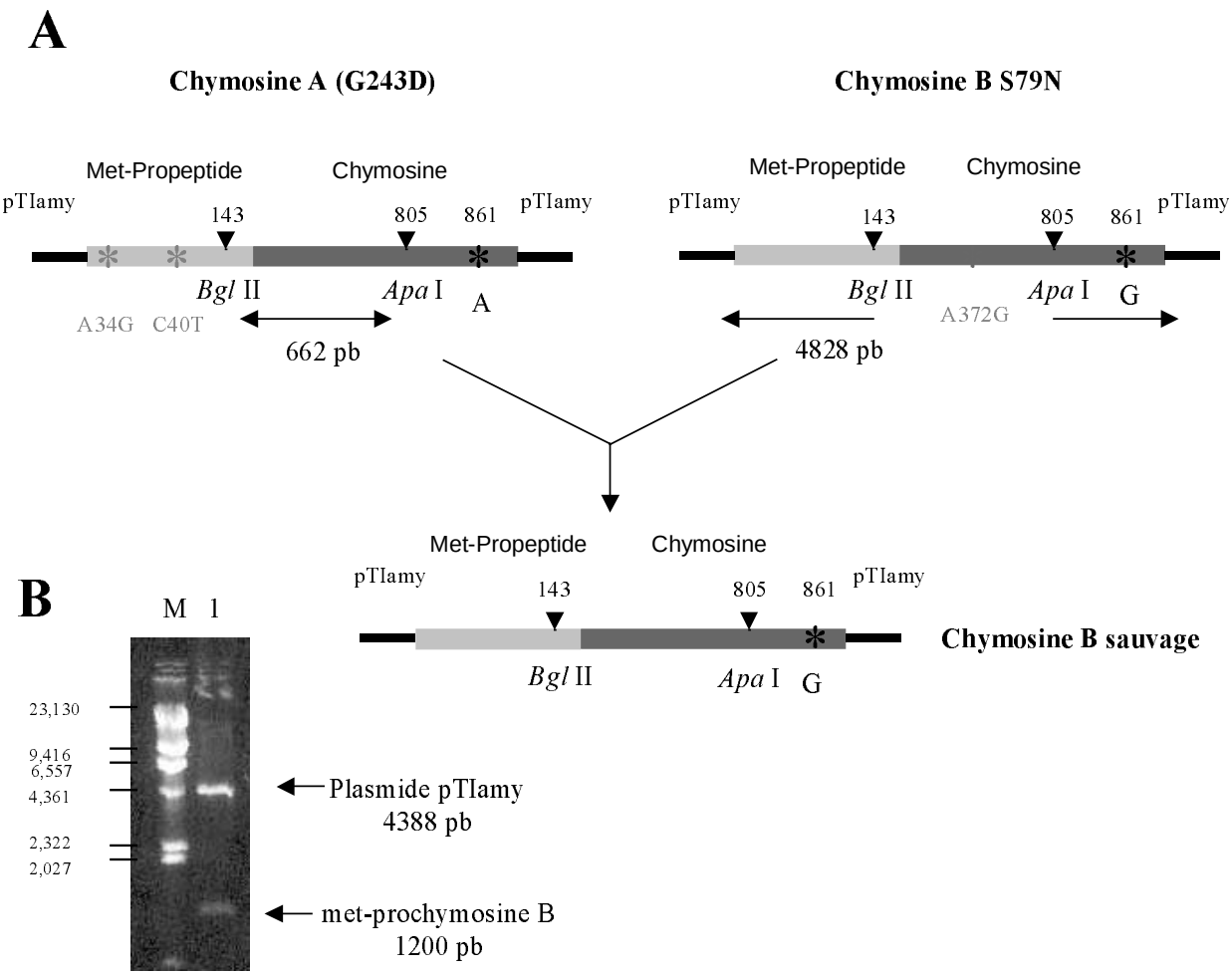


Figure III.13 : Construction du plasmide portant la séquence codant la met-prochymosine B à partir des plasmides portant la séquence codant la met-prochymosine A et du plasmide portant la séquence codant la met-prochymosine B S79N.

(A) Les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N sont insérées aux sites *Nde*I du vecteur bactérien pTI*amy*. Le vecteur codant la met-prochymosine B S79N et celui codant la met-prochymosine A ont été digérés par les enzymes *Bgl*II et *Apa*I. Le fragment de 662 bp provenant de la digestion du plasmide codant la met-prochymosine A a été inséré dans le vecteur codant la met-prochymosine B digérée par ces mêmes enzymes.
*: mutations d'intérêt (la numérotation utilisée est celle de la séquence d´ADN)
*: position indiquant la différence entre la chymosine A et la chymosine B.

(B) Clone correspondant à la séquence codant la met-prochymosine B (piste 1) dans le vecteur pTIamy digéré par l´enzyme de restriction *Nde*I.
Piste M: Marqueur de taille, λ/*Hind*III (en kb).

Le système d´expression que nous avons choisi d´utiliser est celui de *P. pastoris*. Cette levure méthylotrophe est en effet utilisée avec succès pour sécréter des protéines hétérologues dans le milieu de culture extracellulaire (CREGG *et al.*, 1993 ; CEREGHINO et CREGG, 2000 ; GELLISSEN, 2000 ; CEREGHINO *et al.*, 2002), notamment la prochymosine (ESPINOSA *et al.*, 1999).

III.3. Clonage et expression des séquences codant la met-prochymosine bovine chez *Pichia pastoris*

III.3.1 *Pichia pastoris*

Dans une première partie, nous parlerons de manière plus détaillée du système d´expression chez *P. pastoris*, qui est l´une des 30 espèces de levures capables d´utiliser le méthanol comme source de carbone. Ces levures sont regroupées en deux genres, *Pichia* et *Candida*. Dans les années 70, les chercheurs de Phillips Petroleum Company (Bartlesville, Etats-Unis) ont développé des méthodes de culture continue à haute densité cellulaire pour *P. pastoris* utilisant le méthanol. En effet, le méthanol pouvant être synthétisé à partir du gaz naturel (méthane) à coûts réduits, l´intérêt était alors d´exploiter *P. pastoris* en tant que biomasse ou Single-Cell-Protein (SCP) utilisée alors comme supplément riche en protéines dans l´alimentation animale (ANUPAMA et RAVINDRA, 2000). Toutefois, le prix du méthane ayant augmenté de manière considérable pendant cette même période en raison de la crise du pétrole et, en contrepartie, le prix du soja ayant diminué (source principale de protéines dans l´alimentation animale), les procédés développés pour la production de SCP n´ont pu être rentabilisés car ils se sont trouvés être peu compétitifs (CREGG *et al.*, 2000).

Dans les années 80, les chercheurs de Phillips Petroleum Company ont contracté les services d´une entreprise de Biotechnologie, "Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, INC" (SIBIA, La Jolla, Etats-Unis) afin de développer *P. pastoris* comme un système d´expression de gènes hétérologues. Les chercheurs de SIBIA ont alors isolé le gène de l´alcool oxydase *AOX1* avec son promoteur et ont développé des vecteurs, des lignées de levures et des méthodes pour la manipulation de *P. pastoris*. En 1993, Phillips Petroleum Company donnait la permission à Invitrogen de vendre les composants du système. Depuis, le clonage et l´expression de protéines hétérologues chez *P. pastoris* n´a cessé d´augmenter. Ce système d´expression doit sans aucun doute son succès à un ensemble de facteurs dont le plus important est la simplicité des techniques de manipulation et leur similarité avec *S. cerevisiae*.

Selon CREGG *et al.* (2000), plus de 200 protéines hétérologues ont été exprimées avec succès chez *P. pastoris*. Ces auteurs maintiennent une liste actualisée regroupant les protéines recombinantes exprimées chez *P. pastoris* dans le site internet : http://www.faculty.kgi.edu/cregg/Pichia2.htm. Toutefois, la prochymosine bovine n'y est pas répertoriée même si celle-ci a été exprimée chez *P. pastoris* dès 1991 (YONG *et al.*, 1991). Ces auteurs ont en effet construit leur propre système d'expression, différent de celui développé par les chercheurs de SIBIA. Le plasmide pPPC316-3 utilisé porte le gène *HIS3* qui complémente le gène *his3* chez la souche de *P. pastoris* BKM-90 permettant la sélection des clones sur milieu minimum en absence d'histidine. Ce plasmide contient également le promoteur du gène de l'alcool oxydase *AOX1*, qui est induit par la présence de méthanol, ainsi que les séquences 5' et 3' *AOX1* qui permettent l'insertion du gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison entre des régions homologues du plasmide et du génome de *P. pastoris*. Il porte la séquence signal de sécrétion dérivée du gène de la saccharose invertase (*SUC2*) de *S. cerevisiae* permettant la sécrétion de la protéine hétérologue. Enfin, ce plasmide contient la séquence de terminaison dérivée du gène de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) de *S. cerevisiae*.

Dans ce travail, nous nous proposons de cloner les séquences codant la met-prochymosine chez *P. pastoris* utilisant le système d'expression commercialisé par Invitrogen, comprenant les vecteurs pHIL-S1 et pPIC9 et la souche de levure *P. pastoris GS115*. Ces deux vecteurs permettent la sécrétion de la protéine hétérologue. Ils portent le gène *HIS4* qui complémente le gène *his4* chez *P. pastoris GS115* pour la sélection des transformants (ces plasmides sont décrits de manière plus détaillée dans le chapitre II.2.2.2. du Matériels et Méthodes).

III.3.2. Clonage des séquences codant la met-prochymosine chez *Pichia pastoris*

Les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N ont été clonées dans les plasmides pHIL-S1 et pPIC9 et la séquence codant la met-prochymosine B a été clonée dans le plasmide pPIC9. Les séquences d'intérêt clonées dans le vecteur pTIamy ont été amplifiées par PCR utilisant les oligonucléotides qui contiennent les sites *Xho*I (amorces 65 et 66) ou *Not*I (amorces 67 et 68) afin de les sous-cloner respectivement dans le site *Xho*I du vecteur d'expression pHIL-S1 et dans le site *Not*I du plasmide pPIC9. Nous avons, dans un premier temps, tenté de sous-cloner les produits d'amplification digérés avec les endonucléases de restriction *Xho*I ou *Not*I dans les plasmides pHIL-S1 et pPIC9

préalablement digérés avec *Xho*I et *Not*I respectivement mais sans succès. Nous avons alors choisi de les sous-cloner dans le vecteur pZero-2 pour ensuite pouvoir digérer les plasmides ainsi générés avec ces mêmes endonucléases de restriction, purifiant les fragments libérés et les sous-clonant dans les vecteurs pHIL-S1 et pPIC9. La **figure III.14A** montre les plasmides qui ont été générés par le clonage des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N dans les plasmides pHIL-S1 et pPIC9, digérés avec les endonucléases de restriction *Xho*I et *Not*I, libérant les fragments d´intérêt, la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N. De même, la **figure III.15** illustre le clonage de la séquence codant la met-prochymosine B dans le vecteur pPIC9. En ce qui concerne la met-prochymosine B, nous avons choisi de la sous-cloner uniquement dans le vecteur pPIC9. En effet, ce clonage ayant été réalisé postérieurement au clonage des séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N, nous avions déjà réalisé les tests d´expression et nous avions observé qu´il n´existait pas de différence entre les niveaux d´expression observés chez les levures ayant intégré l´un ou l´autre plasmide, décidant alors de cloner la séquence codant la met-prochymosine B uniquement dans un vecteur, le pPIC9.

III.3.3. Transformation et criblage des transformants

Avant de réaliser le transformation de *P. pastoris*, nous avons séquencé les plasmides pHIL-S1 et pPIC9 contenant les séquences codant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B à l´aide du kit ThermoSéquénase® (Amersham Life Science) en utilisant les amorces 5´ et 3´ *AOX1*. Nous avons ainsi vérifié l´intégrité de nos constructions en confirmant que les séquences d´intérêt étaient clonées « en phase » avec le codon d´initiation de la séquence signal.

Nous avons réalisé des préparations de plasmides utilisant la technique de lyse alcaline décrite dans le matériels et méthodes. Les plasmides pHIL-S1, pHIL-S1/met-prochymosine A, pHIL-S1/met-prochymosine B S79N, pPIC9, pPIC9/met-prochymosine A, pPIC9/met-prochymosine B S79N et pPIC9/met-prochymosine B ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction *Sal*I et *Dra*I. 10 µg de chacune de ces préparations ont alors été utilisés pour la transformation par électroporation de *P. pastoris GS115*. Il est intéressant de rappeler que nous cherchons à isoler des transformants $His^{+}Mut^{+}$ et $His^{+}Mut^{s}$ afin de déterminer la meilleure construction pour l´expression de la protéine d´intérêt. En digérant les plasmides avec l´enzyme de restriction *Sal*I, nous facilitons l´apparition de transformants Mut^{+}. En

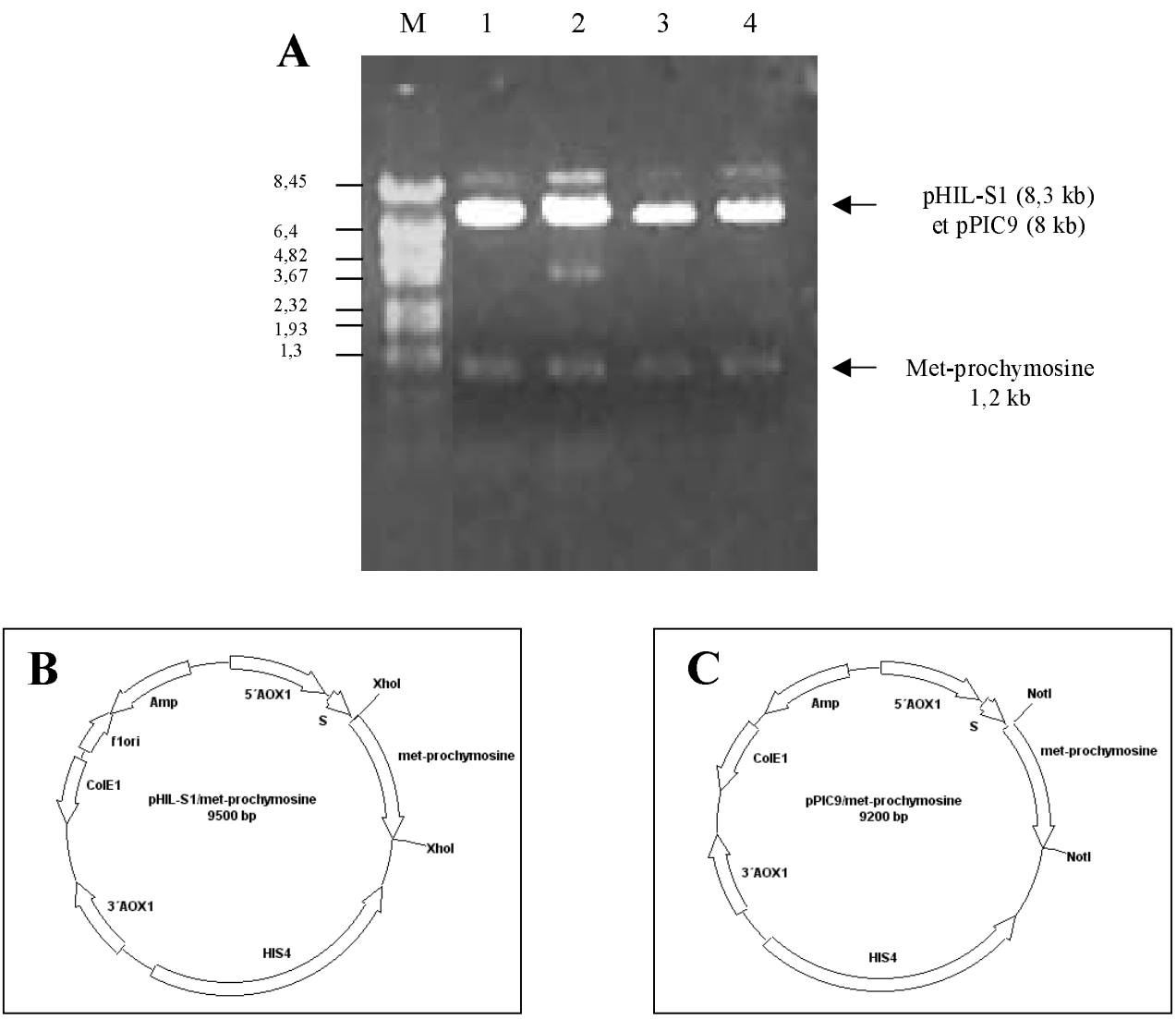


Figure III.14: Analyse des plasmides pHIL-S1 et pPIC9 contenant les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N.

Les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B S79N clonées dans le vecteur pTIamy ont été amplifiées avec les amorces 65/66 (clonage pHIL-S1) et 67/68 (clonage pPIC9). Les produits d´amplification ont été sous-clonés dans le vecteur pZero pour ensuite être clonés dans les vecteurs pHIL-S1 dans le site *Xho*I et pPIC9 dans le site *Not*I.

(A) Plasmides pHILS1/met-prochymosine A (piste 1), pHIL-S1/met-prochymosine B S79N (piste 2) digérés par l´enzyme de restriction *Xho*I et plasmides pPIC9/met-prochymosine A (piste 3), pPIC9/met-prochymosine B S79N (piste 4) digérés par l´enzyme de restriction *Not*I libérant les fragments d´intérêt.

Pistes M: Marqueur de taille, λ/*BstE*II (en kb).

(B) et (C) Représentations schématiques des plasmides pHIL-S1 et pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine.

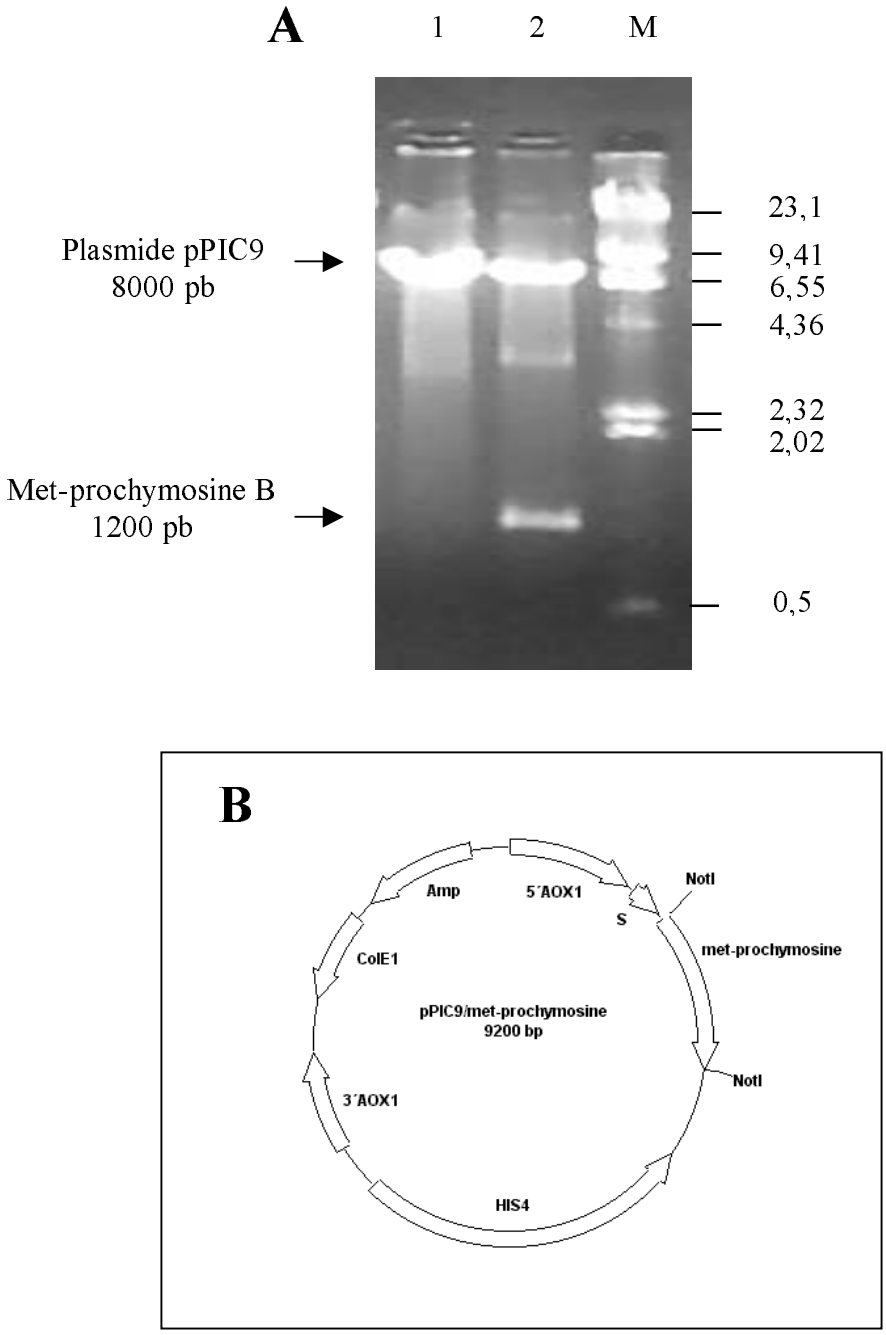


Figure III.15: Analyse du plasmide pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine B.

La séquence codant la met-prochymosine B clonée dans le vecteur pTIamy a été amplifiée avec les amorces 67/68. Le produit d´amplification a été sous-cloné dans le vecteur pZero pour ensuite être cloné dans le vecteur pPIC9 dans le site *Not*I.
(A) Plasmides pPIC9 (piste 1) et pPIC9/met-prochymosine B (piste 2) digérés par l´enzyme de restriction *Not*I.
Pistes M: Marqueur de taille, λ/*Hind*III (en kb).
(B) Représentation schématique d´un plasmide pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine.

digérant les plasmides avec l'enzyme de restriction *Dra*I, nous facilitons l'isolement de transformants Mut^s.

Les levures ont alors été étalées sur milieu minimum avec glucose (MD) sans histidine (marqueur de sélection). Les boîtes ont été placées à 30°C pendant 3 à 4 jours jusqu'à l'apparition de colonies. Nous n'avons pas observé de colonies sur les boîtes où les levures transformées sans ADN ont été étalées. Nous avons obtenu environ 200 transformants His^+ (capables de se développer sur milieu minimum sans histidine) en ce qui concerne les transformations utilisant les vecteurs linéarisés avec l'endonucléase de restriction *Sal*I. Nous avons observé environ 50 colonies His^+ pour les transformations avec les plasmides digérés avec l'endonucléase de restriction *Dra*I, sauf pour le plasmide pPIC9/met-prochymosine B où nous n'avons obtenu que 3 colonies mais dans ce cas précis, il est fort probable que la transformation n'ait pas fonctionné. La probabilité de recombinaison semble plus grande avec les plasmides linéarisés avec l'enzyme *Sal*I. Comme nous l'avions déjà observé dans le chapitre Matériels et Méthodes, *Bgl*II est l'enzyme de restriction normalement recommendée pour générer des transformants His^+Mut^s. Celle-ci possédant un site de reconnaissance dans la séquence codant la met-prochymosine, nous avons dû reporter notre choix sur l'endonucléase *Dra*I. Mais celle-ci, contrairement à *Bgl*II qui linéarise le plasmide, possède 5 sites de reconnaissance dans le vecteur pHIL-S1 et 6 dans le vecteur pPIC9, générant alors dans les deux cas plusieurs fragments d'ADN qui pourrait en rendre difficile la transformation ou la recombinaison.

Dans tous les cas, nous avons obtenu un rendement nettement inférieur à celui décrit dans le « manuel d'expression de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* » (Invitrogen) qui est de 10^3 à 10^4 transformants par µg d'ADN. Nous obtenons un rendement de 20 colonies et de 5 colonies par µg. Nous ne connaissons pas les raisons d'un si faible rendement de transformation et sans même essayer de l'améliorer, nous avons décidé de tester la capacité des colonies obtenues à exprimer de la prochymosine bovine.

Toutes les colonies capables de se développer sur milieu minimum sans histidine ont donc été repiquées sur milieu minimum avec glucose (MD) et milieu minimum avec méthanol (MM) afin de tester l'utilisation du méthanol. L'observation d'une différence de croissance entre les deux milieux permet de déduire si la levure est sensible (Mut^s) ou non (Mut^+) au méthanol, sachant que sa croissance va être ou non ralentie en présence de méthanol. Le phénotype (Mut^+ ou Mut^s) sera ensuite confirmé à l'aide de la réaction PCR comme décrit dans le chapitre II.13.3.2. « Réaction de PCR » du Matériels et Méthodes.

Pour le criblage des clones, nous avons réalisé des cultures «classiques» de 50 ml de *P. pastoris* comme nous l´avons décrit dans le chapitre II.13.2.2 « Expression de la met-prochymosine » du Matériels et Méthodes (MISTRY *et al.*, 1997). Les colonies de *P. pastoris* transformées capables de se développer sur milieu minimum sans histidine (marqueur de sélection) ont ainsi été testées pour leur capacité à exprimer de la prochymosine bovine. En ce qui concerne les séquences codant la met-prochymosine A et la met-prochymosine B, nous avons testé l´expression à l´aide des plasmides pHIL-S1 et pPIC9 et en ce qui concerne la séquence codant la met-prochymosine B S79N, nous avons testé l´expression à l´aide du plasmide pPIC9. Nous avons également réalisé les tests d´expression concernant *P. pastoris* transformée avec les plasmides pHIL-S1 et pPIC9 «vides» (témoins négatifs). Nous avons testé 9 transformants par transformation pour les plasmides contenant les séquences codant la met-prochymosine et un transformant pour les plasmides sans insert.

Les surnageants de culture ont alors été prélevés avant et 24 h après induction au méthanol et ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE, Western-blot et à l'aide de tests de coagulation du lait. Les premiers résultats montrent que la prochymosine est sécrétée par *P. pastoris* dans le milieu de culture. La **figure III.16** illustre l´analyse de 8 transformants correspondant à *P. pastoris* transformée avec le vecteur pPIC9/met-prochymosine B digéré avec l´enzyme de restriction *Sal*I. Nous avons comparé, pour chaque clone, le milieu de culture avant et après induction au méthanol. Nous avons également analysé l´expression d´une souche de *P. pastoris* transformée avec le vecteur pPIC9, utilisée comme témoin négatif. Nous avons parallèlement effectué les tests d´activation/activité selon EMTAGE *et al.* (1983), comme précédemment décrit dans le matériels et méthodes. Les clones 37, 38, 41, 42 et 43 ont montré une activité de coagulation du lait, alors que les clones 39, 40 et 44 n´ont pas présenté une telle activité. Si nous observons l´analyse par SDS-PAGE, nous pouvons dire que le «profil» d´expression des clones 39, 40 et 44, qui ne présentent pas d´activité de coagulation de lait, est semblable à celui de *P. pastoris* transformée par le vecteur pPIC9 «vide». Quant aux transformants 37, 38, 41, 42 et 43, nous observons une bande qui semble correspondre à la prochymosine, dont la taille est d´environ 42 kDa. Cette bande n´apparaît qu´après induction par le méthanol (**figure III.16**). L´expression de la prochymosine est en effet sous le contrôle du promoteur dérivé du gène *AOX1*. L´expression de ce gène est sévèrement régulée et induite par le méthanol. Sa régulation est similaire à celle du gène *GAL1* chez *S. cerevisiae*. En effet, deux mécanismes semblent être impliqués: un mécanisme de répression/dérépression et un mécanisme d´induction. Toutefois, contrairement à la régulation du gène *GAL1*, les conditions de dérépression (c´est à dire l´absence d´une source

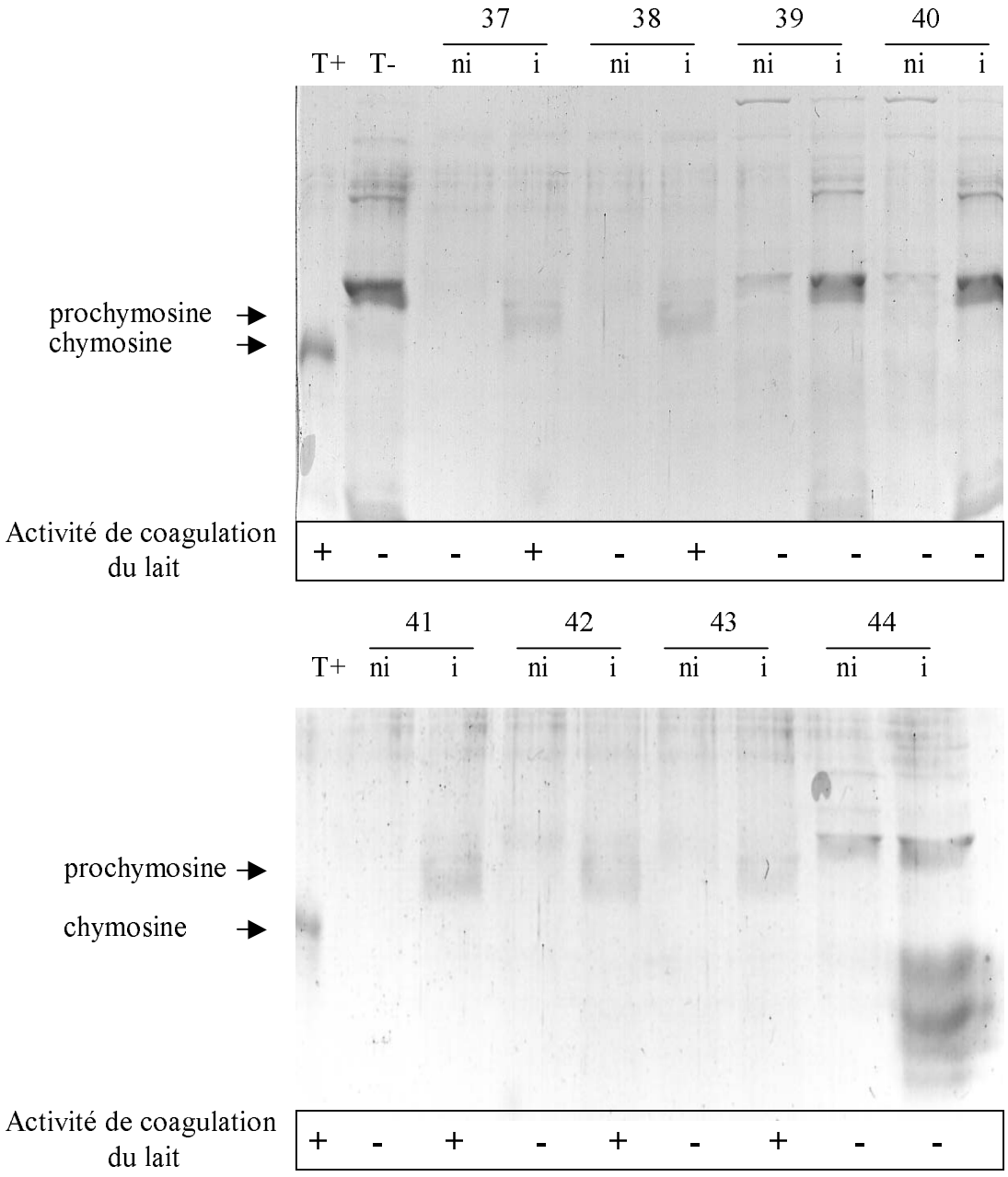


Figure III.16: Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris* et tests d´activité de coagulation du lait des surnageants de culture.

Les pistes « ni » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMGY (non induit) et les pistes « i » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture des clones de *P. pastoris* 37 à 44.
La piste T- (témoin négatif) correspond à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture d´un clone pPIC9 (sans insert).
La piste T+ (témoin positif) correspond à 4 µg de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).
Les tests d´activité de coagulation du lait ont été réalisés comme décrit dans le matériels et méthodes.+: test positif, -: test négatif.

de carbone qui réprime comme le glucose par exemple) ne conduisent pas à une transcription substantielle du gène *AOX1*. La présence de méthanol apparaît ainsi comme étant essentielle pour induire des hauts niveaux de transcription (CREGG *et al.*, 2000). La prochymosine n'est alors exprimée qu'en présence de méthanol.

De la même manière, la **figure III.17** illustre l'analyse par SDS-PAGE de l'expression et la sécrétion de 4 des 9 transformants testés pour *P. pastoris* transformée par le vecteur pPIC9/met-prochymosine B S79N. Nous avons de nouveau comparé le milieu de culture avant et après induction. Nous avons pu observer la présence d'une bande correspondant à une protéine d'environ 42 kDa dans le milieu de culture après induction au méthanol. Les 4 transformants testés ont présenté une activité de coagulation du lait. Le niveau d'expression semble différent d'un clone à un autre, sachant que le clone 2S9 semble être le transformant ayant le niveau d'expression le plus bas. La chymosine B avec la mutation S79N exprimée chez *P. pastoris* présente également une activité sur le lait, comme nous l'avions dèjà observé chez *E. coli*.

Les **figures III.18** et **III.19** illustrent également la sélection des transformants, analysant par SDS-PAGE et par Western-blot (utilisant les anticorps polyclonaux anti-chymosine) l'expression et la sécrétion de la prochymosine B par les clones 37 et 38 et l'expression et la sécrétion de la prochymosine B S79N par les clones 2S8 et 2S10. L'analyse par Western-blot confirme la présence de la prochymosine dans le milieu de culture après induction au méthanol.

En ce qui concerne la sélection des transformants, nous ne présenterons ici que ces quatre figures, utilisées à titre d'exemple, sachant que nous avons analysé 9 transformants par transformation (sauf dans le cas du plasmide pPIC9/met-prochymosine B digéré avec *Dra*I). Nous avons regroupé les résultats de transformation et criblage des transformants dans le **tableau III.2**. Nous pouvons, à partir de ces données, réaliser les observations suivantes. D'une part, le nombre de clones positifs est, en général, plus grand dans le cas des plasmides digérés avec l'enzyme de restriction *Sal*I. D'autre part, le nombre de clones positifs est également supérieur pour les transformations avec les plasmides pPIC9. Ce plasmide semblerait donc plus approprié pour la sécrétion de la met-prochymosine que le vecteur pHIL-S1. La séquence signal de sécrétion du facteur α de *S. cerevisiae* du vecteur pPIC9 semblerait plus efficace dans ce cas. Selon CEREGHINO et CREGG (2000), la séquence signal de sécrétion dérivée du gène *PHO1* de *P. pastoris* et la séquence signal de sécrétion du facteur α de *S. cerevisiae* sont utilisées avec succès mais les résultats restent variables. Il semble néanmoins que le prepropeptide du facteur α de *S. cerevisiae* possède un léger avantage et

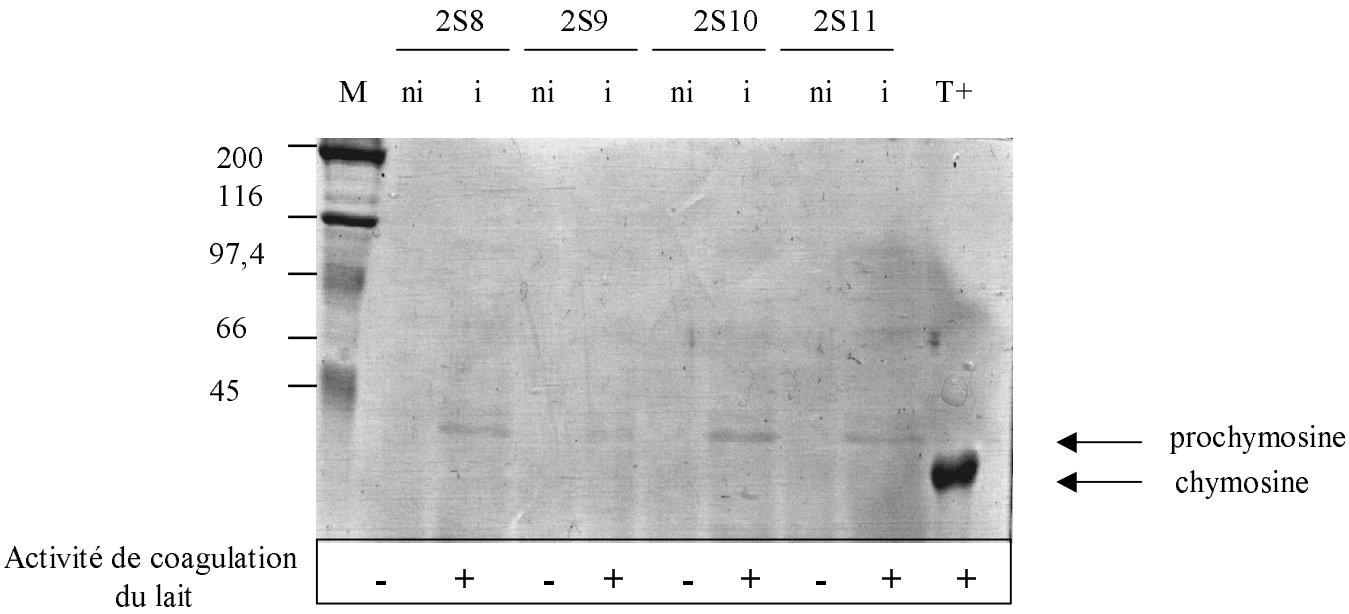


Figure III.17: Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B S79N par différents clones de *P. pastoris* et tests d´activité de coagulation du lait des surnageants de culture.

Les pistes « ni » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMGY (non induit) et les pistes « i » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture des clones 2S8 à 2S11.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Piste T+ (témoin positif) correspond à 4 µg de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).
Les tests d´activité de coagulation du lait ont été réalisés comme décrit dans le matériel et méthodes.+: test positif, -: test négatif.

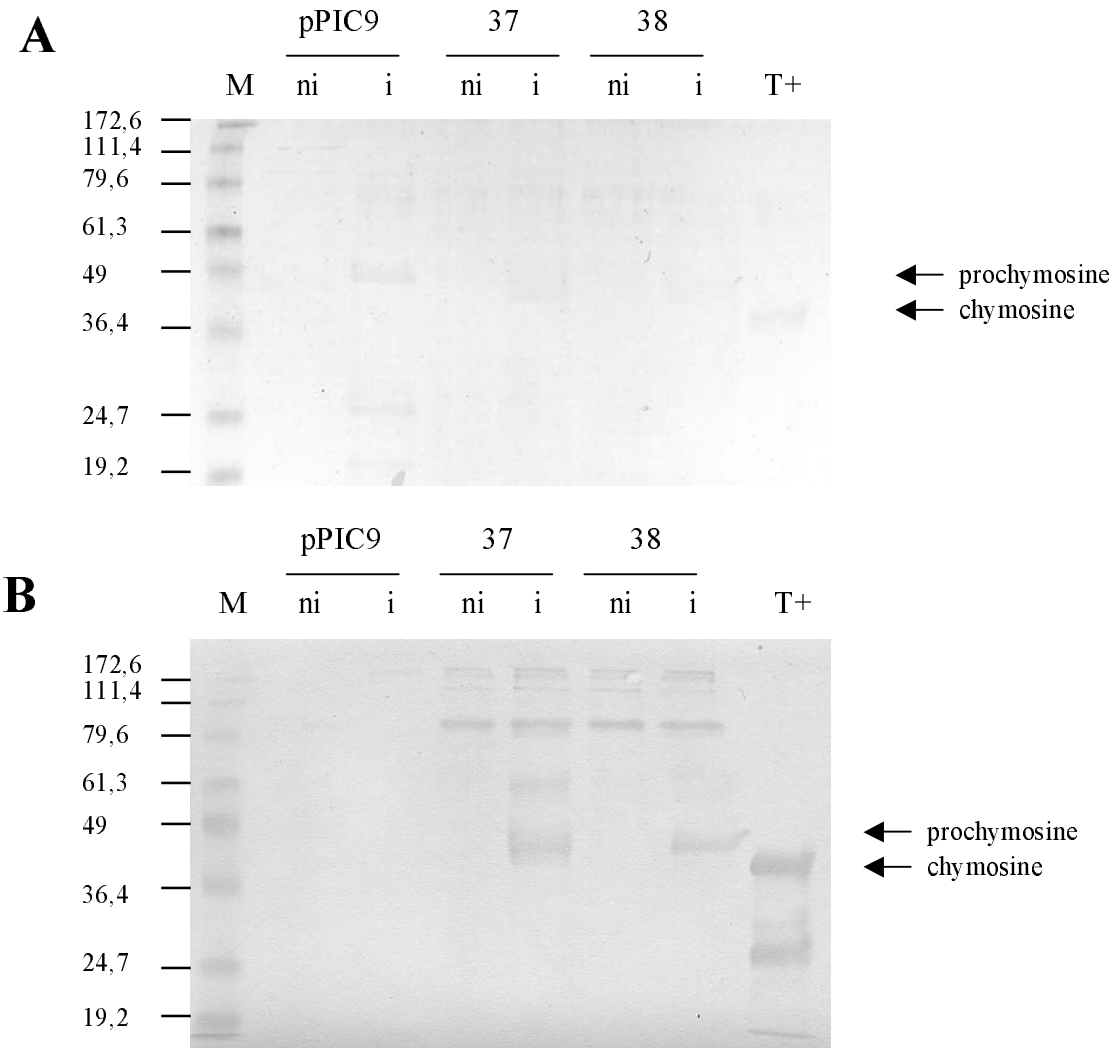


Figure III.18: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris*.

Les pistes « ni » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMGY (non induit) provenant de culture des clones pPIC9 (sans insert) et des clones 37 et 38 (prochymosine B). Les pistes « i » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture les clones pPIC9 (sans insert) et des clones 37 et 38 (prochymosine B).
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Les pistes T+ (témoin positif) correspondent à 4 µg (A) et à 2 µg (B) de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

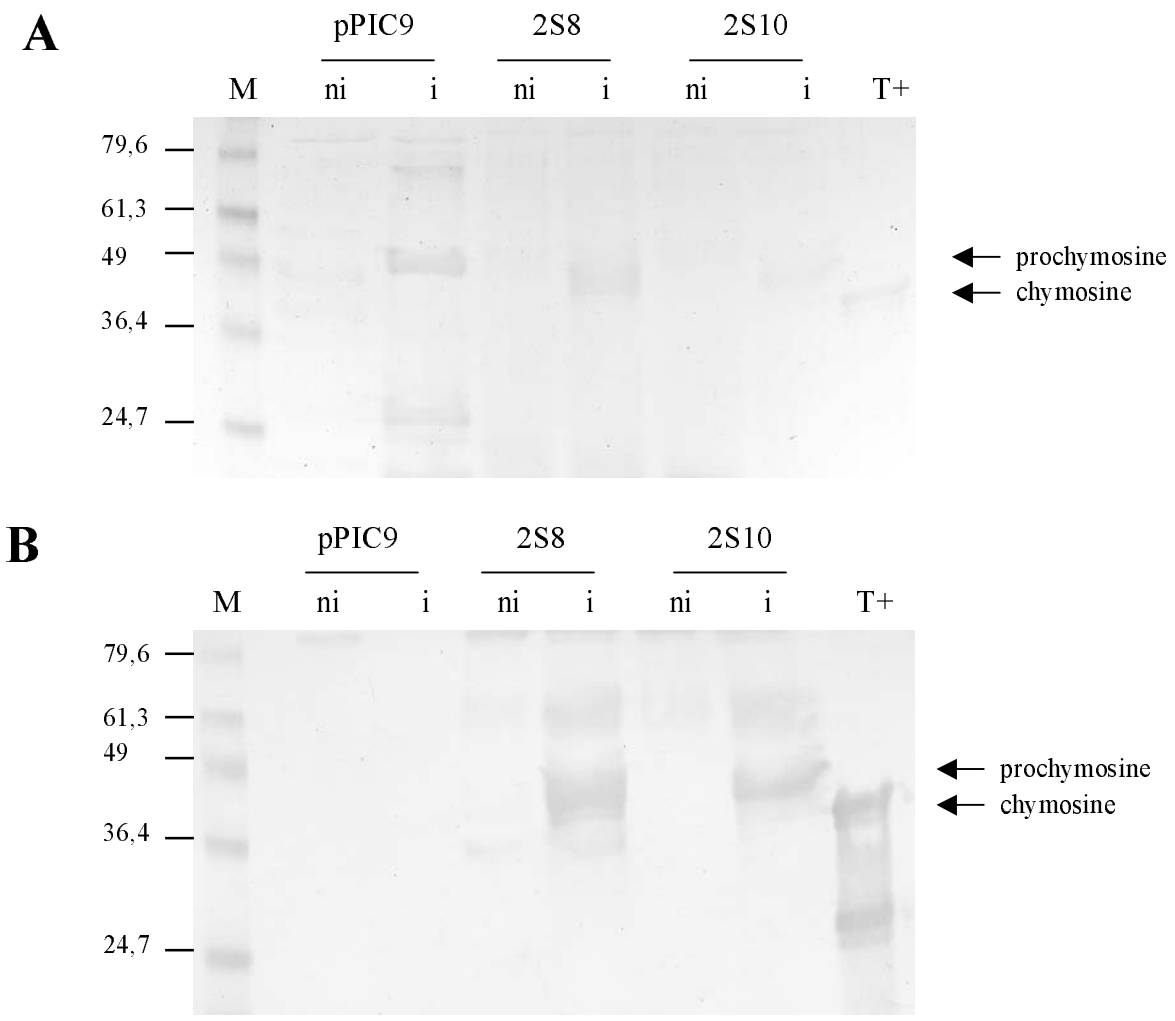


Figure III.19: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B S79N par différents clones de *P. pastoris*.

Les pistes « ni » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMGY (non induit) provenant de culture des clones pPIC9 (sans insert) et des clones 2S8 et 2S10 (prochymosine B S79N). Les pistes « i » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture des clones pPIC9 (sans insert) et des clones 2S8 et 2S10 (prochymosine B S79N).
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Les pistes T+ (témoin positif) correspondent à 4 µg (A) et à 2 µg (B) de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

Tableau III.2 : Transformation et criblage des clones de *P. pastoris*.

Les plasmides ont été linéarisés avant transformation à l'aide des endonucléases de restriction *Sal*I (pour générer des transformants His^+Mut^+) et *Dra*I (pour générer des transformants His^+Mut^s). Dans ce tableau sont donnés le nombre de transformants His^+ par transformation, le nombre de transformants testés pour l'expression de la met-prochymosine, le nombre de clones positifs ainsi que le nom des clones utilisés dans la suite de notre étude.

Plasmides	Plasmides digérés par	Nombre de transformants	Nombre de transformants testés/expression met-prochymosine	nombre de clones positifs	clones utilisés dans la suite de cette étude
pHIL-S1 (Témoin négatif)	*Sal*I	200	1	0	
	*Dra*I	50	1	0	
pHIL-S1/met-prochymosine A	*Sal*I	200	9	2	
	*Dra*I	50	9	2	
pHIL-S1/met-prochymosine B S79N	*Sal*I	200	9	6	
	*Dra*I	50	9	4	
pPIC9 (Témoin négatif)	*Sal*I *Dra*I	200	1	0	clone pPIC9
		50	1	0	
pPIC9/met-prochymosine A	*Sal*I	200	9	9	clone 4S9
	*Dra*I	50	9	6	
pPIC9/met-prochymosine B S79N	*Sal*I	200	9	8	clone 2S8
	*Dra*I	50	9	2	
pPIC9/met-prochymosine B	*Sal*I	200	9	6	clone 37
	*Dra*I	3	3	0	

serait utilisé avec un plus grand succès. Cette séquence signal de sécrétion du facteur α de *S. cerevisiae* consiste en une séquence signal de 19 acides aminés (pré) suivie par une séquence de 66 acides aminés (pro).

Si nous nous intéressons à présent uniquement aux clones positifs, nous avons observé que le niveau d´expression de la met-prochymosine des souches de *P. pastoris* transformées avec les vecteurs digérés avec l´endonucléase de restriction *Dra*I est inférieur à celui des souches de *P. pastoris* transformées avec les vecteurs digérés avec l´endonucléase de restriction *Sal*I. En effet, nous n´avons pas été capables d´observer la présence de la prochymosine par analyses SDS-PAGE pour les clones transformés avec les plasmides digérés avec *Dra*I. Nous n´avons pu observer qu´une faible activité de coagulation du lait après réalisation des tests d´activation/activité.

De plus, nous avons observé que, pour les clones positifs, il n´existait pas de différences d´expression entre les deux plasmides (pHIL/S1 et pPIC9), contredisant l´hypothèse précédemment émise que la séquence signal de sécrétion du facteur α de *S. cerevisiae* du vecteur pPIC9 est plus efficace que celle dérivée du gène de la phosphatase acide (*PHO1*) du pasmide pHIL-S1. En effet, si tel était le cas, l´expression à l´aide du vecteur pPIC9 devrait être supérieure à l´expression à l´aide du vecteur pHIL-S1.

Nous avons alors sélectionné, pour chaque séquence codante de la met-prochymosine, un transformant choisi en fonction de sa capacité à exprimer la prochymosine bovine déterminée à l´aide des analyses par SDS-PAGE et des tests d´activité sur le lait. Tous les clones choisis proviennent des transformations réalisées avec le plasmide pPIC9 linéarisé avec l´endonucléase de restriction *Sal*I. Il s´agit du clone « 4S9 » pour la met-prochymosine A, du clone « 2S8 » pour la met-prochymosine B S79N et du clone « 37 » pour la met-prochymosine B.

III.3.4. Intégration des séquences codant la met-prochymosine bovine dans le génome de *Pichia pastoris*

Nous avons alors vérifié l'intégration de la séquence codant la met-prochymosine bovine dans le génome de ces trois transformants (met-prochymosine A, met-prochymosine B et met-prochymosine B S79N) qui ont été sélectionnés pour leur meilleur niveau d'expression. Dans un premier temps, nous avons réalisé une réaction de PCR à partir de l'ADN génomique de *P. pastoris* utilisant les amorces spécifiques de la séquence codant la prochymosine mais également les amorces spécifiques du gène de l´alcool oxydase (*AOX1*)

de *P. pastoris*. Ces amorces, qui amplifient le gène *AOX1* de la levure *P. pastoris*, permettent de vérifier le génotype des transformants. En effet, si après transformation, le gène *AOX1* est maintenu, une bande de 2,2 kb (qui correspond à la taille du gène *AOX1*) doit être amplifiée. Dans le cas contraire, lorsqu´il y a remplacement du gène *AOX1* par la cassette d´expression, cette bande disparait. Puis, toujours afin de vérifier l'intégration du gène de la met-prochymosine bovine mais aussi de déterminer le nombre de copies intégrées, nous avons utilisé la technique de Southern-blot.

III.3.4.1. Extraction de l'ADN génomique de *Pichia pastoris*

Nous avons tout d'abord purifié l'ADN génomique de la souche sauvage et des souches recombinées de *P. pastoris* à l´aide du kit WIZARD® (Promega). La **figure III.20** montre le résultat de cette purification à partir de 1 ml de culture de *P. pastoris*. La concentration de la solution d´ADN obtenue a été estimée, pour toutes les préparations, à 100 ng/µl. Les préparations d´ ADN génomique sont stockées à 4°C.

III.3.4.2. PCR

A l´aide des oligonucléotides spécifiques de la prochymosine, nous avons amplifié un fragment de taille compatible avec celle de la séquence codant la met-prochymosine pour les trois clones de *P. pastoris* considérés qui exprimaient la prochymosine (**figure III.21**). Le plasmide pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine bovine donne lieu, lui aussi, à une bande à 1,2 kb. Nous pouvons également observer qu´aucun fragment n´a été amplifié dans le cas de la souche de *P. pastoris GS115* et du plasmide pPIC9 sans insert (témoins négatifs).

A l'aide des oligonucléotides spécifiques du gène *AOX1* de *P. pastoris*, nous avons confirmé le phénotype de ces mêmes transformants (**figure III.22**). Il est important de rappeler que l´intégration du gène de la prochymosine bovine dans le génome de la levure *P. pastoris* peut se réaliser de diverses manières pouvant conduire à des phénotypes sensibles au méthanol (Mut^s), dans le cas où le gène *AOX1* est remplacé par la cassette d´expression. Nous avons observé l´amplification d´une bande de 2,2 kb du gène *AOX1* pour la souche sauvage de *P. pastoris GS115* (témoin négatif), l´amplification de la bande de 1,7 kb pour le plasmide pPIC9 contenant la séquence codant la prochymosine et enfin l´amplification d´une bande de 449 pb pour le vecteur pPIC9. Nous avons également observé l´amplification de deux bandes

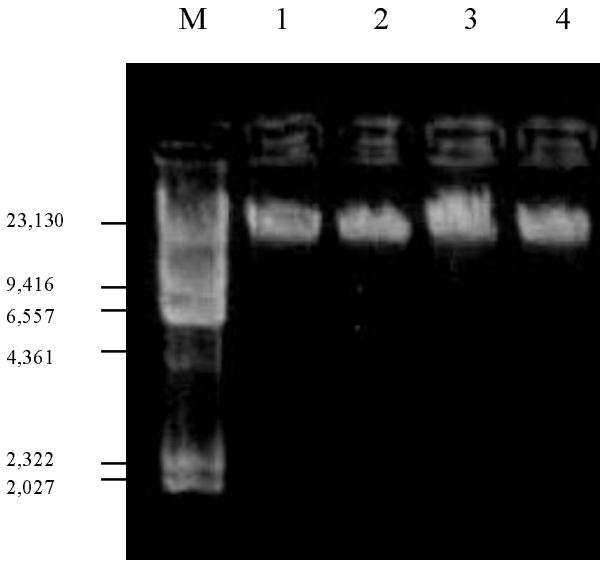


Figure III.20: Analyse de l´ADN génomique total de différentes souches de *P. pastoris*.

L´ADN a été purifié à l´aide du kit WIZARD® de Promega. 2 µl provenant d´une préparation de 50 µl d´ADN génomique ont été séparés sur gel d´agarose à 1% TAE 1x.
Piste 1: souche de levure *P. pastoris GS115*
Pistes 2, 3 et 4: souches recombinées de *P. pastoris* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B, respectivement.
Piste M: marqueur de taille, λ/*Hind*III.

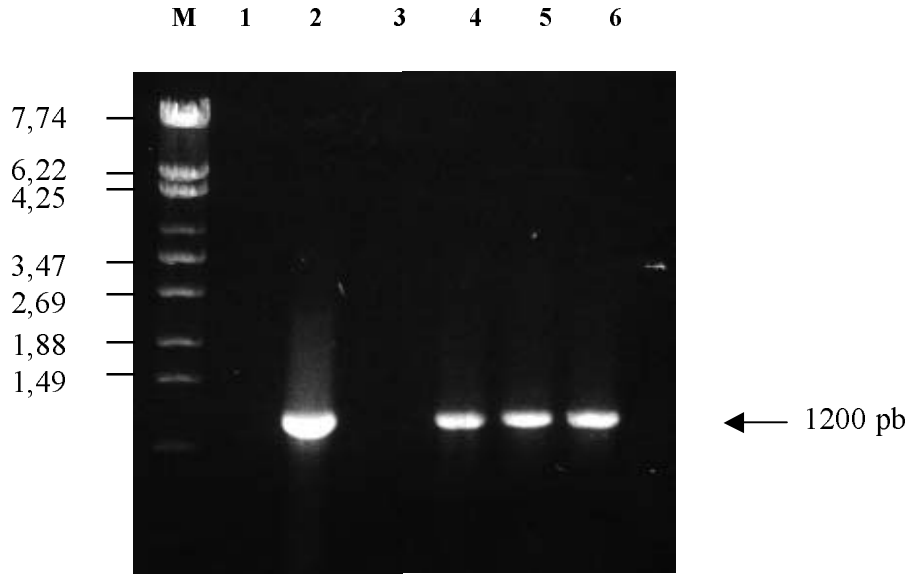


Figure III.21: Analyse par PCR des clones de *P. pastoris*.

La réaction de PCR a été réalisée utilisant les oligonucléotides bordant la séquence codant la prochymosine (1,2 kb) et différents ADN cibles. 25 µl d´une réaction PCR de 50 µl ont été séparés sur un gel d´agarose à 1%, TAE 1x.

Piste 1: vecteur pPIC9.
Piste 2: vecteur pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine B.
Piste 3: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 4, 5 et 6: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B, respectivement.
Piste M: marqueur de taille, λ/*Eco* 130I (en kb).

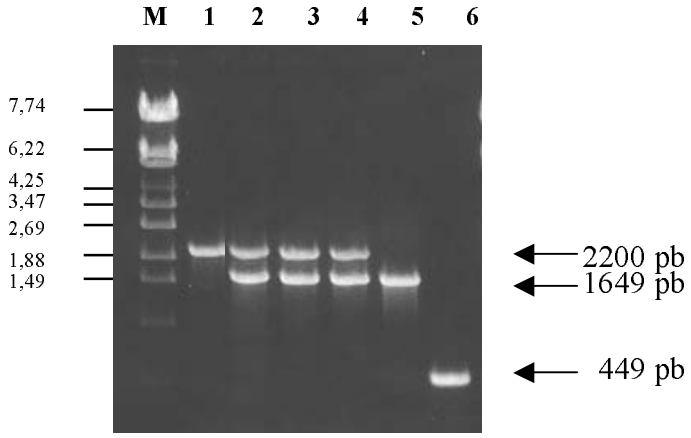


Figure III.22: Analyse par PCR des clones de *P. pastoris*.

La réaction de PCR a été réalisée utilisant les oligonucléotides du gène *AOX1* de *P. pastoris* et différents ADN cibles. 25 µl d´une réaction PCR de 50 µl ont été séparés sur un gel d´agarose à 1%, TAE 1x.

Piste 1: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 2, 3 et 4: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia*, exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B, respectivement.
Piste 5: vecteur pPIC9 contenant la séquence codant la met-prochymosine B.
Piste 6: vecteur pPIC9 (sans insert).
Piste M : marqueur de taille, λ/ *Eco* 130I (en kb).

pour les trois souches recombinées de *P. pastoris* considérées : une bande de 2,2 kb qui correspond au gène *AOX1*, et une autre bande d´environ 1,7 kb qui correspond à la séquence codant la prochymosine et à une région de 449 pb du plasmide pPIC9. Nous avons ainsi de nouveau confirmé l´intégration des séquences codant les différentes met-prochymosines dans le génome de *P. pastoris* et nous avons pu également vérifier le phénotype Mut^+ de ces trois clones, "résistants" au méthanol. Ce résultat est important pour la suite des travaux concernant la culture de ces différents clones. En effet, les conditions de culture utilisées sont différentes suivant le phénotype des transformants.

III.3.4.3. Southern-blot

Nous avons également réalisé une analyse par Southern-blot, utilisant le kit «ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems» (Amersham Pharmacia Biotech). Nous avons choisi de digérer l´ADN génomique de la souche sauvage et des souches recombinées de *P. pastoris* à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II (**figure III.23**) en fonction des travaux déjà publiés dans lesquels les auteurs ont réalisé des analyses par Southern-blot dans un but identique au nôtre (LAROCHE *et al.*, 1994 ; MISTRY *et al.*, 1997; AUSTIN *et al.*, 1998). L´ADN a ensuite été transféré sur une membrane en nylon et nous avons alors réalisé une première hybridation utilisant la sonde de 612 pb du gène *HIS4* (**figure III.24A**). Nous pouvons observer l´apparition d´une bande de 2,7 kb dans le cas de la souche sauvage de *P. pastoris* non transformée qui correspond au locus du gène *his4* (**figure III.24B**, LAROCHE *et al.*, 1994). Cette bande disparaît et nous observons l´apparition de deux bandes de 3,7 kb et 4,2 kb pour les trois souches de *P. pastoris* recombinées. La taille de ces deux fragments peut correspondre à l´intégration d´une copie unique de la cassette d´expression dans le locus *his4*. La **figure III.24C** représente schématiquement cette intégration interrompue par trois «nouveaux» sites de reconnaissance de l´enzyme de restriction *Bgl*II libérant quatre fragments d´ADN. La sonde de 612 pb du gène *HIS4* ne s´hybridant qu´à deux fragments, il n´apparaît alors, lors de l´hybridation, que les deux bandes de 3,7 et 4,2 kb. L´hypothèse d´une intégration dans le site *his4* du génome de la levure a été renforcée par les résultats obtenus avec les autres hybridations que nous avons réalisées.

Dans le cas de l´hybridation avec la sonde qui correspond à la séquence codant la prochymosine, nous observons deux bandes, une de 1,5 kb et une de 4,2 kb (**figure III.25A**) pour les trois souches de *P. pastoris* recombinées. La taille de ces fragments semble également correspondre à une unique intégration de la cassette d´expression dans le site *his4*

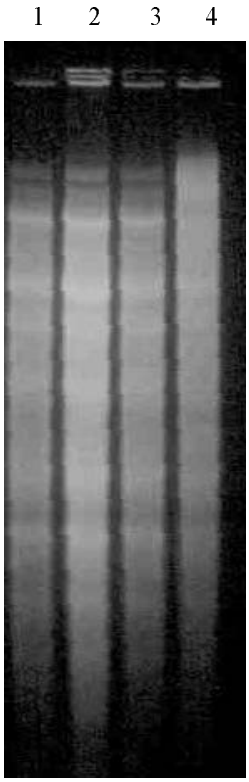


Figure III.23: Digestion de l'ADN génomique total de différentes souches de *P. pastoris*.

Pour chaque réaction, 5 µg d'ADN génomique total ont été digérés par 10U d'endonucléase *Bgl*II pendant la nuit à 37°C. Les échantillons ont été séparés dans un gel d´agarose à 1%, TAE 1x sous voltage constant de 1,5V/cm.

Piste 1: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 2, 3 et 4: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B, respectivement.

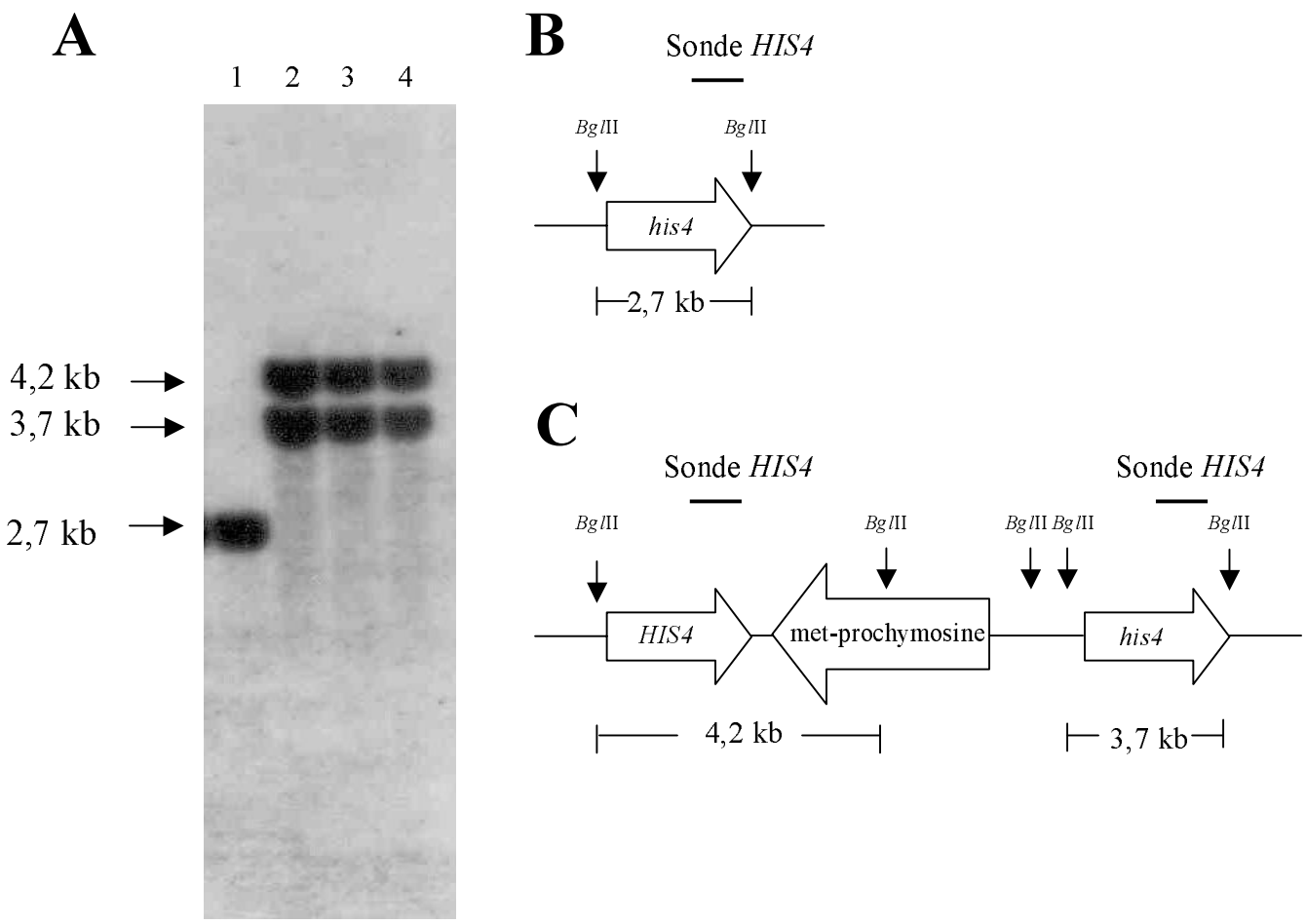


Figure III.24: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U de l'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*.

Cinq µg d'ADN génomique total ont été digérés et séparés dans un gel d´agarose à 1% TAE, 1x et les fragments d´ADN ont été transférés du gel sur une membrane en nylon. La membrane a alors été hybridée avec une sonde non radioactive de 610 pb qui correspond au gène *HIS4* durant la nuit.

Piste 1: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 2, 3 et 4: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B.

(B) Représentation schématique du locus *his4* de la souche *P. pastoris GS115* avec la taille du fragment libéré par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II et marqué avec la sonde *HIS4*.
(C) Représentation schématique du locus *his4* des souches recombinées de *P. pastoris* avec la taille des fragments libérés par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II et marqués avec la sonde *HIS4*.

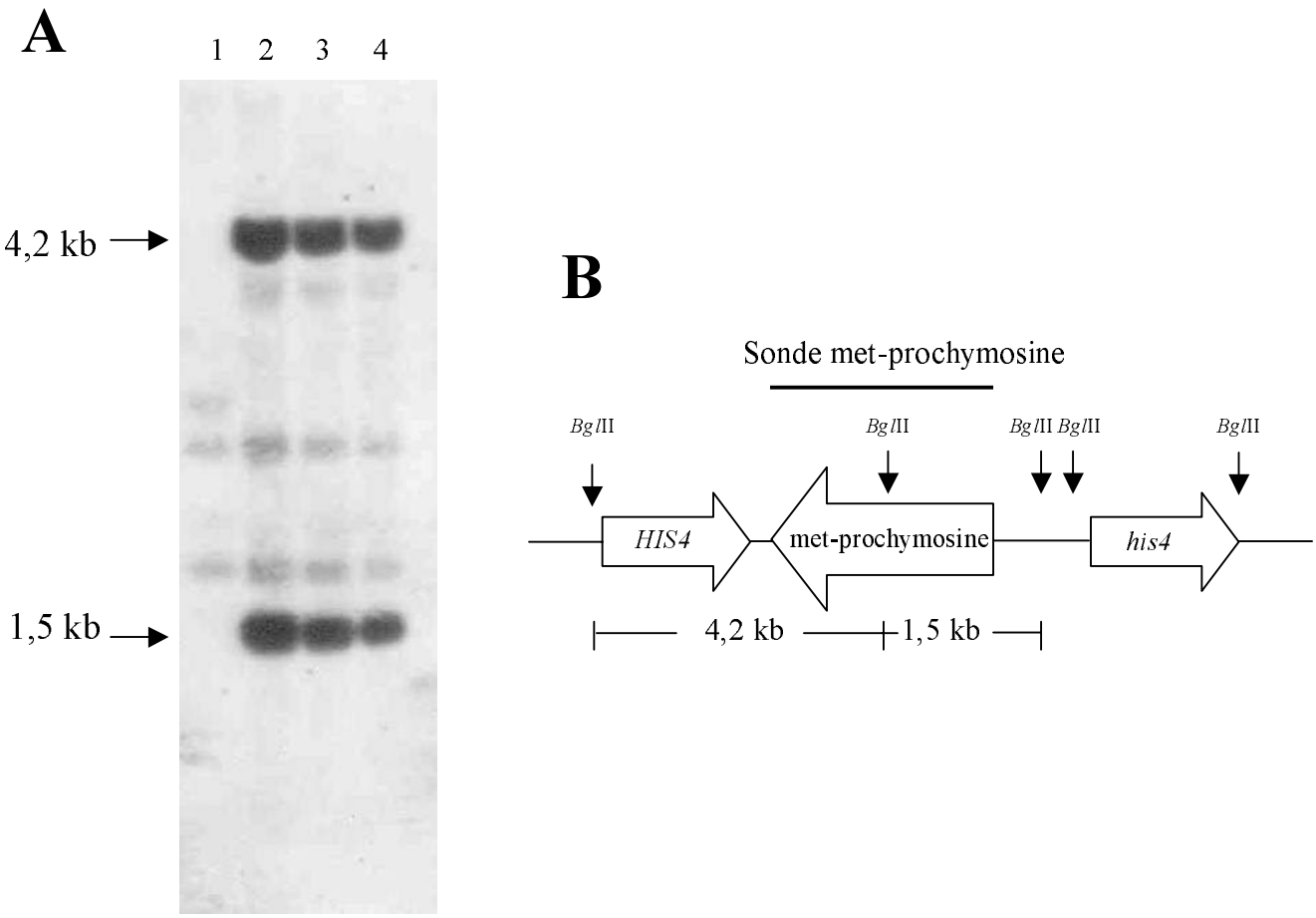


Figure III.25: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U d'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*.

Cinq µg d'ADN génomique total ont été digérés et séparés dans un gel d´agarose à 1%, TAE 1x et les fragments d´ADN ont été transférés du gel sur une membrane en nylon. La membrane a alors été hybridée avec une sonde non radioactive de 1,2 kb qui correspond à la séquence codant la met-prochymosine durant la nuit.

Piste 1: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 2, 3, et 4: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B.

(B) Représentation schématique du locus *his4* des souches recombinées de *P. pastoris* avec la taille des fragments libérés par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II et marqués avec la sonde de la séquence codant la met-prochymosine.

(**figure III.25B**). Nous pouvons observer qu'aucune bande n'apparaît dans le cas de la souche de *P. pastoris* non transformée, utilisée comme témoin négatif.

Quant à l'hybridation avec la sonde qui correspond à la région promoteur du gène *AOX1*, nous observons l'apparition, pour toutes les souches de *P. pastoris*, d'une bande de 1,7 kb qui correspond au gène *AOX1* (**figure III.26A**). Nous avons pu déduire ce résultat à partir de l'article publié par CREGG *et al.* (1989) où les sites de restriction du locus *AOX1* du génome de *P. pastoris* sont décrits. Ainsi, nous connaissions l'emplacement et le nombre de sites de reconnaissance de l'enzyme *Bgl*II du locus *AOX1*, comme le montre la représentation schématique réalisée (**figure III.26B**). La bande de 1,5 kb qui apparaît pour les trois souches de *P. pastoris* recombinées correspond à la cassette d'expression intégrée dans le locus *his4* (**figure III.26C**).

L'analyse par Southern-blot nous a ainsi permis de vérifier que la séquence codant la met-prochymosine s'était intégrée dans tous les cas (met-prochymosine A, met-prochymosine B et met-prochymosine B S79N) dans le site *his4* du génome de *P. pastoris*. Nous n'avons toutefois pas réussi à déterminer le nombre de copies du gène intégrées. Si nous nous intéressons aux travaux réalisés par MISTRY *et al.* (1997), ces derniers ont réussi à atteindre cet objectif à l'aide d'un PhosphorImager™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Etats-Unis). Cet équipement permet de mesurer les intensités relatives des bandes qui représentent une copie unique, comme c'est le cas du gène *his4* du génome de *Pichia* (2,7 kb) et des bandes qui correspondent à la cassette d'expression contenant le gène d'intérêt. Il suffit alors de comparer les intensités mesurées et d'en déduire le nombre de copies du gène. Il est à noter que dans ce cas, les auteurs ont utilisé un marquage radioactif (P^{32}). La technique que nous avons utilisée possède donc ses limites. Elle nous a toutefois permis de montrer qu'il existe au moins une copie de la séquence codant la met-prochymosine dans le génome de *Pichia*.

III.3.5. Expression de la met-prochymosine chez *Pichia pastoris*

Dans un premier temps, nous avons réalisé différentes cultures de *P. pastoris* utilisant des erlenmeyers possédant ou non des baffles afin de déterminer les conditions de culture les plus appropriées pour la sécrétion de la prochymosine. Nous avons, pour cela, testé 3 formats d'erlenmeyers, un sans baffle et deux avec baffles de dimensions différentes (voir **figure III.27C**). Pour réaliser cette expérience, nous nous sommes appuyés sur les travaux de VILLATTE *et al.* (2001) qui ont étudié l'effet du format des erlenmeyers sur le niveau

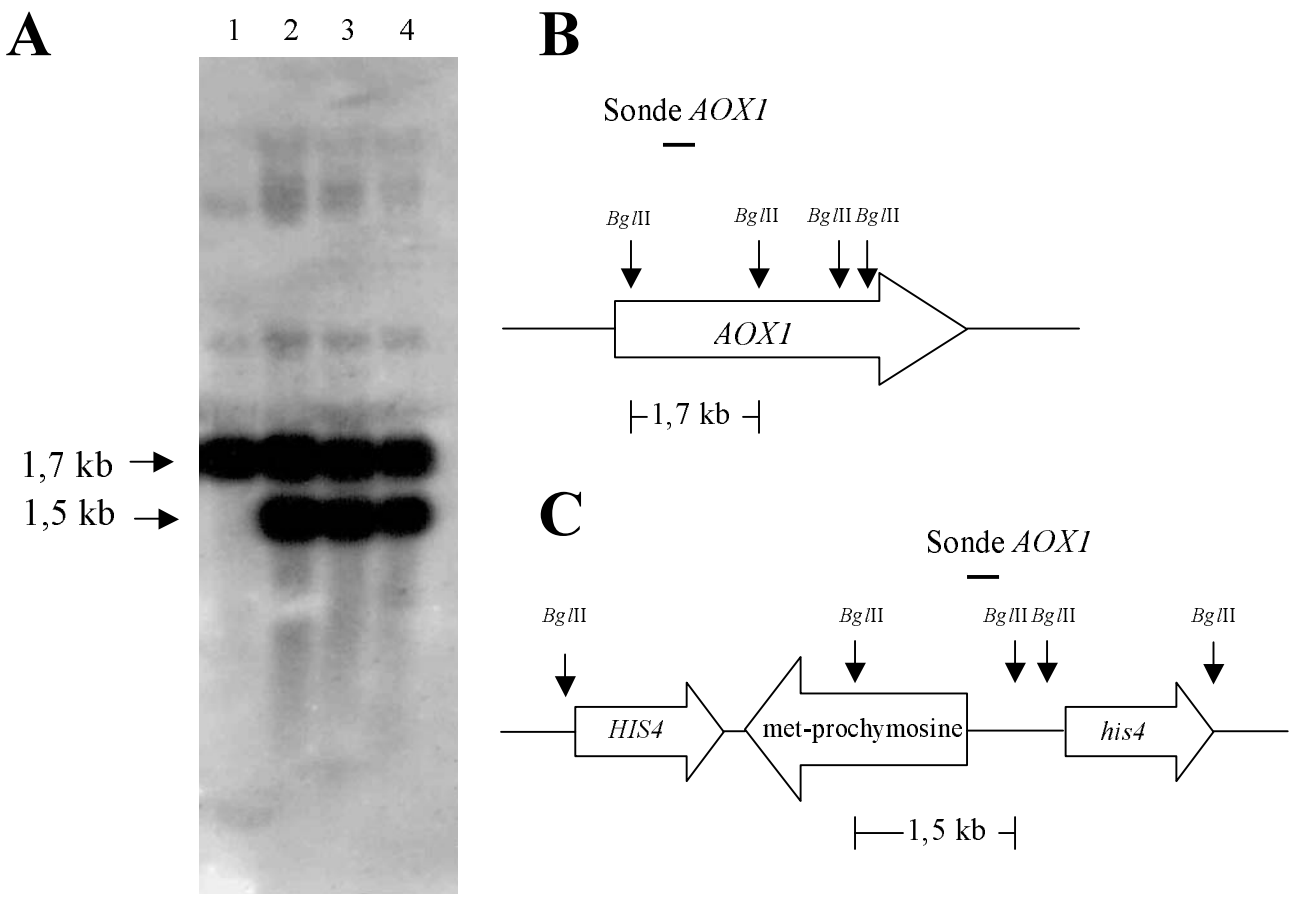


Figure III.26: (A) Analyse par Southern-blot d'ADN génomique total digéré avec 10U de l'endonucléase de restriction *Bgl*II de souches différentes de *P. pastoris*.

Cinq µg d'ADN génomique total ont été digérés et séparés dans un gel d´agarose à 1%, TAE 1x et les fragments d´ADN ont été transférés du gel sur une membrane en nylon. La membrane a alors été hybridée avec une sonde non radioactive de 1,0 kb qui correspond au promoteur du gène *AOX1* durant la nuit.

Piste 1: ADN provenant de la souche *GS115* de *P. pastoris*.
Pistes 2, 3 et 4: ADN provenant de souches recombinées de *Pichia* exprimant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B.

(B) Représentation schématique du locus *AOX1* avec la taille du fragment libéré par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II et marqué avec la sonde.
(C) Représentation schématique du locus *his4* avec la taille du fragment libéré par la digestion à l´aide de l´endonucléase de restriction *Bgl*II et marqué avec la sonde *AOX1*.

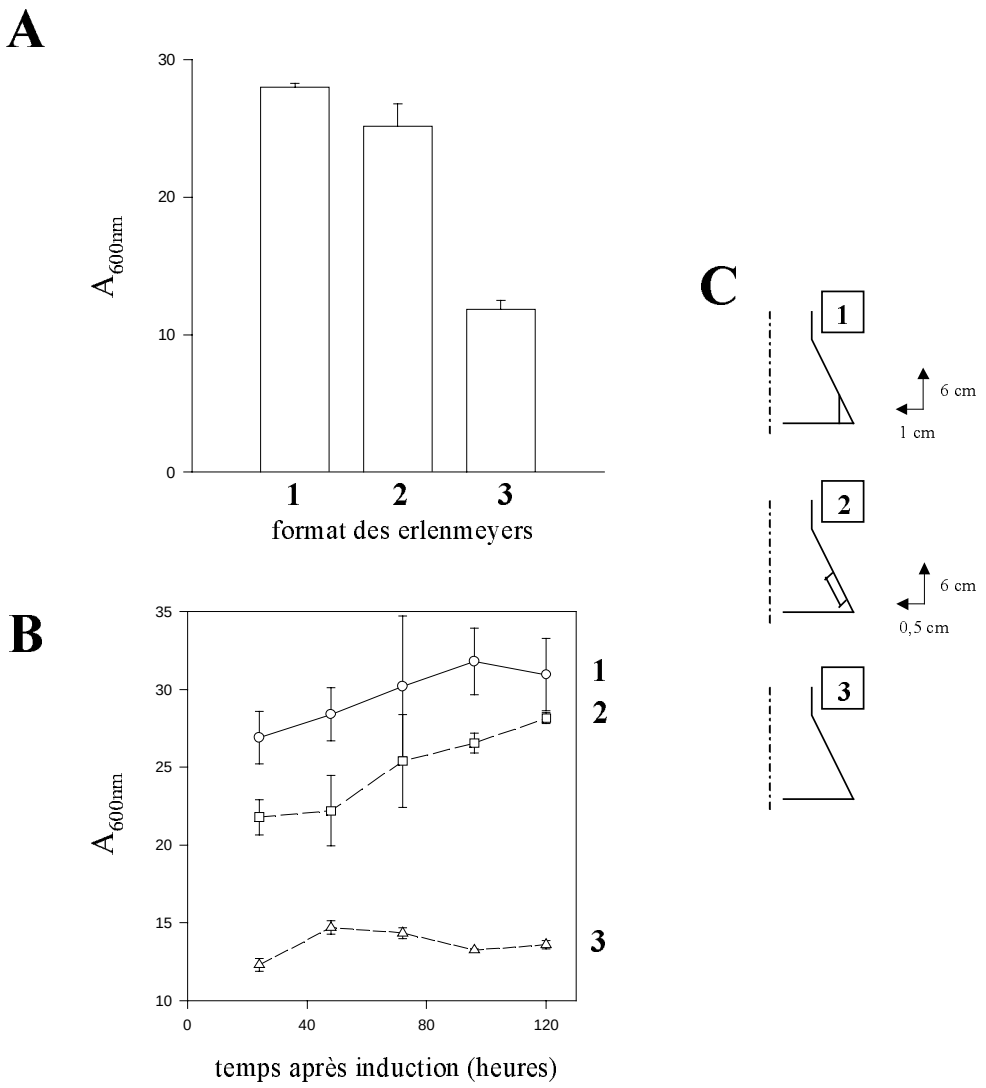


Figure III.27: Culture du clone 37 de *P. pastoris* dans différents types d'erlenmeyers.

Le clone 37 a été mis en culture 2 jours dans un milieu contenant du glycérol utilisant 3 types d'erlenmeyers avec ou sans baffles. L'expression de la met-prochymosine B a ensuite été induite par l'addition de méthanol. L'induction a été maintenue durant 4 jours. La biomasse (en unités d'absorbance à 600 nm, A_{600nm}) a été suivie pour chaque condition testée:

(A) Après 48h de croissance en présence de glycérol,

(B) Après 24, 48, 72, 96 et 120h d'induction au méthanol (n=2).

(C) Représentation schématique des erlenmeyers utilisés avec ou sans baffles. Le format et les dimensions des baffles sont indiqués.

d´expression de protéines hétérologues chez *P. pastoris*. Nous avons ainsi adapté le protocole expérimental décrit dans cet article. Un clone approprié (37) a été pré-inoculé dans 100 ml de YEPD contenant 1% de glycérol (v/v) et laissé à 30°C et à 180 rpm jusqu´à atteindre une A_{600} de 28. Ensuite, les différents erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de YEPD (sans glucose et avec 1% de glycérol) ont été inoculés avec 125 µl de la pré-culture. Le tout a été laissé 48 h à 30°C et à 180 rpm. Après cette période, l´expression de la prochymosine a été induite par l´addition de 0,5% de méthanol. Nous pouvons observer que la croissance des levures augmente significativement dans les erlenmeyers à baffles traduisant une meilleure aération du milieu (**figures III.27 A** et **B**). Toutefois, ce résultat ne s´accompagne pas d´une augmentation du niveau de sécrétion de la prochymosine. Au contraire, les tests d´activation/activité ne nous permettent pas d´observer la présence de la prochymosine dans le milieu de culture. Quant aux erlenmeyers sans baffles, la production de la prochymosine est restée très basse. Nous avons alors réalisé un nouveau test utilisant les erlenmeyers à baffles (format n°1), mais cette fois-ci suivant le protocole décrit dans le chapitre II.13.2.2 du matériels et méthodes (MISTRY *et al.*, 1997). Les surnageants de culture ont alors été prélevés avant et 24 h après induction au méthanol et ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE, Western-blot et à l'aide de tests de coagulation du lait. Nous n´avons pas observé de sécrétion de la prochymosine par les clones de *P. pastoris* 37 et 38 (prochymosine B) dans le milieu de culture (**figure III.28**). Ces résultats nous ont certes quelque peu surpris. En effet, l´utilisation d´erlenmeyers à baffles est normalement recommandée pour l´expression de protéines hétérologues chez *P. pastoris*. Dans notre cas précis, l´utilisation de ce type d´erlenmeyers a effectivement amélioré la croissance de la levure mais non celle de la production de la protéine désirée. VILLATTE *et al.* (2001), qui ont comparé le niveau d´expression de l´acétylcholinesterase utilisant différents types d´erlenmeyers, ont observé un niveau d´expression dans les erlenmeyers à baffles jusqu´à 70 fois supérieur à celui obtenu dans les erlenmeyers sans baffles. Ils ont observé que cette différence remarquable du niveau d´expression était indépendante de la biomasse mais également de la quantité d´oxygène dissous dans le milieu de culture. Ainsi, l´efficacité de production de protéines hétérologues chez *P. pastoris* semblerait être influencée par d´autres facteurs. Leurs résultats montrent que le format de l´erlenmeyer est un paramètre important pour la culture de *P. pastoris*. Il est donc possible que les formats des erlenmeyers à baffles que nous avons utilisés n´aient pas été adéquats pour la production de la prochymosine. Nous avons ainsi choisi de continuer nos expériences d´expression et de production utilisant des erlenmeyers sans baffles puisque, lors

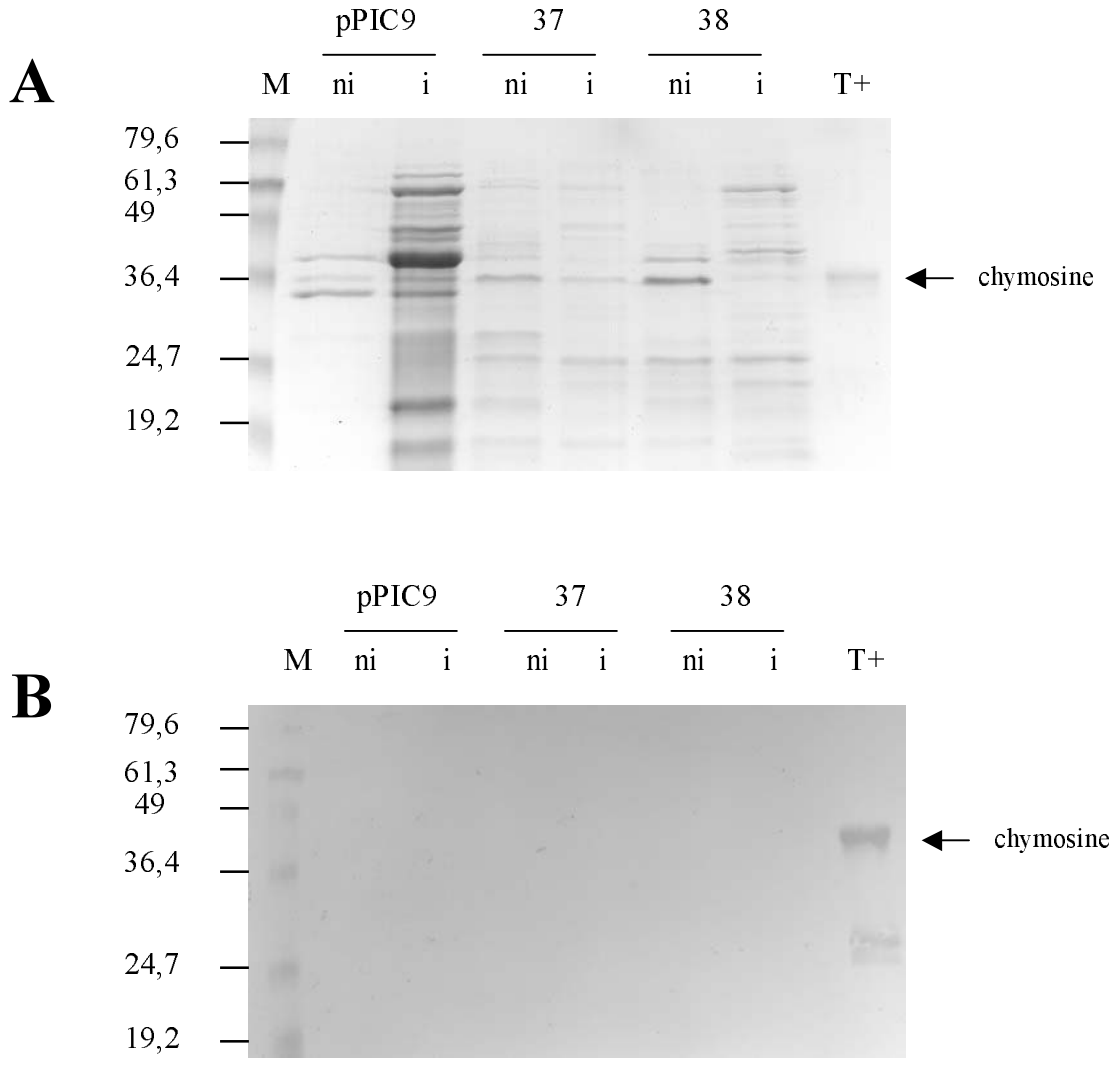


Figure III.28: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine B par différents clones de *P. pastoris* dont la culture a été réalisée dans des erlenmeyers à baffles.

Les pistes « ni » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMGY (non induit) et les pistes « i » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (induit) provenant de culture des clones pPIC9 (sans insert) et des clones 37 et 38 (prochymosine B).
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Les pistes T+ (témoin positif) correspondent à 4 µg (A) et à 2 µg (B) de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

du criblage des clones, nous avions observé l'expression et la sécrétion de la prochymosine par *P. pastoris*.

Nous avons réalisé une culture des clones 37, 2S8 et 4S9 dans 25 ml de milieu BMGY puis une induction dans 100 ml de milieu BMMY. L'induction a été maintenue durant 4 jours, sachant que nous avons ajouté du méthanol chaque jour pour obtenir une concentration de 0,5% (v/v). Nous avons alors suivi la croissance des clones de *P. pastoris* mesurant l'A_{600} (**figure III.29A**). A la fin de cette période, nous avons récupéré les cellules des levures et avons mesuré la matière sèche pour chaque clone (**figure III.29B**). Enfin, nous avons suivi l'expression et la sécrétion de la prochymosine par analyses SDS-PAGE et Western-blot. La **figure III.30** illustre ces analyses concernant la met-prochymosine B par le clone 37 pendant 4 jours. Les **figures III.31** et **III.32** montrent les analyses par SDS-PAGE de l'expression et la sécrétion de la met-prochymosine B S79N par le clone 2S8 et de l'expression et la sécrétion de la met-prochymosine A par le clone 4S9. Nous pouvons observer, dans tous les cas, la sécrétion de la prochymosine dès le premier jour d'induction. L'expression de la met-prochymosine semble atteindre un niveau maximum après 3 jours d'induction. Enfin, nous avons voulu vérifier l'efficacité du système de sécrétion de la prochymosine. Nous avons ainsi analysé le contenu cellulaire de levures provenant de la culture de différents clones de *P. pastoris* par SDS-PAGE et Western-blot (**figure III.33**). La qualité du gel d'electrophorèse SDS-PAGE étant insuffisante, c'est en analysant les résultats du Western-blot que nous avons pu observer la présence de la prochymosine uniquement dans le milieu de culture et non dans les débris cellulaires. La prochymosine exprimée chez *P. pastoris* est donc sécrétée dans le milieu de culture avec succès.

III.4. Purification de la met-prochymosine

Il est important d'observer ici, qu'à n'aucun moment de la purification, nous n'avons activé la prochymosine. Au début, notre but était de purifier la prochymosine, afin de pouvoir préserver le plus longtemps possible l'activité de l'enzyme. Toutefois, nous nous sommes rendu compte que la prochymosine s'activait au fur et à mesure des étapes de production et de purification même avec un pH toujours contrôlé et maintenu entre 6,0 et 6,3. En effet, nous observions déjà, lors de la phase de production, une activité de coagulation du lait sans même activer les échantillons. Cette activation semblait alors s'accélérer dès les premières étapes de purification qui sont la concentration au sulfate d'ammonium et la dialyse. La prochymosine produite s'activant alors complètement avant de charger les échantillons sur la colonne

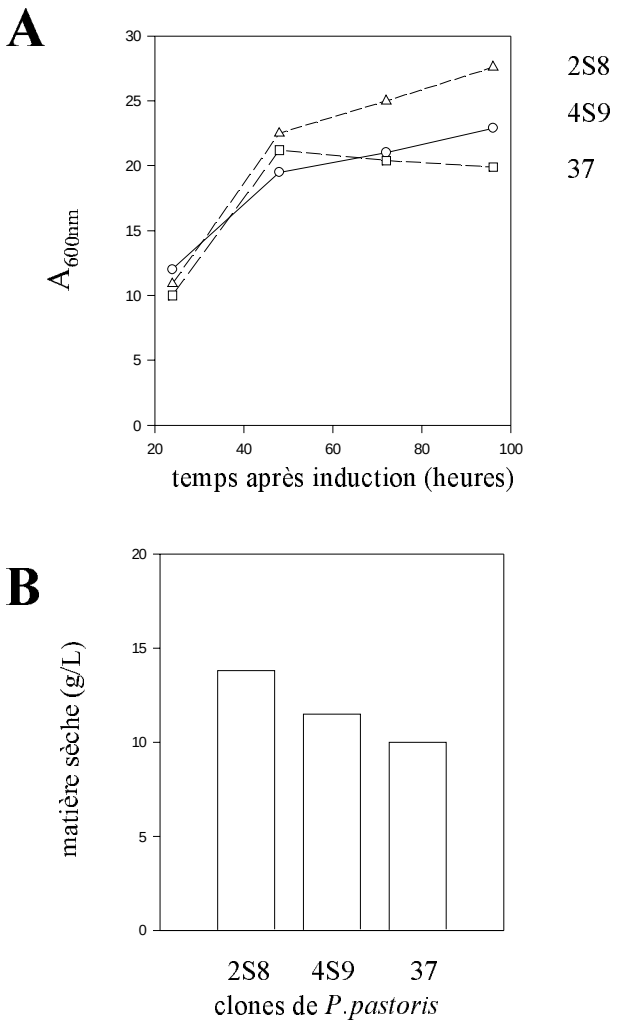


Figure III.29: Biomasse de différents clones de *P.pastoris*.

Les clones 2S8 (met-prochymosine B S79N), 4S9 (met-prochymosine A) et 37 (met-prochymosine B) ont été cultivés dans 25 ml de BMGY puis induits dans 100 ml de BMMY. L'induction a été maintenue durant 4 jours.

La croissance de ces différents clones a été suivie mesurant la biomasse (A) à 24, 48, 72 et 96 h d'induction en unités d'absorbance à 600 nm, A_{600nm} et la matière sèche en g/L (B) après 4 jours d'induction au méthanol.

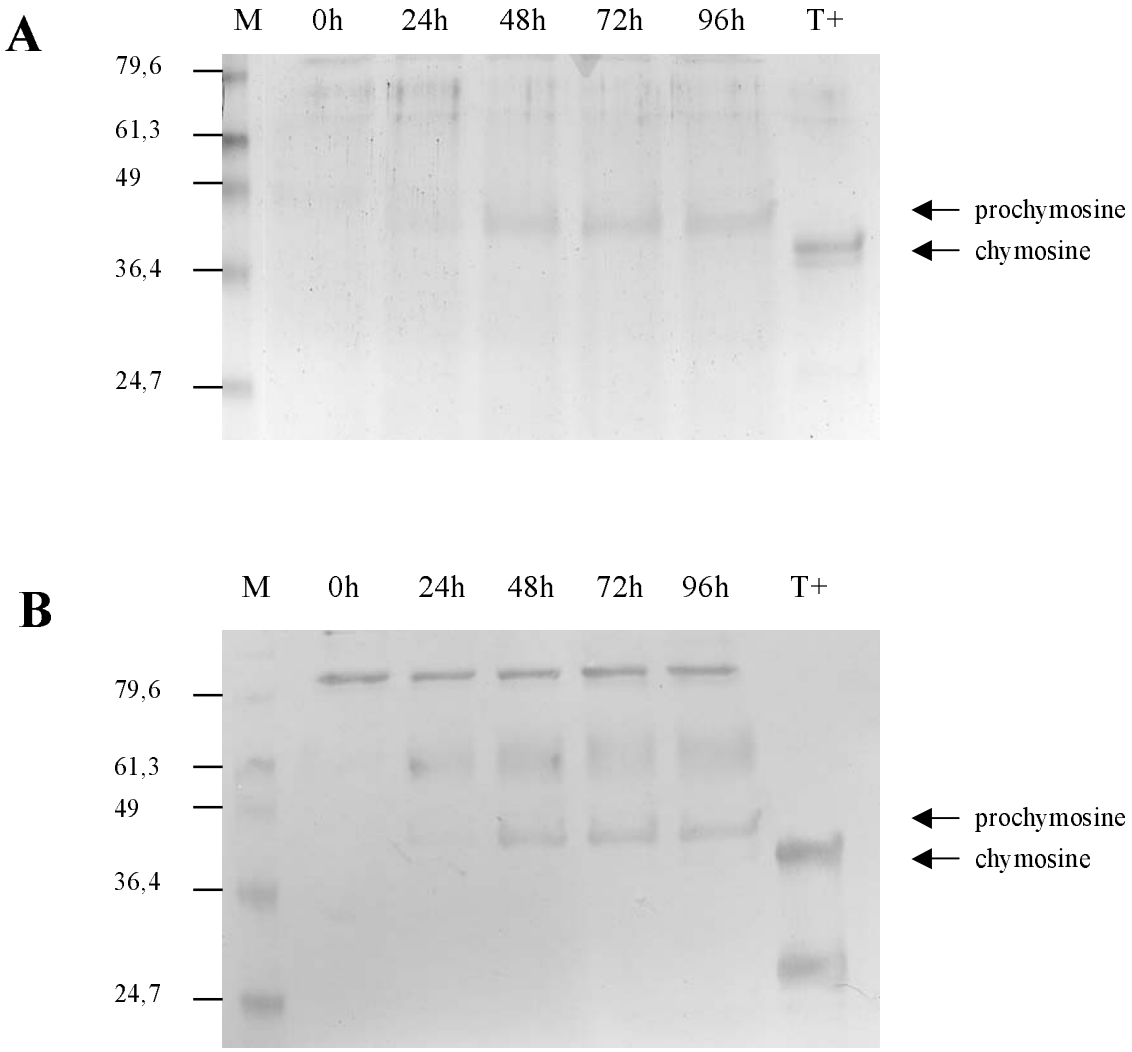


Figure III.30: Analyses par SDS-PAGE 12,5% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 37 (prochymosine B) de *P. pastoris*.

Les pistes correspondent à 16 µl de milieu BMGY non induit et à 16 µl de milieu BMMY induit après 24, 48, 72 et 96 heures de culture.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Les pistes T+ (témoin positif) correspondent à 4 µg (A) et à 2 µg (B) de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

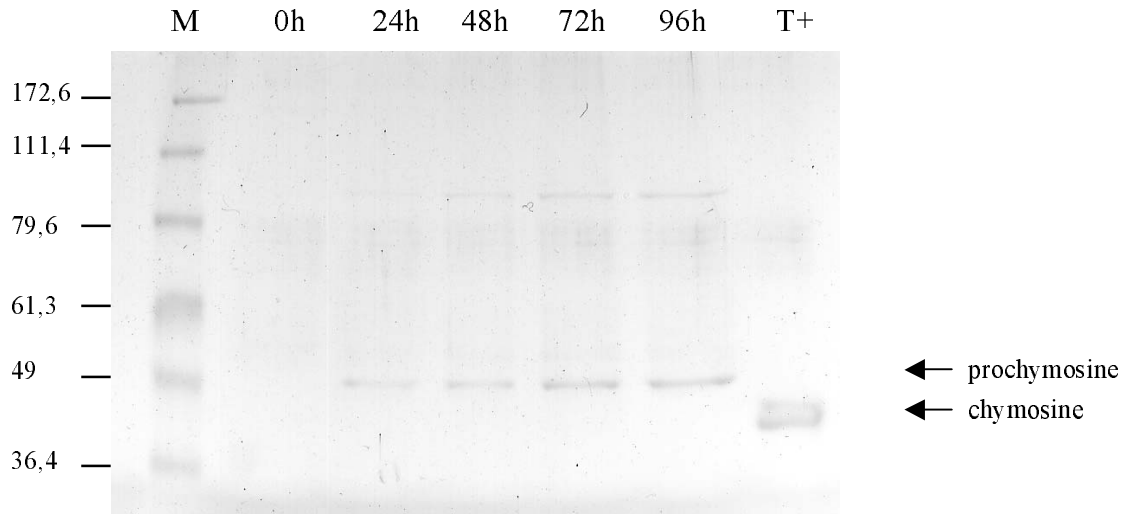


Figure III.31: Analyse par SDS-PAGE 12,5% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 2S8 (prochymosine B S79N) de *P. pastoris*.

Les pistes correspondent à 16 µl de milieu BMGY (non induit) et à 16 µl de milieu BMMY (induit) après 0, 24, 48, 72 et 96 heures de culture.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Piste T+ (témoin positif) correspond à 4 µg de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

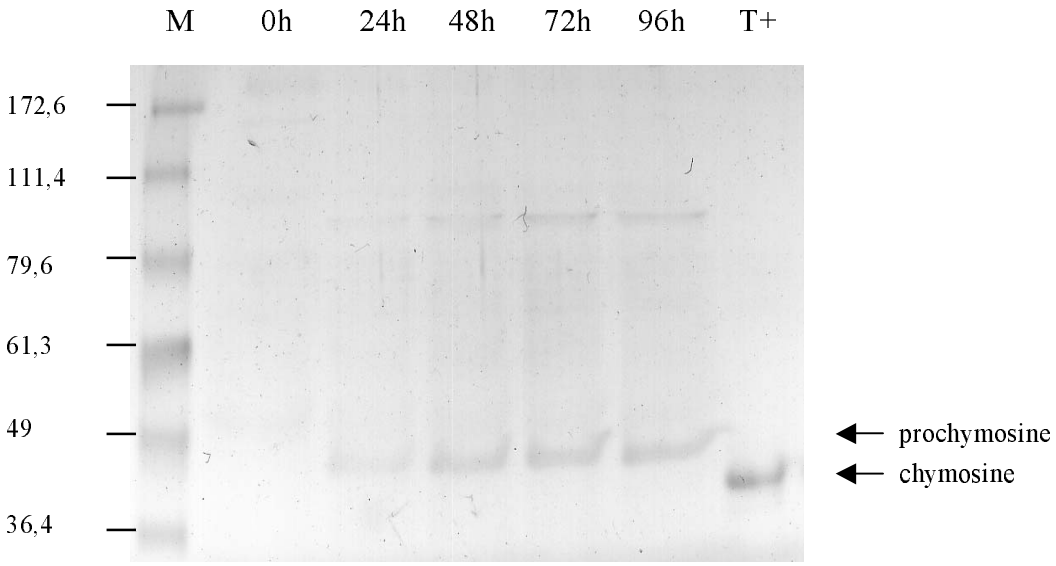


Figure III.32: Analyse par SDS-PAGE 12,5% de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine bovine par le clone 4S9 (prochymosine A) de *P. pastoris*.

Les pistes correspondent à 16 µl de milieu BMGY (non induit) et à 16 µl de milieu BMMY (induit) après 0, 24, 48, 72 et 96 heures de culture.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Piste T+ (témoin positif) correspond à 4 µg de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

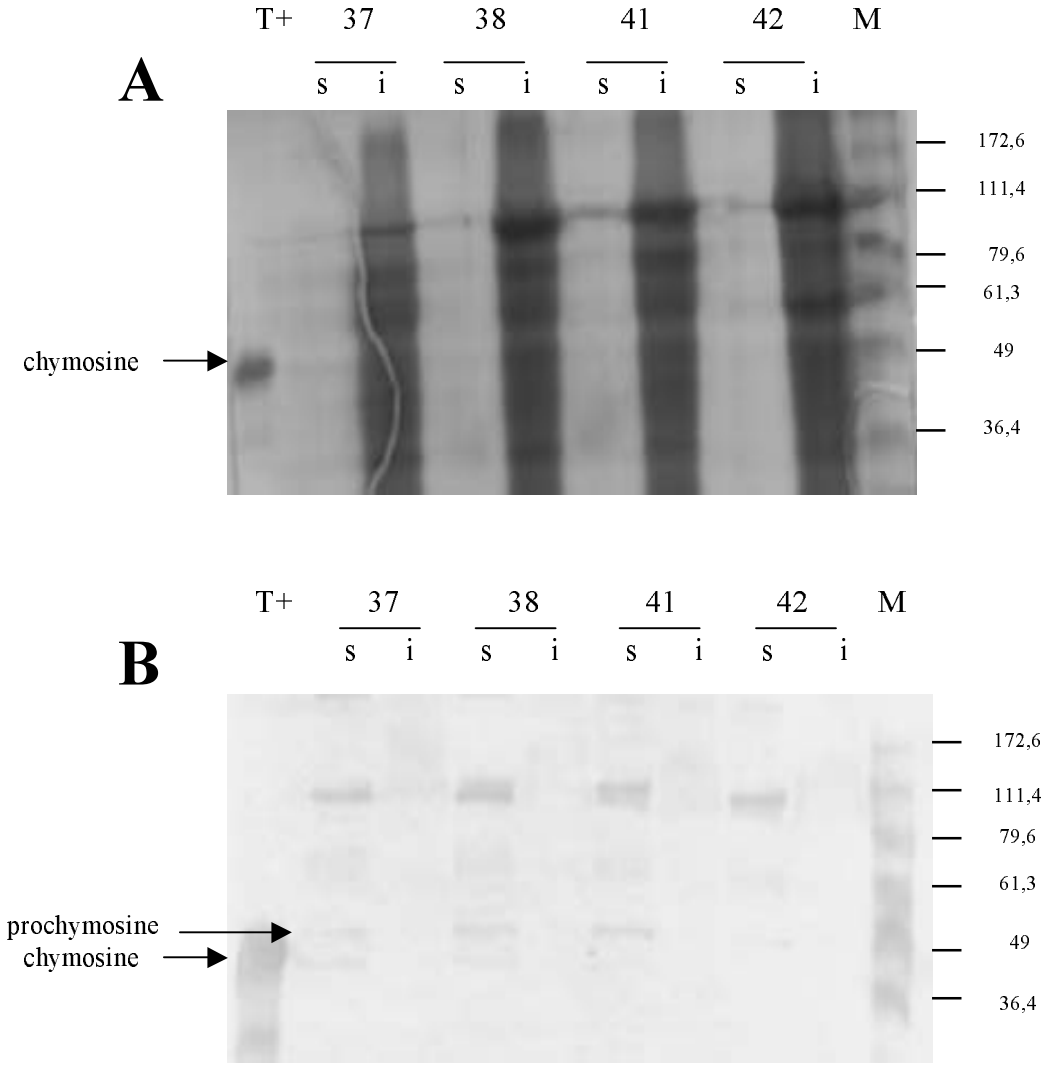


Figure III.33 : Analyses par SDS-PAGE 10% (A) et par Western-blot (B) de l'expression et de la sécrétion de la prochymosine B par différents clones de *P. pastoris*.

Les pistes « s » correspondent à 16 µl de milieu de culture BMMY (surnageant) et les pistes « i » correspondent à 16 µl de débris cellulaires (intracellulaire) provenant de culture des clones 37, 38, 41 et 42 après 24 h d´induction au méthanol.
Piste M, Marqueur de taille (en kDa).
Les pistes T+ (témoin positif) correspondent à 4 µg (A) et à 2 µg (B) de chymosine recombinante commerciale MAXIREN (Gist-Brocades).

échangeuses d´ions. ESPINOSA *et al.* (1999), qui ont produit la prochymosine chez *P. pastoris* par fermentation, ont montré que celle-ci s´activait complètement en fin de production, mais il semblerait que cela soit dû à la valeur du pH utilisé de 5 à 5,5 qui est le pH d´activation de l´enzyme.

D´autres auteurs, qui ont utilisé *P. pastoris* comme système d´expression pour diverses protéines hétérologues, ont montré qu´il existait une activation de leurs protéines précurseurs. *P. pastoris* serait en effet une source potentielle de protéases capables d´activer une pro-enzyme. Par exemple, ces protéases appelées sécrétases seraient impliquées dans la maturation de la protéine précurseur amyloïde exprimée et sécrétée à l´aide du système d´expression de *P. pastoris* (MARKARYAN *et al.*, 1999). La caractérisation de ces protéases est en cours et leur présence chez la levure *P. pastoris* a besoin d´être déterminée. Ainsi, l´activation de la prochymosine pourrait être due à l´action de protéases de *P. pastoris*. Les travaux de STEPANOV *et al.* (1990) renforcent cette hypothèse. Ils ont en effet montré que la prochymosine pouvait être convertie en chymosine par l´action d´autres protéases, comme la thermolysine et une métalloprotéase de *Legionella pneumophila*. Il est intéressant de souligner que le pepsinogène porcin, qui est une protéase à acide aspartique « proche » de la prochymosine, a été récemment exprimé chez *P. pastoris* (YOSHIMASU *et al.*, 2002). Ces auteurs n´observent pas d´activation du pepsinogène porcin ni durant la production ni durant les étapes de purification.

Pour la purification de la met-prochymosine, nous avons inoculé chaque clone dans 100 ml de milieu BMGY (4 cultures de 25 ml) durant la nuit à 30°C. Les cellules ont alors été centrifugées à 2000 g pendant 5 min et ressuspendues dans 400 ml de milieu BMMY (4 cultures de 100 ml) contenant 0,5% de méthanol afin d'induire l'expression de la protéine. Après l´induction durant 4 jours de l´expression de la met-prochymosine A, de la met-prochymosine B et de la met-prochymosine B S79N, les levures ont été centrifugées. Nous avons réalisé les tests d´activation/activité directement à partir du milieu de culture selon EMTAGE *et al.* (1983) afin de vérifier que la protéine était sécrétée. Les milieux de culture contenant la prochymosine ont alors été concentrés avec 70% de sulfate d´ammonium. Comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes, les échantillons ont alors été dialysés contre un tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3 avec 0,1 M NaCl et chargés sur une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech). Après que la colonne ait été lavée avec ce même tampon, les protéines adsorbées ont été décrochées avec un gradient linéaire de NaCl de concentration variant de 0,1 à 1 M en tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3. Les fractions obtenues sont activées et testées pour leur activité de

coagulation du lait. La présence de prochymosine dans les fractions montrant une activité de coagulation de lait est confirmée par SDS-PAGE. Les fractions d'intérêt sont réunies et concentrées avec des filtres Microcon YM-10 (Millipore) afin de pouvoir être appliquées dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3, 0,1 M NaCl. Les fractions recueillies sont alors de nouveau testées pour la présence de la prochymosine, par analyse en gel SDS-PAGE et par test d'activation/activité.

Nous avons ainsi purifié les trois prochymosines selon ce même protocole. Les **figures III.34**, **III.35** et **III.36** montrent les profils d´élution de ces différentes chromatographies concernant la chymosine A, la chymosine B S79N et la chymosine B et les **tableaux III.3**, **III.4** et **III.5** résument également la purification de ces trois enzymes. Les trois enzymes éluent à la même concentration de NaCl (environ 0,3 M) sur MonoQ.

Nous observons des taux de purification similaires pour les trois enzymes. Nous sommes à présent capables de calculer, à partir des activités spécifiques des enzymes purifiées et de l´activité totale du surnageant de culture, la quantité de prochymosine produite pour chacun des clones. Après 96h d´induction, le clone 37 a produit 7,9 mg/L de chymosine B, le clone 2S8 a produit 7,6 mg/L de chymosine B S79N et enfin le clone 4S9 a produit 5 mg/L de chymosine A, possédant donc une production du même ordre. C´est une production relativement faible mais il ne faut pas oublier que dans ce cas précis, nous n´avons pas réalisé d´optimisation de production. Nous avons voulu comparer nos résultats avec ceux de ESPINOSA *et al.* (1999), qui ont exprimé la prochymosine chez *P. pastoris*, mais ceux-ci ne présentent pas de résultats quantitatifs dans leur étude.

Dans le but d´améliorer l´expression de la prochymosine chez *P. pastoris*, une des possibilités serait d´optimiser le procédé de production notamment à l´aide des techniques de fermentation. Une culture en fermenteur permet en effet de contrôler de manière précise certains paramètres essentiels dont l'aération du milieu. Une autre possibilité serait d´augmenter le nombre de copies du gène de la prochymosine intégrées dans le génome de *P. pastoris*. Certains travaux montrent qu´une augmentation du nombre de copies du gène d´intérêt résulte en une élévation proportionnelle de l´ARNm specifique du gène étudié et en une augmentation du niveau d´expression de la protéine correspondante (VASSILEVA *et al.*, 2001). Il existe déjà des plasmides commerciaux disponibles comme le pPIC3.5K, le pPIC9K et le pAO815 (Invitrogen) qui permettent la sélection de levures contenant plus d´une copie du gène d´intérêt. Il est, ici, intéressant de citer les travaux de THILL *et al.* (1990) qui ont utilisé *P. pastoris* pour exprimer le lysozyme bovin, l´aprotinine et la superoxyde dismutase.

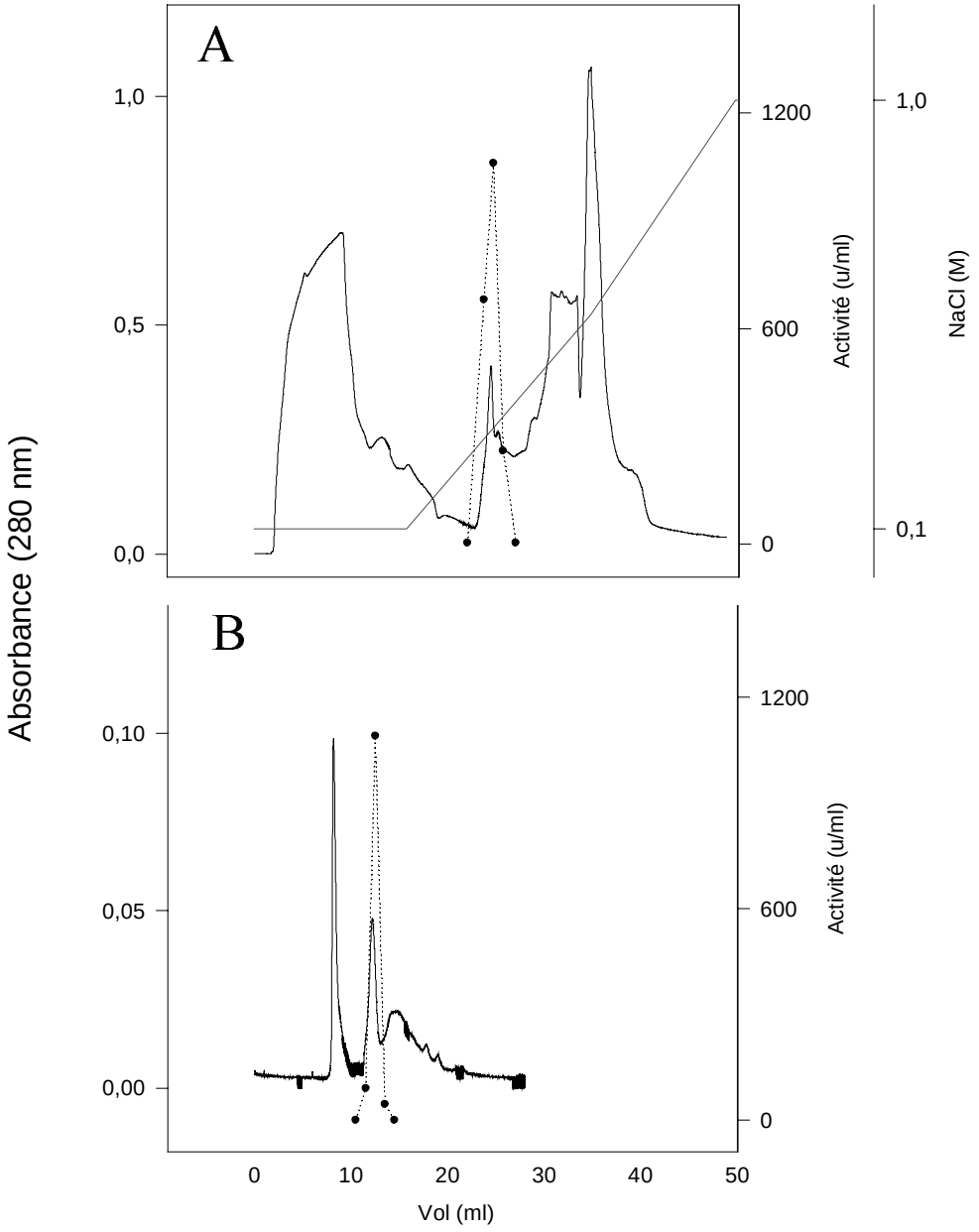


Figure III.34 : Purification de la chymosine A recombinante. (**A**) Profil d´élution de l´échantillon dans une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) avec un flux de 0,5 ml/min. (**B**) Profil d´élution de la chymosine purifiée dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) avec un flux de 0,3 ml/min. A280 (-), concentration de NaCl (-) et activité de coagulation du lait (---).

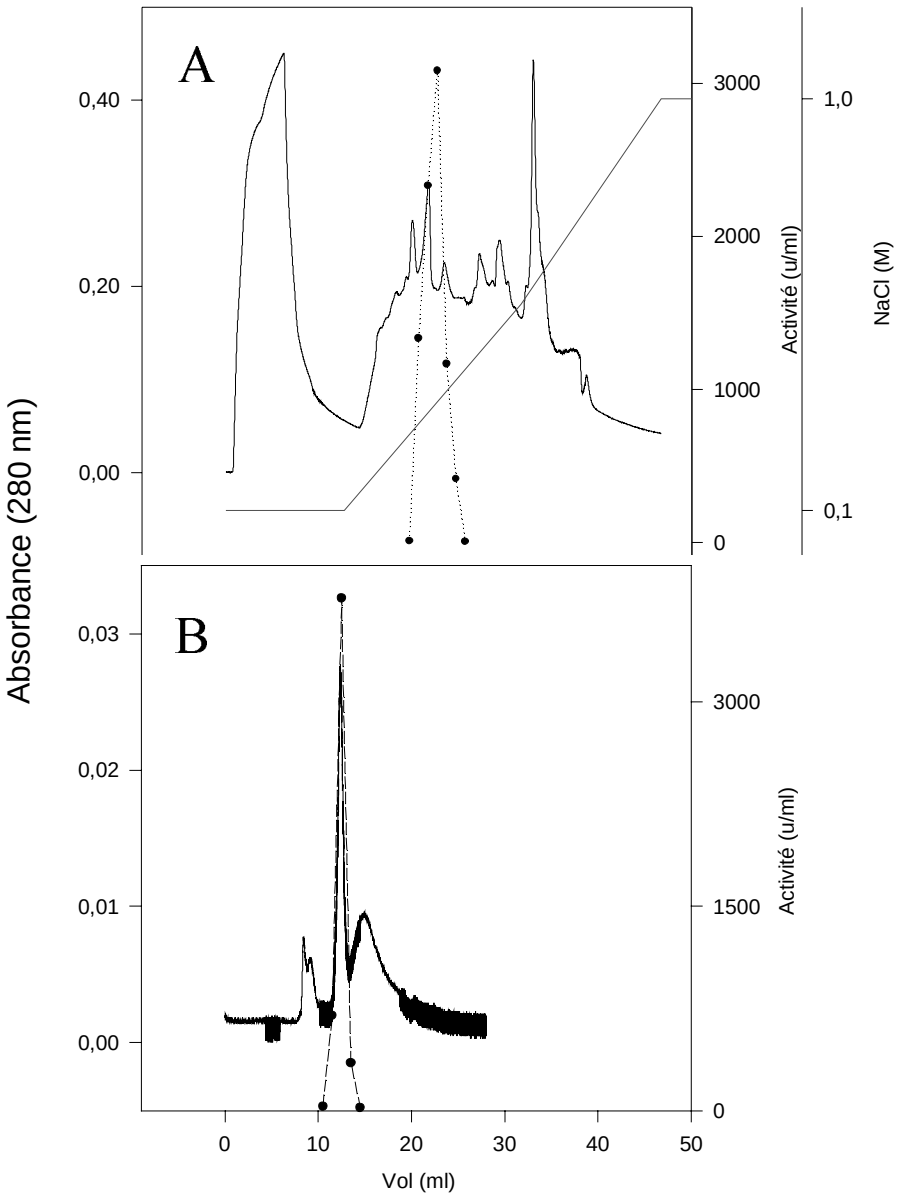


Figure III.35 : Purification de la chymosine B S79N recombinante. (**A**) Profil d´élution de l´échantillon dans une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) avec un flux de 0,5 ml/min. (**B**) Profil d´élution de la chymosine purifiée dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) avec un flux de 0,3 ml/min. A280 (-), concentration de NaCl (-) et activité de coagulation du lait (---).

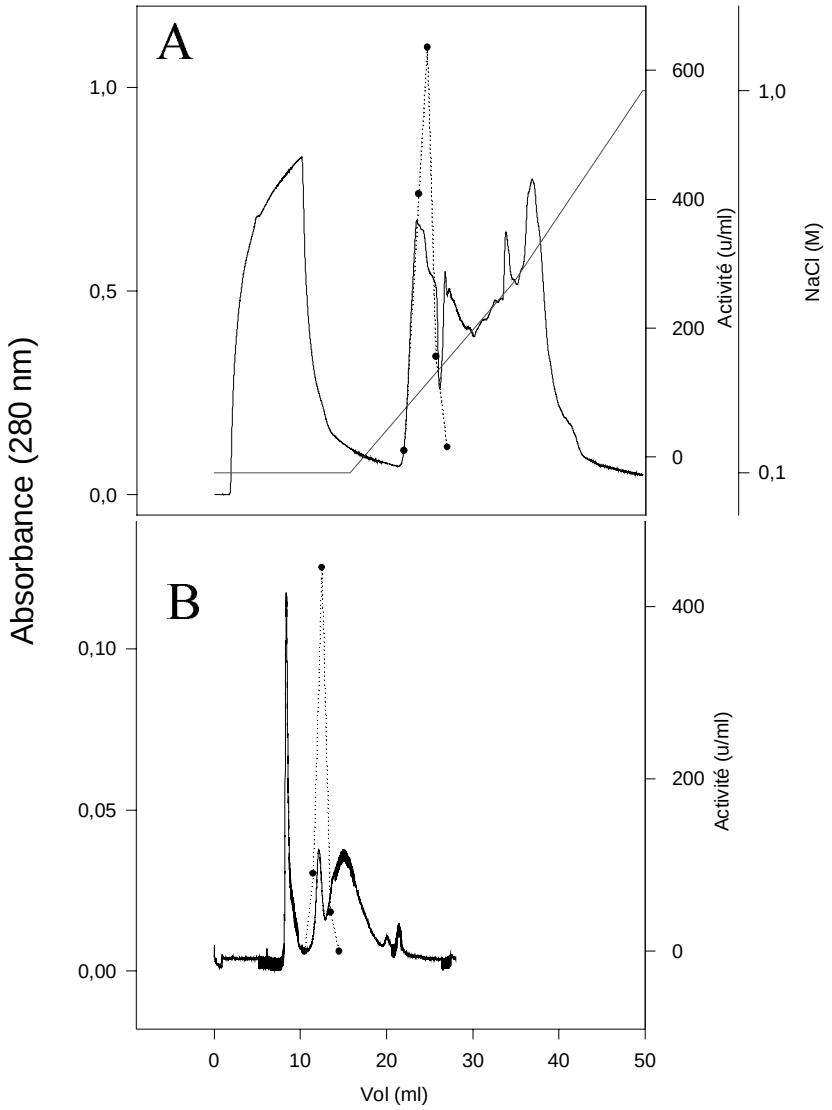


Figure III.36 : Purification de la chymosine B recombinante. (**A**) Profil d´élution de l´échantillon dans une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) avec un flux de 0,5 ml/min. (**B**) Profil d´élution de la chymosine purifiée dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) avec un flux de 0,3 ml/min. A280 (-), concentration de NaCl (-) et activité de coagulation du lait (---).

Tableau III.3 : Bilan des étapes de purification de la chymosine A à partir de la culture du clone 4S9.

Etapes de purification clone 4S9 chymosine A	vol (ml)	Activité totale* ($Ux10^{-3}$)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Purification	Rendement (%)
Surnageant de culture	247,7	7,93	792,64	10,0	1	100
Concentration	4,83	2,9	12	240	24	36
Dialyse	6,25	2,5	8,75	286	29	31
MonoQ	3,0	2,0	0,75	2668	267	25
Concentration	0,2	1,2	0,196	6122	615	15
Superdex	1,0	1,09	0,17	6412	641	13,7

* Une unité d´activité est définie comme la quantité de chymosine active nécessaire pour former un caillé en 10 min (voir chapitre « II.9.2.1. Test de coagulation du lait » du Matériels et méthodes).

Tableau III.4 : Bilan des étapes de purification de la chymosine B S79N à partir de la culture du clone 2S8.

Etapes de purification clone 2S8 chymosine B S79N	vol (ml)	Activité totale* ($Ux10^{-3}$)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Purification	Rendement (%)
Surnageant de culture	250	47	850	55,3	1	100
Concentration	4,1	10,7	5,3	2020	36	23
Dialyse	4,8	8,48	3,65	2325	42	18
MonoQ	4,4	7,3	1,14	6403,5	116	15,5
Concentration	0,2	4,3	0,18	23889	438	9
Superdex	1,0	3,76	0,15	25067	454	8

* Une unité d´activité est définie comme la quantité de chymosine active nécessaire pour former un caillé en 10 min (voir chapitre « II.9.2.1. Test de coagulation du lait » du Matériels et méthodes).

Tableau III.5 : Bilan des étapes de purification de la chymosine B à partir de la culture du clone 37.

Etapes de purification clone 37 chymosine B	vol (ml)	Activité totale* ($Ux10^{-3}$)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Purification	Rendement (%)
Surnageant de culture	204,6	7,2	941,2	7,6	1	100
Concentration	4,0	3,0	13,2	227,3	30	42
Dialyse	5,5	2,2	5,2	423	56	30
MonoQ	2,5	1,0	0,75	1333	175	14
Concentration	0,2	0,5	0,16	3125	411	7
Superdex	1,0	0,445	0,1	4450	585	6,2

* Une unité d´activité est définie comme la quantité de chymosine active nécessaire pour former un caillé en 10 min (voir chapitre « II.9.2.1. Test de coagulation du lait » du Matériels et méthodes).

Chez les levures exprimant l´aprotinine et la superoxyde dismutase, ces auteurs ont observé une corrélation positive entre l´augmentation du nombre de copies du gène d´intérêt et un plus grand niveau d´expression de la protéine. Par contre, chez les levures exprimant le lysozyme bovin, ils ont observé une relation négative entre le nombre de copies du gène d´intérêt et l´expression de la protéine. Une intégration multiple peut ainsi avoir des effets positifs mais aussi négatifs sur l´expression de protéines hétérologues chez *P. pastoris*.

III.5. Cinétiques de la chymosine A, chymosine B et chymosine B S79N

III.5.1. Importance du tampon (« flap ») chez la chymosine

Les études de diffraction des RX ont montré que les structures tridimensionnelles des protéases à acide aspartique étaient très proches les unes des autres (NEWMAN *et al.*, 1991). Il s´agit en effet de molécules bilobées, composées de deux domaines similaires riches en feuillets β. Leur jonction forme le sillon du site actif où se trouvent les deux résidus D32 et D215 essentiels pour l´activité catalytique de ces enzymes (SUZUKI *et al.*, 1989). Une anse externe mobile (résidus 72 à 86) est localisée à l´entrée de ce sillon, agissant comme un tampon.

Selon TANG et KOELSCH (1995), les fonctions du tampon chez les protéases à acide aspartique sont (1) de contribuer à un environnement plus hydrophobe pour le site catalytique, (2) de participer à l´état de transition et (3) d´empêcher que le substrat ne s´échappe du site actif avant que l´hydrolyse ne soit complète. Enfin, ils proposent que la fonction la plus importante du tampon soit de capturer le substrat, déterminant alors le site de clivage et donc la spécificité de l´enzyme.

Comme nous l´avons mentionné auparavant, la structure de la chymosine bovine, bien que très proche de celles de la pepsine et autres protéases à acide aspartique, présente un réarrangement considérable du tampon. Nous avons donc choisi, dans un premier temps, de parler de manière plus détaillée de son importance chez la chymosine, permettant alors de mieux comprendre l´effet de la mutation S79N étudiée. Pour cela, nous avons analysé les points de vue de plusieurs auteurs qui, comme nous allons le voir, soutiennent différentes hypothèses sur la conformation du tampon chez la chymosine bovine.

SUSUKI *et al.* (1989) ont généré des mutations artificielles chez la chymosine bovine utilisant les techniques d´ADN recombinant. Ils ont ainsi contribué à l´élucidation de la

fonction du tampon chez la chymosine bovine. Le résidu Y75, qui se trouve dans le tampon, est un résidu hautement conservé chez les protéases à acide aspartique (**tableau III.6**). Ces auteurs ont étudié l´effet de la mutation Y75F et ont montré que la Y75 était impliquée non seulement dans la fixation du substrat mais aussi dans l´activité catalytique de l´enzyme.

Tableau III.6 : Séquences des tampons de différentes protéases à acide aspartique.

Enzyme	Position des résidus du tampon*															
	72	73	74	75	76	77	78	79	-	80	81	82	83	84	85	86
pepsine porcine	S	I	T	**Y**	G	T	G	S	-	M	T	G	I	L	G	Y
chymosine bovine	S	I	H	**Y**	G	T	G	S	-	M	Q	G	I	L	G	Y
gastricsinehumaine	S	L	Q	**Y**	G	S	G	S	-	L	T	G	F	F	G	Y
penicillopepsine	S	I	S	**Y**	G	D	G	S	S	A	S	G	N	V	F	T
rhizopepsine	S	I	S	**Y**	G	D	G	S	S	A	S	G	I	L	A	K

* La numérotation est basée sur la séquence de la pepsine porcine

code Protein Data Bank (PDB) : pepsine porcine (3PEP), chymosine bovine B (4CMS), gastricsine humaine (1AVF-A), penicillopepsine (3APP), rhizopepsine (2APR).

Selon STROP *et al.* (1990), il a été possible d´identifier le site actif de la chymosine bovine par analogie avec d´autres protéases à acide aspartique comme l´endothiapepsine (FOUNDLING *et al.*, 1987), la penicillopepsine (JAMES *et al.*, 1982) et la rhizopepsine (SUGUNA *et al.*, 1987) pour lesquelles il existait des structures tridimensionnelles obtenues par cristallographie de complexes enzyme-inhibiteur alors que ce n´était pas le cas pour la chymosine. Ces études ont confirmé l´existence de sous-sites de S_4 à S'_3 (SCHECHTER et BERGER, 1967). Dans la position 111, qui lie les sous-sites S_1 et S_3, il existe une valine chez la chymosine et une phénylalanine chez la pepsine. STROP *et al.* (1990) ont donc émis l´hypothèse que ce résidu jouait un rôle important dans la reconnaissance du substrat et ont également utilisé les techniques d´ADN recombinant pour étudier l´effet de la mutation V111F chez la chymosine bovine. C´est en comparant les structures tridimensionnelles de la chymosine sauvage et de la chymosine mutante V111F que ces auteurs ont observé un

réarrangement du tampon de la protéine (résidus 74 à 79), avec deux conformations possibles qu´ils ont alors dénommées A et B. Dans la conformation A, le tampon serait dans une position analogue à celui de la chymosine sauvage (GILLIGAND *et al.*, 1990 ; NEWMAN *et al.*, 1991), c´est à dire bloquant partiellement l´accès au sous-site S_1. Par contre, la conformation B serait équivalente à celles recontrées chez la pepsine porcine et autres protéases à acide aspartique de champignons. Ces auteurs concluent que la conformation A serait le résultat des forces d´empaquetage de la cristallisation et qu´il est probable qu´en solution, la chymosine sauvage et la chymosine mutante V111F adoptent la conformation B observée chez les autres protéases à acide aspartique.

Si nous reprenons à présent les travaux de GILLIGAND *et al.* (1990), ces derniers ont déterminé la structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante à 2,3 Å et l´ont comparée à celles de protéases à acide aspartique de champignons. Ils ont ainsi observé que la position du tampon était modifiée chez la chymosine mais ils rappellent que le fait qu´ils n´aient pas réussi à obtenir de complexes chymosine/inhibiteur pourrait être le résultat de l´incapacité du tampon de se déplacer en raison des contraintes d´empaquetage, renforcant donc l´hypothèse que cette différence de conformation du tampon entre la chymosine bovine et les autres protéases à acide aspartique serait due à l´environnement cristallin.

Quant à ANDREEVA *et al.* (1992), ces auteurs ont émis l´hypothèse contraire à celle jusque là proposée en soulignant que la position du tampon qui recouvre le sillon du site actif est une propriété intrinsèque de l´enzyme. Leurs résultats suggèrent que la chymosine existeraient sous deux formes, une forme active et une forme « auto-inhibée ». Ils affirment que la différence de conformation du tampon serait due en partie aux différences dans la séquence en acides aminés du tampon lui-même mais également à d´autres différences rencontrées dans les régions adjacentes. Ils montrent, entre autres, l´importance du résidu H74, qui influencerait la conformation du tampon de la chymosine bovine. Il existe deux liaisons hydrogène entre l´atome ND1 de l´histidine 74 avec l´oxygène du résidu G78 et l´OG du résidu S79, ce dernier faisant l´objet de notre étude.

L´hypothèse d´ANDREEVA *et al.* (1992) a été reprise dans les travaux réalisés par GUSTCHINA *et al.* (1996). Ainsi, comme nous venons de le voir, la chymosine existerait sous deux formes en solution, une forme active dans laquelle le site actif serait libre pour l´accès du substrat et sous une forme « auto-inhibée » avec les sous-sites S_1 et S_3 cachés par le résidu Y75. Cette hypothèse laisse penser que le clivage spécifique de la liaison F_{105}-M_{106} de la caséine κ serait précédé de l´action d´un facteur additionnel qui déplacerait le résidu Y75 libérant le site actif. En analysant les propriétés spécifiques de la caséine κ, les auteurs ont

suggéré que le motif histidine-proline de la caséine κ: H P H P H pouvait être ce facteur. Ainsi, GUSTCHINA *et al.* (1996) montrent qu'une incubation préliminaire de la chymosine avec un pentapeptide correspondant au motif histidine-proline résulte en une augmentation de 200 fois de la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme sur un autre substrat correspondant aux résidus 103 à 109 de la caséine κ. Le motif histidine-proline serait donc un effecteur allostérique, conduisant à la conversion de l'enzyme dans sa forme active. Ces données expérimentales permettent de comprendre la spécificité de la chymosine bovine envers la caséine κ et soulignent l'importance du résidu Y75 ainsi que celle du tampon dans l'activité de l'enzyme.

C'est à GROVES *et al.* (1998) que nous devons la première étude de cristallographie par RX d'un complexe chymosine/inhibiteur (1CZI). Ces auteurs ont montré que la région du tampon (résidus 71 à 81) est réarrangée par rapport à celle de la chymosine native, la position de ce tampon étant proche de celle observée chez les autres protéases à acide aspartique. Ces auteurs concluent en disant que la question sur la conformation du tampon chez la chymosine « libre » reste ouverte, cette conformation pouvant être le résultat d'interactions intermoléculaires avec les molécules voisines dans la matrice des cristaux ou pouvant être une propriété intrinsèque de l'enzyme comme le pensent ANDREEVA *et al.* (1992) et GUSTCHINA *et al.* (1996).

Plus récemment, GUSTCHINA *et al.* (2002), qui ont étudié la structure tridimensionnelle d'une protéase à acide aspartique de *S. cerevisiae*, ont observé une conformation du tampon similaire à celle de la chymosine native. Les résultats présentés dans cette publication ne font que renforcer l'hypothèse soutenue par ces auteurs que la conformation du tampon en position A (cf page 65) chez la chymosine n'est pas un artefact mais une caractéristique propre de l'enzyme.

Enfin, KASHPAROV *et al.* (2002) ont appliqué la méthode de dynamique moléculaire pour tester l'hypothèse de l'existence d'une forme auto-inhibée de la chymosine en solution. Les résultats des simulations semblent indiquer que la chymosine adopterait spontanément cette forme auto-inhibée en solution. La conformation observée chez la chymosine ne serait donc pas due aux contraintes de l'environnement cristallin.

Ainsi, nous proposons d'apporter notre contribution à l'étude de l'importance du tampon dans l'activité de la chymosine bovine en étudiant l'effet de la mutation S79N. Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés cinétiques des chymosines sur différents substrats puis nous avons modélisé la mutation S79N.

III.5.2. Cinétiques des chymosines recombinantes

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps, les résultats concernant l'hydrolyse du peptide synthétique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu. Notre choix s'est porté sur cet hexapeptide car il est considéré comme étant le peptide de référence pour la détermination de l'activité de la chymosine. Ce peptide est similaire à la région de la caséine κ entourant la liaison peptidique Phe_{105}-Met_{106} sensible à l'action de la chymosine (Leu_{103}-Ser_{104}-Phe_{105}-Met_{106}-Ala_{107}-Ile_{108}). Nous pouvons observer la substitution de la méthionine (position 106) par le résidu isostérique norleucine, qui a permis d'améliorer la stabilité du peptide puisque ce dernier est moins sensible à l'oxydation (RAYMOND *et al.*, 1973). Puis, dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats concernant l'hydrolyse du substrat naturel de la chymosine, la caséine κ soit « seule » en solution, soit présente dans le lait.

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent des chymosines recombinantes obtenues par des purifications qui ont été réalisées postérieurement à celles présentées dans le chapitre « III.4. Purification de la met-prochymosine » de la partie Résultats et discussion. Nous avons, en effet, tenté d'améliorer notre méthode de purification en y apportant quelques modifications (concentration du milieu de culture avec 50% de sulfate d'ammonium, suivie d'une centrifugation à 10000 g pendant 1h à 4°C ; utilisation d'une colonne échangeuse d'ions HiTrap™ Q HP 1 ml d'Amersham Pharmacia Biotech). La chymosine A ainsi obtenue a présenté une activité spécifique sur le lait de 58000 U/mg. La chymosine B, quant à elle, a présenté une activité spécifique sur le lait de 10500 U/mg et la chymosine B S79N a présenté une activité spécifique de 15400 U/mg. Ces activités spécifiques étant proches de celles rencontrées dans la littérature, nous avons alors décidé d'utiliser ces chymosines pour la partie expérimentale concernant les cinétiques sur les différents substrats étudiés.

Enfin, il est important de parler ici de la purification de la chymosine B de Maxiren (Gist-brocades ; voir **tableau I.7** du chapitre « Intoduction »), que nous avons utilisée comme témoin lors de nos différents tests d'activité. Nous possédions cette enzyme sous sa forme commerciale, c'est à dire en poudre. Nous avons ressuspendu 5 g de cette poudre dans 30 ml de tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,3 avec 0,1 M NaCl. Cet échantillon a alors été dialysé contre ce même tampon durant la nuit. Enfin, 200 µl de cet échantillon ont été appliqués dans une colonne de gel filtration Superdex 75 HR 10/30. Nous avons alors obtenu la chymosine B de Maxiren purifiée que nous avons utilisée pour les différents tests d'activité.

III.5.2.1. Cinétiques d´hydrolyse du peptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu

III.5.2.1.1. Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse

Nous avons, dans un premier temps, déterminé le facteur de correction de 0,427 entre l'absorbance lue à 310 nm dans un volume de 100 µl dans un puits de microplaque à l´aide du spectrophotomètre à microplaques et la quantité de produit de la réaction enzymatique formé Leu-Ser-Phe(NO_2), déterminée à l´aide d´un spectrophotomètre comme décrit dans le chapitre II.9.4.1. « Préparation du substrat » du Matériels et Méthodes.

Nous nous devons ici de parler des limites concernant l´utilisation de cet hexapeptide. En effet, en raison de sa faible solubilité et de sa forte absorbance, il est impossible d´utiliser des concentrations en substrat supérieures à celles que nous avons utilisées (jusqu´à 0,6 mM), ne permettant pas alors d´atteindre la saturation de l´enzyme. Ainsi, les conditions expérimentales employées ne sont pas considérées comme étant les meilleures pour estimer avec précision les paramètres cinétiques comme le K_m et le k_{cat} (MARTIN *et al*, 1980).

La **figure III.37** présente les cinétiques des différentes chymosines avec l´hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu comme substrat. A partir de ces résultats, nous avons alors calculé les constantes cinétiques relatives à l´hydrolyse de cet hexapeptide à pH 4,7 et à 30°C par la chymosine A, la chymosine B, la chymosine B S79N et la chymosine B de Maxiren. Les paramètres cinétiques k_{cat}, V_{max}, K_m et k_{cat}/K_m (voir chapitre II.9.5 « Analyses des données » du Matériels et Méthodes) sont regroupés dans le **tableau III.7**.

Nous avons obtenu des valeurs de K_m de 2,3 mM pour la chymosine B, de 1,1 mM pour la chymosine B S79N, de 0,95 mM pour la chymosine A et de 1 mM pour la chymosine B de Maxiren. Ces valeurs sont très proches de celles décrites par MARTIN *et al.* (1980) puisque ces derniers ont observé un K_m de 1,09 pour la chymosine A « authentique » et un K_m de 1,01 pour la chymosine B « authentique » dans les mêmes conditions testées. Quant aux travaux de NUGENT *et al.* (1996), ces auteurs ont observé un K_m de 0,9 mM pour la chymosine B recombinante exprimée chez *Trichoderma reesei,* dans des conditions expérimentales très proches (tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 4,7 à 30°C). Enfin, CHITPINITYOL *et al.* (1998) ont observé un K_m de 0,38 mM en ce qui concerne la chymosine B recombinante exprimée chez *E. coli* dans des conditions identiques aux nôtres.

En ce qui concerne les valeurs de k_{cat} , nous observons pour la chymosine A un k_{cat} de 17 s^{-1}. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par MARTIN *et al.* (1980) qui ont observé un k_{cat} de 27 s^{-1}. Si nous considérons à présent les différentes chymosines B, nous pouvons

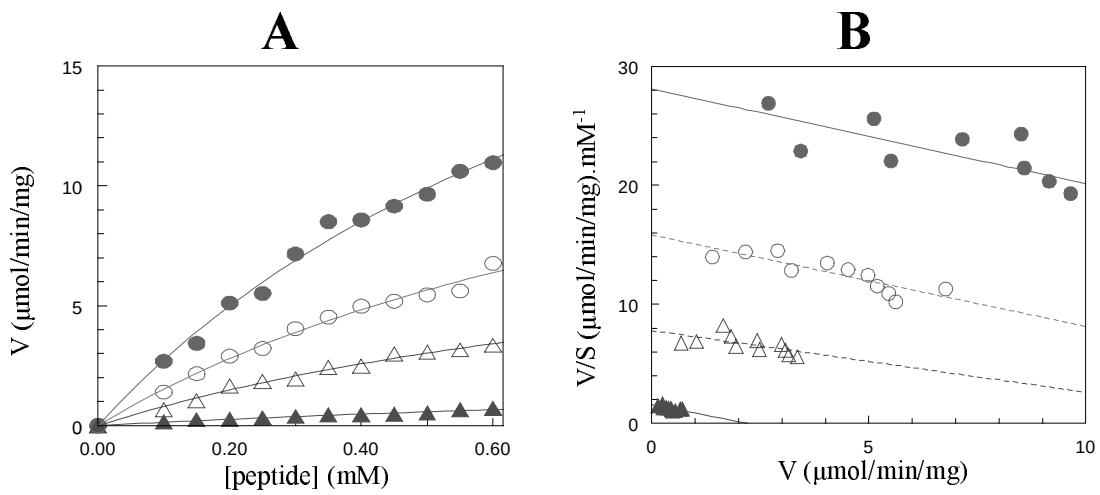


Figure III.37: Cinétiques d´hydrolyse de l´hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-Ome.
(A) Ajustement non linéaire des données à l´équation de Michaelis-Menten
(B) Tracé d´Eadie-Hofstee
Pour les conditions expérimentales, voir ci-dessous.
Légende : chymosine B (▲), chymosine B S79N (Δ), chymosine A(●) et chymosine B de Maxiren (O).

Tableau III.7 : Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse de l´hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe par différentes chymosines.

Enzyme	Méthode	Km (mM)	Vmax (µmol/min/mg)	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($M^{-1}s^{-1}$)
Chymosine B	A	2,3	3,22	1,9	$8,3.10^2$
	B	1,42	2,21	1,3	$9,1.10^2$
Chymosine B S79N	A	1,1	9,78	5,8	$5,3.\ 10^3$
	B	1,93	15,05	8,9	$4,6.10^3$
Chymosine A	A	0,95	28,7	17	$1,8.\ 10^4$
	B	1,25	35,23	20,9	$1,7.10^4$
Chymosine B Maxiren	A	1	17,7	10,5	$1,05.\ 10^4$
	B	1,3	20,6	12,2	$9,4.10^3$

Les réactions d´hydrolyse du peptide synthétique par les chymosines ont été réalisées dans un tampon d'acétate de sodium 100 mM pH 4,7 à 30°C et le changement d´absorbance à 310 nm a été suivi sur un spectrophotomètre à microplaques.

Les concentrations d´enzymes sont 702,5 ; 208,5 ; 84,3 et 130 nM pour la chymosine B, la chymosine B S79N, la chymosine A et la chymosine B de Maxiren, respectivement.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par ajustement des données à l´équation de Michaelis-Menten (A) et par la méthode d´Eadie-Hofstee (B).

observer pour chacune d´elles, des valeurs de k_{cat} bien distinctes. La chymosine B de Maxiren présente un k_{cat} de 10,5 s^{-1} qui se rapproche le plus des valeurs rencontrées dans la littérature. En effet, MARTIN *et al.* (1980), NUGENT *et al.* (1996) et CHITPINITYOL *et al.* (1998) ont obtenu des valeurs de k_{cat} de 25 s^{-1}, de 14,7 s^{-1} et de 18,9 s^{-1} pour la chymosine B. Nous obtenons des valeurs bien inférieures pour la chymosine B (1,9 s^{-1}) et pour la chymosine B S79N (5,8 s^{-1}). Il est important de rappeler ici que toutes ces chymosines B ont été produites de manière différente. Dans notre étude, la chymosine B recombinante est produite chez la levure *P. pastoris* et la chymosine B recombinante de Maxiren est produite par la levure *K. lactis*. La chymosine B de MARTIN *et al.* (1980) est « authentique », celle de NUGENT *et al.* (1996) est une enzyme recombinante produite chez *T. reesei* et enfin celle de CHITPINITYOL *et al.* (1998) est une enzyme recombinante produite chez *E. coli*. Ces enzymes ont donc été sécrétées de manière différente, subissant chacune des modifications post-traductionnelles particulières et elles ont, chacune, été purifiées suivant un protocole spécifique ce qui peut expliquer ces différences d´activités.

Si nous comparons à présent la chymosine B et la chymosine B S79N produite de la même manière (chez *P. pastoris*), nous observons que la chymosine B mutante présente une efficacité catalytique plus de 6 fois supérieure à celle de la chymosine B sauvage.

Il est intéressant de noter ici que dans les travaux de MARTIN *et al.* (1980), ces auteurs n´observent pas de différences entre les paramètres cinétiques des chymosines A et B à pH 4,7 concernant l´hydrolyse de l´hexapeptide. Dans notre étude, la chymosine A est plus active que toutes les chymosines B testées.

III.5.2.1.2. Effet du pH sur la réaction d´hydrolyse de l´hexapeptide

Nous avons suivi l´hydrolyse de l´hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu par la chymosine A, la chymosine B, la chymosine B S79N et la chymosine B de Maxiren à différents pH. Nous avons pu vérifier que le pH optimum pour la chymosine A est de 4,2 et pour les différentes chymosines B, il est de 3,7 (**figure III.38**). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (MARTIN *et al.*, 1980). Il est important de souligner que la chymosine B mutante S79N, dont le pH optimum est de 3,7, est donc bien une chymosine B.

Les valeurs des pK observés de la chymosine A sont de 3,25 et de 5,0, celles de la chymosine B sont de 3,32 et de 4,21, celles de la chymosine B S79N sont de 3,34 et de 4,21 et celles de la chymosine B de Maxiren sont de 3,25 et de 4,19. SALESSE et GARNIER (1976)

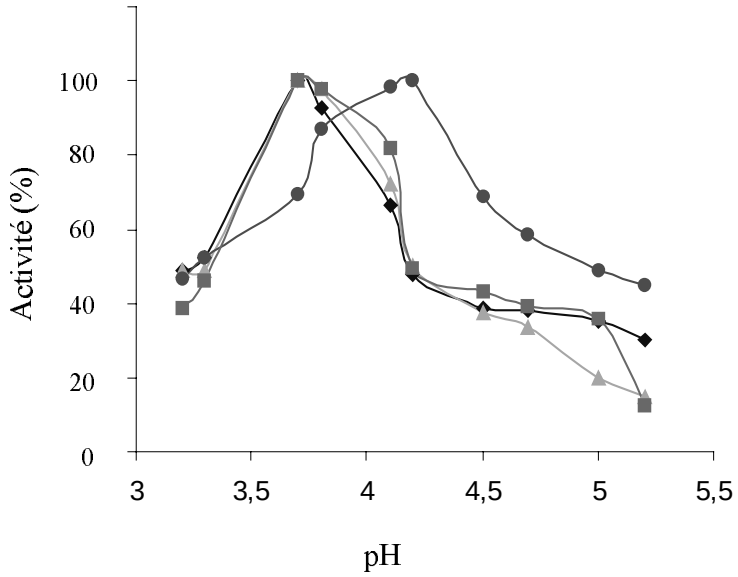


Figure III.38 : Effet du pH sur les vitesses initiales d´hydrolyse du peptide synthétique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu par les différentes chymosines.

Nous avons étudié l´hydrolyse de l´hexapeptide aux pH 3,2, 3,3, 3,7, 3,8, 4,1, 4,2, 4,5, 4,7 5,0 et 5,2. Nous avons utilisé une unique concentration de substrat, 0,4 mM. Les concentrations d´enzyme sont 702,5; 208,5; 112,4 et 130 nM pour la chymosine B (▲), la chymosine B S79N (■), la chymosine A (●) et la chymosine B de Maxiren (◆).

100% d´activité correspondent à 0,87; 3,21; 6,65 et 7,39 s^{-1} pour la chymosine B, la chymosine B S79N, la chymosine A et la chymosine B de Maxiren.

Le pH optimum de la chymosine A est de 4,2 et celui des différentes chymosines B est de 3,7.

Les valeurs des pK_{obs} de la chymosine A sont de 3,25 et de 5,0, celles de la chymosine B sont de 3,32 et de 4,21, celles de la chymosine B S79N sont de 3,34 et de 4,21 et celles de la chymosine B de Maxiren sont de 3,25 et de 4,19.

ont observé des pK_{obs} de 3,5 et de 5,3 pour un mélange de chymosines A et B. MARTIN *et al.* (1980) ont observé des pK_{obs} de 3,0 et de 5,55 pour la chymosine A et de 2,6 et de 5,3 pour la chymosine B.

III.5.3.2. Cinétiques d´hydrolyse de la caséine κ

La **figure III.39** présente les cinétiques d´hydrolyse de la caséine κ par différentes chymosines. Nous avons calculé les paramètres cinétiques suivants : V_{max}, K_m et V_{max}/K_m (**tableau III.8**). La chymosine A présente toujours une efficacité apparente (V_{max}/K_m) supérieure à celles des chymosines B. La chymosine B mutante S79N présente une efficacité apparente 1,4 fois supérieure à celle de la chymosine B.

Nous avons pu observer une phase de latence lors de l´hydrolyse de la caséine κ par les différentes chymosines. Nous avons alors, pour chaque chymosine étudiée et pour chaque concentration de substrat utilisée, mesuré la durée de cette phase de latence. Ces données sont représentées dans la **figure III.40**. La chymosine A, qui est l´enzyme la plus active, présente les phases de latence les plus courtes. Pouvons-nous faire une relation entre l´efficacité de l´enzyme et la durée de la phase de latence ? Il semble en effet que moins l´enzyme est active, plus la durée de la phase de latence augmente. Toutefois, la chymosine B présente les durées des phases de latence les plus longues alors que son efficacité apparente est supérieure à celle de la chymosine B de Maxiren. Cette phase de latence observée lors de l´hydrolyse de la caséine κ serait-elle liée à la conversion de l´enzyme dans sa forme active (GUSTCHINA *et al.*, 1996) ? Si tel était le cas, la durée de la phase de latence pourrait dépendre de la position du tampon. Les durées des phases de latence ne démontrent-elles pas alors que la conformation du tampon est différente chez la chymosine B mutante S79N par rapport à la chymosine B sauvage ? En effet, en plus de son efficacité apparente légèrement supérieure, nous observons des phases de latence beaucoup plus courtes pour la chymosine mutante B S79N que pour la chymosine B.

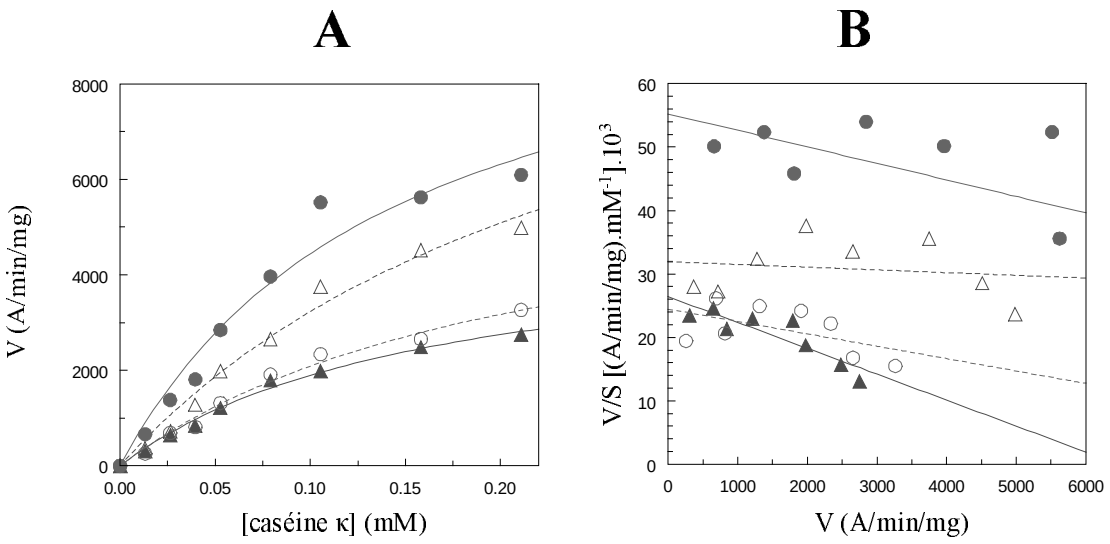


Figure III.39: Cinétiques d´hydrolyse de la caséine κ.
(A) Ajustement non linéaire des données à l´équation de Michaelis-Menten
(B) Tracé d´Eadie-Hofstee
Pour les conditions expérimentales, voir ci-dessous.
Légende: chymosine B (▲), chymosine B S79N (Δ), chymosine A (●) et chymosine B de Maxiren (O).

Tableau III.8 : Paramètres cinétiques des réactions d´hydrolyse de la caséine κ par différentes chymosines.

Enzyme	Méthode	Km (mM)	Vmax (A/min/mg)	Vmax/Km (A/min/mg.mM^{-1})
Chymosine B	A	0,16	4,98. 10^3	31125
	B	0,25	6,5. 10^3	26000
Chymosine B S79N	A	0,27	1,2.10^4	44444
	B	2,34	7,5. 10^4	32051
Chymosine A	A	0,15	1,1.10^4	73333
	B	0,38	2,1. 10^4	55263
Chymosine Maxiren	A	0,22	6,6.10^3	30000
	B	0,51	1,2. 10^4	23529

Les réactions d´hydrolyse de la caséine κ par les chymosines ont été réalisées dans un tampon citrate 50 mM, NaCl 75 mM pH 5,3 à 30°C et le changement d´absorbance à 650 nm a été suivi sur un spectrophotomètre à microplaques.

La concentration utilisée pour toutes les enzymes est de 6,52 nM.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus par ajustement des données à l´équation de Michaelis-Menten (A) et par la méthode d´Eadie-Hofstee (B).

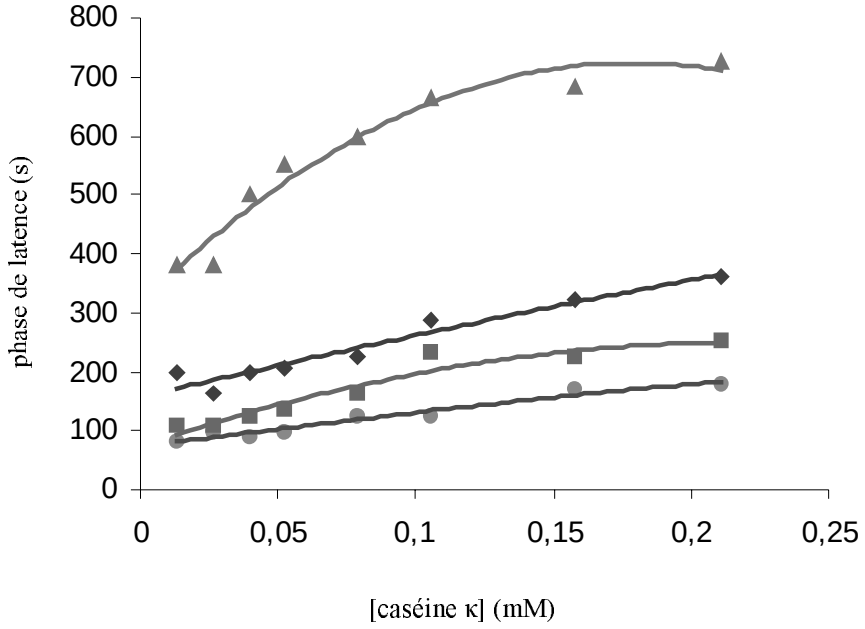


Figure III.40: Durées des phases de latence observées lors de l´hydrolyse de la caséine κ par les différentes chymosines en fonction de la concentration en substrat.

Les réactions d´hydrolyse de la caséine κ par les chymosines ont été réalisées dans un tampon citrate 50 mM, NaCl 75 mM pH 5,3 à 30°C et le changement d´absorbance à 650 nm a été suivi sur un spectrophotomètre à microplaques.
La concentration utilisée pour la chymosine B (▲), la chymosine B S79N (■), la chymosine A (●) et la chymosine B de Maxiren (◆) est de 6,5192 nM.

III.5.3.3. Cinétiques d´hydrolyse du lait

Le **tableau III.9** présente les activités spécifiques des différentes chymosines sur le lait. La chymosine A présente l´activité spécifique la plus grande ($5,8.10^4$ U/mg), suivi par la chymosine B de Maxiren ($4,6.10^4$ U/mg), la chymosine B S79N ($1,54.10^4$ U/mg) et la chymosine B ($1,05.10^4$ U/mg). Ces résultats ont été confirmé par les courbes de turbidimétrie, pour lesquelles les conditions expérimentales étaient différentes en pH, en température mais également en concentration de substrat (**figure III.41**). Les résultats présentés ici se rapprochent de ceux observés pour l´hydrolyse du peptide synthétique concernant la « classification » des enzymes, à savoir de l´enzyme la plus active à l´enzyme la moins active. La chymosine B de Maxiren présente des résultats d´hydrolyse de la caséine κ, qui correspondent « le moins » à ceux de l´hydrolyse de l´hexapeptide et à ceux de l´activité sur le lait, puisque dans les deux derniers cas, elle est plus active que la chymosine B S79N et que la chymosine B. Il est intéressant de rapeller ici qu´il est toujours difficile d´analyser les résultats d´activité obtenus sur un substrat complexe comme le lait. En effet, jusqu´à maintenant nous avons travaillé avec des substrats en solution, que ce soit le peptide synthétique ou la caséine κ. Ici, la caséine κ n´est plus « seule », il y a, entre autres, la caséine β, qui est également hydrolysée par la chymosine. De plus, dans le lait, les caséines sont organisées en micelles ce qui rend encore plus difficile l´interprétation des résultats. Ainsi, il n´est pas surprenant si les résultats de l´hydrolyse de la caséine κ et ceux de l´activité sur le lait soient différents.

III.5.3. Modélisation de la mutation S79N

Nous avons modélisé la mutation S79N utilisant le programme Swiss-Pdb Viewer version 3.7b2 (GUEX et PEITSCH, Suisse) et avons pu observer les changements qu´elle entraînait notamment concernant les liaisons hydrogène engagées. Nous avons choisi pour cela de travailler avec les structures tridimensionnelles de la chymosine « libre » (4CMS, **figure III.42**) et du complexe chymosine/inhibiteur (1CZI, **figure III.43**). Dans la structure de la chymosine « libre », il existe une liaison hydrogène entre l´OG du résidu sérine 79 et l´atome ND1 de l´histidine 74. Si nous remplaçons à présent la sérine 79 par l´asparagine dans cette même position, nous observons deux liaisons hydrogène. Une des liaisons se situe entre l´OD1 de l´asparagine 79 et l´atome NE2 de l´histidine 74. La deuxième liaison hydrogène se situe entre l´atome ND2 de l´asparagine 79 et l´O de la méthionine 80. Si nous observons à

Tableau III.9 : Activités spécifiques des différentes chymosines sur le lait.

Enzyme	Activité spécifique (U/mg)
Chymosine B	10500
Chymosine B S79N	15400
Chymosine A	58000
Chymosine B Maxiren	46000

La chymosine est ajoutée à 200 µl d'une solution de lait écrémé en poudre à 12% (p/v) contenant 20 mM de $CaCl_2$. Le tout est incubé à 37°C jusqu'à l'apparition d'un caillé. Une unité d'activité est définie comme la quantité de chymosine active nécessaire pour former un caillé en 10 min dans les conditions précédentes.

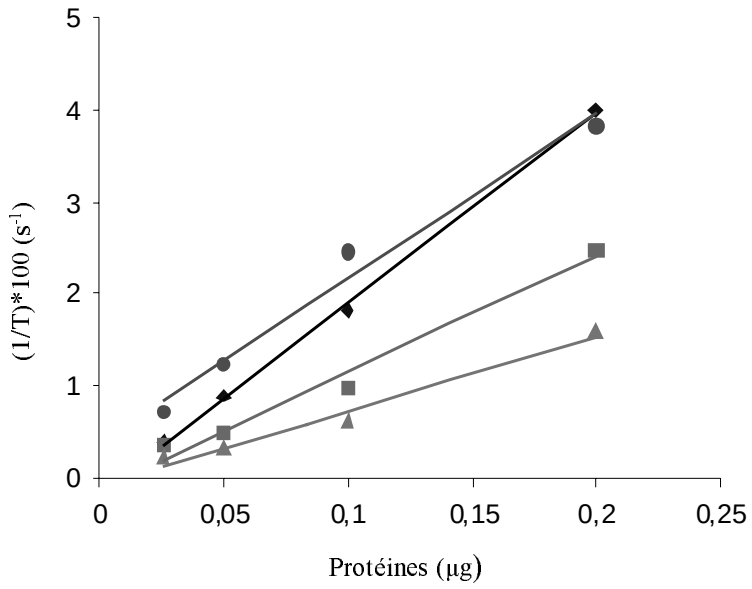


Figure III.41 : Courbes de turbidimétrie des différentes chymosines.

Les échantillons (10µl) contenant 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 µg de chymosine A (●), de chymosine B (▲), de chymosine B S79N (■) et de chymosine B de MAXIREN (◆) sont additionnés à 100 µl d'une solution d'acétate de sodium 200 mM, pH 5,4 contenant 10 mM de $CaCl_2$ et 0,5% (p/v) de lait écrémé. La coagulation du lait est alors suivie à 30°C et à 550 nm (changement de turbidité de la solution) à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques.
Le temps T (en seconde) nécessaire pour atteindre une absorbance (A_{550nm}) de 0,2 est déterminé. La droite de l'inverse du temps T (1/T) en fonction de la quantité de protéine est alors tracée.

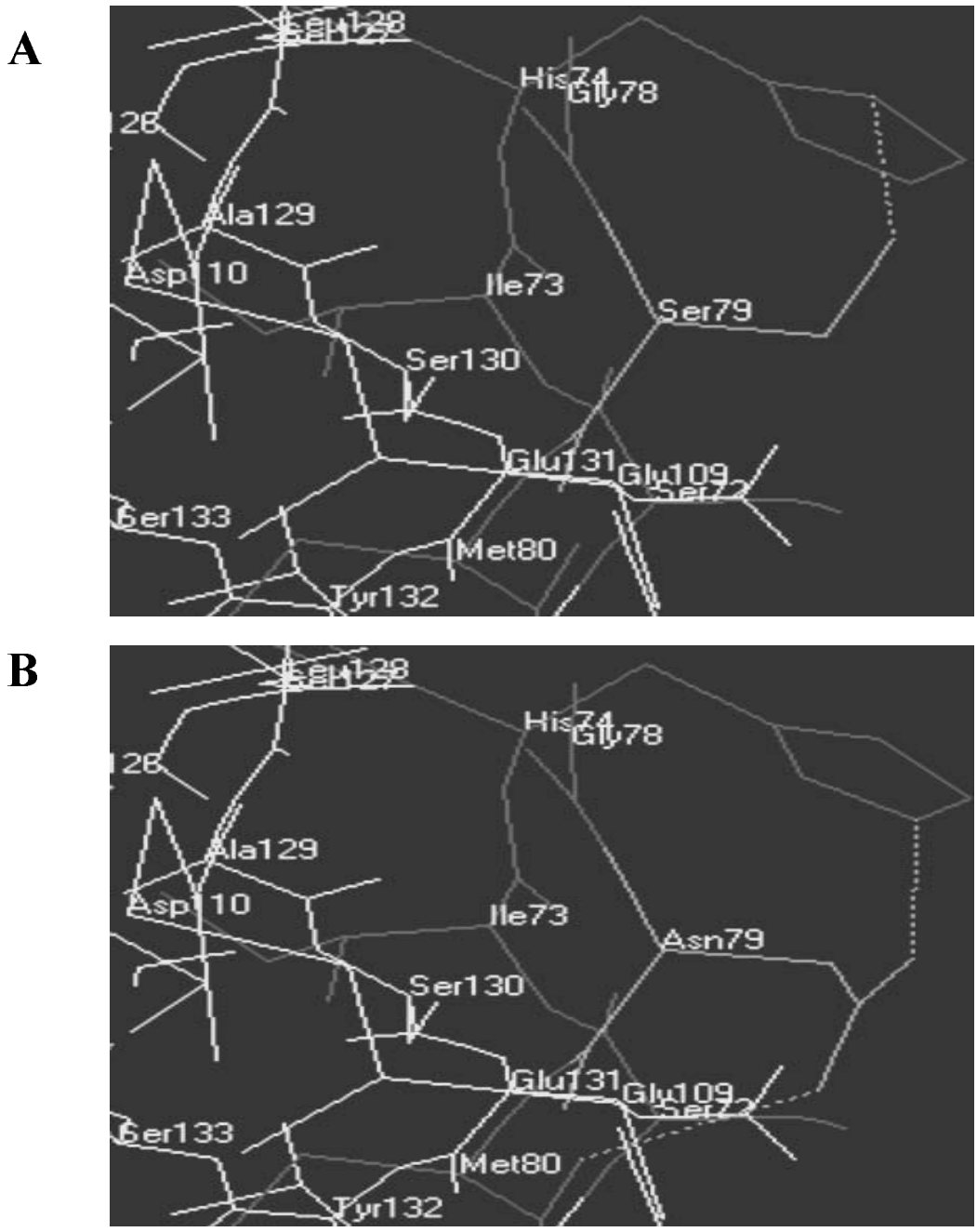
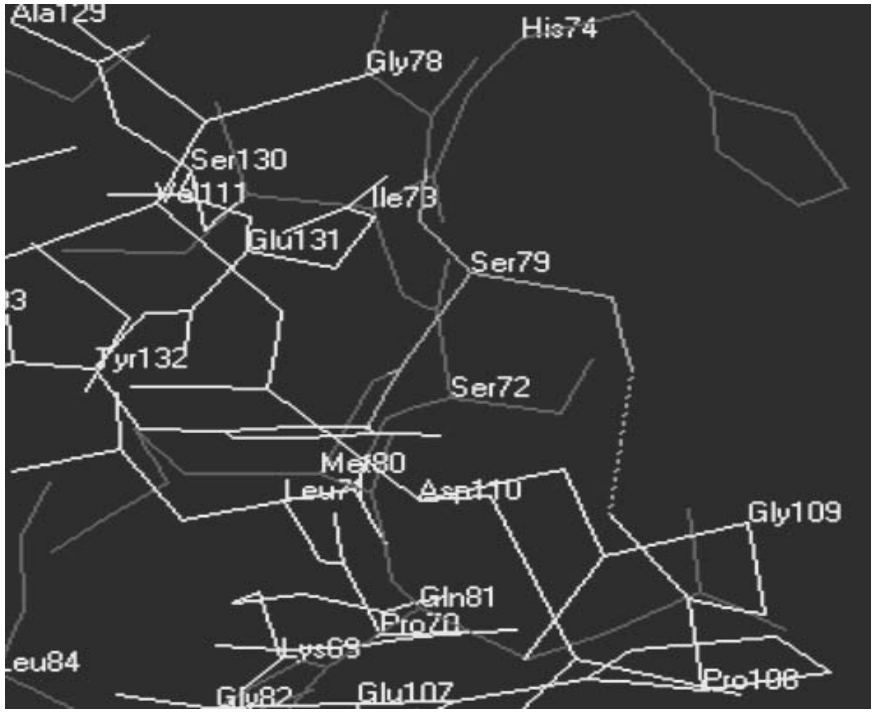


Figure III.42: Etude de la mutation S79N utilisant le programme Swiss-Pdb Viewer chez la chymosine "libre" (4CMS).

(A) Détail de la région entourant la S79 de la chymosine. Les liaisons H dues à la S79 sont indiquées par des pointillés.
(B) Détail de la région entourant la N79 chez la chymosine S79N. Les liaisons H potentielles dues à N79 sont indiquées par des pointillés.

A



B

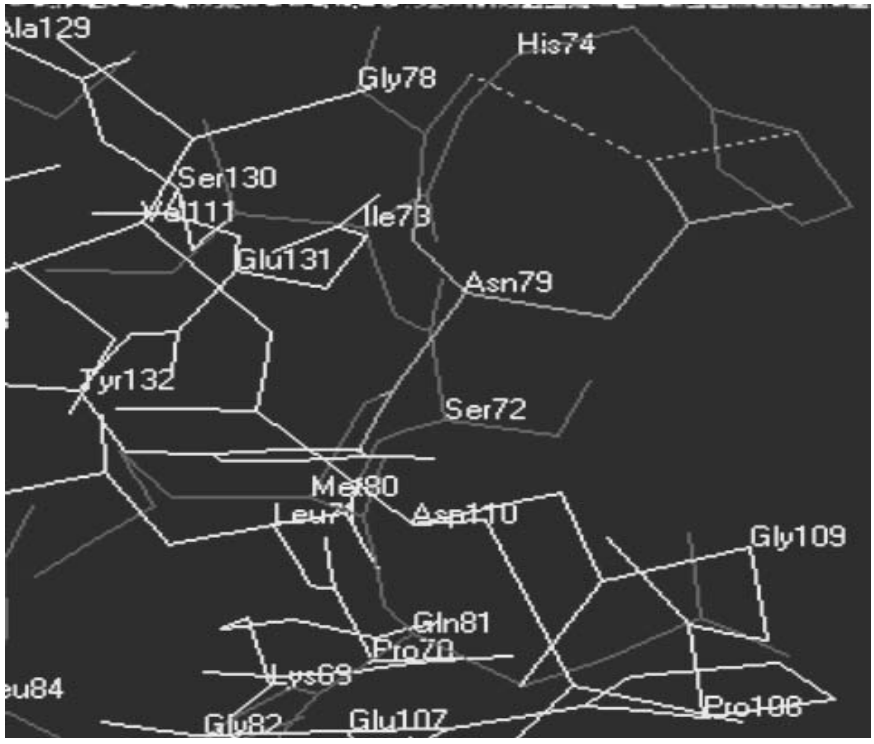


Figure III.43: Etude de la mutation S79N utilisant le programme Swiss-Pdb Viewer chez le complexe chymosine/inhibiteur (1CZI).

(A) Détail de la région entourant la S79 de la chymosine. Les liaisons H dues à la S79 sont indiquées par des pointillés.
(B) Détail de la région entourant la N79 chez la chymosine S79N. Les liaisons H potentielles dues à N79 sont indiquées par des pointillés.

présent la structure tridimensionnelle du complexe chymosine/inhibiteur pour laquelle la position du tampon est différente comparée à celle de la chymosine « libre », nous observons qu´il existe une liaison hydrogène entre le groupement OG de la sérine 79 avec l´O du résidu proline 108. Si nous mutons de la même manière la sérine 79 en une asparagine dans cette même position, nous observons deux liaisons hydrogène, qui se trouvent dans les deux cas entre l´atome ND2 de l´asparagine 79 et l´atome ND1 de l´histidine 74 et l´O de la glycine 78. Il est difficile d´avoir une idée de l´influence des modifications apportées par la mutation S79N sur la conformation du tampon et/ou sur l´activité de l´enzyme. Pour tenter de répondre à cette question, nous allons à présent discuter les données expérimentales concernant les cinétiques sur différents substrats par rapport aux observations des modélisations réalisées.

II.5.4. Discussion

L´activité enzymatique semble donc dépendre de la taille du substrat employé. Avec l´hexapeptide, nous avons observé une différence de plus de 6 fois entre les efficacités catalytiques de la chymosine B mutante et de la chymosine B. Quand la caséine κ seule en solution ou présente dans le lait est utilisée, la mutation S79N n´entraîne qu´une petite augmentation de la constante d´efficacité chez la chymosine B. Ainsi, cette différence d´activité enzymatique entre la chymosine B mutante et la chymosine B sauvage observée avec l´hexapeptide pourrait être une conséquence de la position du tampon par rapport à la molécule de chymosine. En effet, le peptide utilisé dans notre étude est de petite taille, capable donc de s´insérer dans le sillon du site actif avec un nombre limité d´interactions entre le substrat et l´enzyme. Au contraire, pour la caséine κ, qui est un substrat de grande taille (169 acides aminés), la situation est autre. L´accès du substrat au sillon du site actif dépend de nombreuses interactions enzyme/substrat, ce qui pourrait alors masquer l´effet « direct » de la mutation S79N du tampon. Toutefois, comme nous venons de le voir, la durée des phases de latence lors de l´hydrolyse de la caséine κ en solution pourrait être en relation avec la conformation du tampon de la chymosine B S79N. Cette mutation entraîne, comme nous l´avons déjà vu, des modifications dans les liaisons hydrogène du résidu 79 avec d´autres résidus du tampon. La question que nous soulevons ici est de savoir si la position du tampon s´en trouve modifiée. Selon ANDREEVA *et al.* (1992), c´est avec le résidu histidine 74 que le résidu S79 possède une liaison hydrogène. Or, selon ces auteurs, l´H74 influencerait la conformation du tampon de la chymosine bovine. Dans le cas d´une asparagine dans la

position 79, il existerait deux liaisons hydrogène dont l´une serait toujours entre les positions 79 et 74. Cette liaison hydrogène, même si différente, serait donc maintenue. Il est ainsi probable que l´existence d´une deuxième liaison hydrogène qui se situerait entre l´atome N de la chaîne latérale de l´asparagine 79 et l´ O de la méthionine 80 influencerait la conformation du tampon. Quelle serait alors la conformation adoptée ? Notre étude ne nous permet malheureusement pas de répondre à ces différentes questions. Il serait intéressant de réaliser une étude cristallographique de la chymosine B S79N afin de pouvoir observer la conformation du tampon dans la molécule d´enzyme.

Cette étude nous a également permis de comparer les activités enzymatiques de la chymosine A et de la chymosine B. Si nous observons les données cinétiques avec les différents substrats utilisés, nous pouvons affirmer que la chymosine A est plus active que la chymosine B. Pour expliquer ce résultat, nous nous sommes intéressés plus en détails à la différence qui existe entre ces deux enzymes. Chez la chymosine B, il existe une région chargée négativement située au bord du sillon du site actif composée des résidus Glu244 et Asp246. D´autres résidus chargés négativement Asp248 et Asp250 se trouvent à proximité. La caséine κ, substrat naturel de la chymosine, possède quant à elle des résidus chargés positivement entre les positions 97 et 102 (Arg-His-Pro-His-Pro-His) qui sont proches de la liaison peptidique Phe_{105}-Met_{106}. Il est donc probable que cette région chargée négativement chez la chymosine soit impliquée dans des interactions électrostatiques avec la caséine κ. Quant à la chymosine A, elle possède dans la position 243 un acide aspartique au lieu d´une glycine, augmentant donc la charge négative de cette région d´intérêt. Dans ce cas, les interactions électrostatiques entre l´enzyme et le substrat sont plus fortes ce qui conduit à une augmentation de l´efficacité catalytique de la chymosine A comparée à la chymosine B (NEWMAN *et al.*, 1991).

III.6. Thermostabilité

Enfin, nous avons cherché à comparer la thermostabilité des différentes chymosines purifiées à 40°C et à 50°C (**figure III.44**). Lors des tests d´activité sur le lait, nous cherchons toujours à obtenir un temps de coagulation d´environ 10 min pour introduire le moins d´erreur possible. Par exemple, si la coagulation est trop rapide, le risque de sous-estimer la quantité d´unités d´activité est élevé. Ainsi, nous diluons l´enzyme jusqu´à obtenir un temps de coagulation d´environ 10 min. C´est pourquoi les quantités d´enzymes utilisées pour ce test de

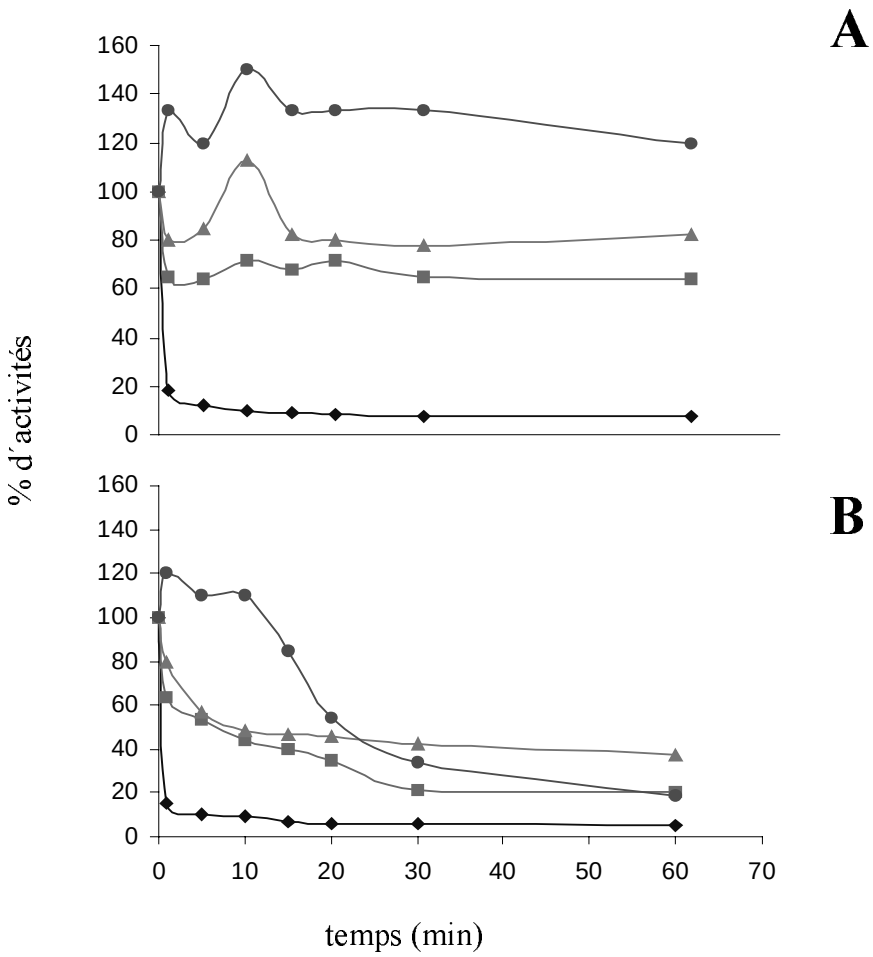


Figure III.44: Thermostabilité des différentes chymosines à 40°C (A) et à 50°C (B).
Les échantillons (10µl) contenant 0,041 µg de chymosine A (●), 0,14 µg de chymosine B (▲), 0,0742 µg de chymosine B S79N (■) et 0,0232 µg de chymosine B de MAXIREN (◆) sont placés à 40°C et à 50°C pendant 1, 5, 10, 15, 20, 30 et 60 min. Les échantillons sont alors placés dans un bain de glace pendant 5 min avant de tester leur activité de coagulation du lait à 37°C comme décrit dans le chapitre II.9.2. du matériels et méthodes.

100% d´activité correspondent à 1,67 U pour la chymosine A, 1,25 U pour la chymosine B, 0,9 U pour la chymosine B S79N et 1,1 U pour la chymosine B de MAXIREN.

thermostabilité sont différentes pour chaque chymosine. Il faudra évidemment en tenir compte lors de l´analyse des résultats.

Nous pouvons observer que la chymosine B de Maxiren perd très rapidement son activité à 40°C comme à 50°C. Quant à la chymosine A, celle-ci se montre plus stable que les chymosines B aux deux températures testées. Elle voit son activité augmenter à 40°C. A 50°C, l´activité de la chymosine A augmente pendant les dix premières minutes puis diminue alors. L´augmentation de l´activité de la chymosine A à 40°C et à 50°C peut s´expliquer par un changement de conformation de l´enzyme sous l´effet de la température. Ainsi, comme nous l´avons mentionné à plusieures reprises dans ce manuscrit, la chymosine existerait sous deux formes en solution, une forme active et une forme « auto-inhibée » (ANDREEVA *et al.*, 1992). Nous pouvons penser que la conformation du tampon chez l´enzyme « auto-inhibée » change sous l´effet de la température, libérant alors l´accès au site actif.

Si nous nous intéressons à présent à la chymosine B, celle-ci se maintient à 80% de son activité à 40°C et voit son activité diminuer à 50°C dès la première minute. Le comportement de la chymosine B S79N ressemble à celui de la chymosine B, même si elle présente toujours une activité légèrement inférieure. En effet, la chymosine B S79N se maintient à environ 70% de son activité à 40 °C et voit également son activité diminuer à 50°C dès la première minute. Cette petite différence entre la chymosine B S79N et la chymosine B peut s´expliquer par le fait que nous avons utilisé le double de quantité d´enzyme pour la chymosine B lors des tests. Ainsi, la chymosine B et la chymosine B S79N semblent présenter la même thermostabilité.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons cloné les séquences codant des variants de la préprochymosine A et de la préprochymosine B bovines. L'entreprise à l'origine intéressée du travail de production de chymosine bovine recombinante, ayant abandonné le projet en cours de route, nous avons focalisé notre étude sur l´analyse des effets des mutations observées dans les séquences que nous avons clonées sur l'activité de la chymosine.

Nous avons observé deux mutations dans la partie du propreptide de la préprochymosine A : G9pS et S11pP (numérotation selon la séquence de propeptide du pepsinogène A porcin ; RICHTER *et al.*, 1998). L'alignement des séquences en acides aminés de propeptides de différentes protéases à acide aspartique nous a permis de montrer que certains résidus sont conservés dans toutes les séquences étudiées, notamment la sérine dans la position 11. C'est cette sérine qui est remplacée par une proline dans le clone de la préprochymosine A. Quant à la préprochymosine B, nous avons observé une mutation dans la position 79 dans la partie matûre de la protéine. Ce mutant de chymosine B S79N (numérotation selon la séquence de la pepsine) a retenu notre attention car le résidu 79 se situe dans la partie du tampon (résidus 72 à 86) qui constitue une anse externe mobile qui couvre le sillon du site actif (SUZUKI *et al.*, 1989). Ce tampon est trouvé chez les protéases à acide aspartique et plus particulièrement chez la chymosine bovine. Selon certains auteurs (ANDREEVA *et al.*, 1992), la conformation du tampon de la chymosine est caractéristique de l´enzyme et serait en partie responsable pour sa grande spécificité. Nous avons modélisé la mutation S79N, qui semble entraîner des changements dans le réseau de liaisons hydrogène du tampon. Afin d´étudier l'effet de la mutation S79N, nous avons construit la séquence codant la met-prochymosine B sauvage à partir des séquences de la met-prochymosine A et met-prochymosine B S79N.

Dans un premier temps, nous avons cloné les séquences codant la préprochymosine A et la préprochymosine B S79N dans le vecteur d´expression pGEX-4T-3 chez *E. coli*. Nous avons pu vérifier l´expression d´une protéine de fusion (GST/préprochymosine) sous une forme insoluble, à l´aide des analyses par SDS PAGE et Western-blot utilisant les anticorps dirigés spécifiquement contre la GST. Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer si les protéines recombinantes obtenues étaient actives ou non. Nous avons alors choisi de cloner les séquences codant la met-prochymosine A, la met-prochymosine B S79N et la met-prochymosine B sauvage dans un deuxième système d'expression, le pTIamy, chez *E. coli*. Nous avons observé, à l´aide des analyses par Western-blot utilisant les anticorps spécifiques contre la chymosine et à l´aide des tests d´activation/activité, l´expression de la prochymosine sous une forme insoluble. Nous avons ainsi montré que les différentes chymosines mutées et

sauvage étaient actives. Enfin, nous avons cloné les trois séquences codantes dans le système d´expression de *P. pastoris*. Nous avons alors pu observer l´expression et la sécrétion de la prochymosine sous une forme soluble. Les tests d´activation / activité nous ont permis de montrer que la chymosine A, la chymosine B et la chymosine B S79N obtenues présentaient une activité de coagulation du lait.

Nous avons alors purifié les différentes chymosines à l'homogénéité électrophorétique puis nous avons étudié leurs propriétés cinétiques sur différents substrats : le peptide synthétique Leu-Ser-Phe(NO_2)-Nle-Ala-Leu-OMe, la caséine κ et le lait. La chymosine A présente des propriétés cinétiques supérieures aux chymosines B, quelque soit le substrat étudié. La chymosine B S79N voit ses propriétés cinétiques améliorées avec l´hexapeptide synthétique. La mutation S79N n´entraîne toutefois qu´une petite augmentation de la constante d´efficacité concernant les hydrolyses de la caséine κ et du lait. Le fait que l´activité enzymatique du mutant S79N soit surtout améliorée avec des substrats de faible masse moléculaire confirme le rôle du tampon dans la spécificité de l'enzyme. Cependant, le tampon ne semble pas être le seul acteur de la spécificité de l'enzyme puisque les différences des propriétés cinétiques entre enzyme sauvage et enzyme mutante s'estompent quand la taille du substrat augmente.

Afin de mieux comprendre l'effet de cette mutation, il sera intéressant d'utiliser des substrats de taille intermédiaire entre l´hexapeptide et la caséine κ. On pourra ainsi utiliser l´octapeptide Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Phe(4-NO_2)-Arg-Leu-OH (SUSUKI *et al.*, 1989). Une autre approche pourra consister à étudier les peptides obtenus par hydrolyse de différentes protéines modèles par la chymosine B sauvage et chymosine B mutante S79N en utilisant les techniques d´électrophorèse capillaire. Parmi les substrats modèles, nous pourrons utiliser la caséine κ ou encore la caséine β. Finalement, la cristallisation de la chymosine B mutante S79N permettra peut être de déterminer la conformation du tampon. Cependant, cette région est souvent désordonnée et donc difficilement accessible pour pouvoir déterminer sa conformation correcte.

Notre intérêt à établir un procédé de production de chymosine bovine recombinante existe cependant toujours. Une des possibilités est de continuer à utiliser *P. pastoris* comme système d´expression pour une production industrielle avec l´accord d´Invitrogen. Il serait alors nécessaire d´optimiser la production, notamment en utilisant la culture en fermenteurs, et en utilisant des systèmes permettant l'insertion multiple de séquences codantes dans le

génome de *P. pastoris*. Une autre possibilité est de sélectionner un ou des systèmes d´expression développés par des laboratoires brésiliens dans le cadre de projets de recherche visant à explorer la Biodiversité de ce pays.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREEVA N., DILL J., GILLIGAND G.L., 1992. Can enzymes adopt a self-inhibited form ? Results of X-ray crystallographic studies of chymosin. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **184**, 1074-1081.

ANDREN A., BJORCK L., CLAESSON O., 1982. Immunohistochemical studies on the development of prochymosin- and pepsinogen-containing cells in bovine abomasal mucosa Milk-fed calves. *J. Physiol.*, **327**, 247-254.

ANUPAMA, RAVINDRA P., 2000. Value-added food : Single cell protein. *Biotechnol. Adv.*, **18**, 459-479.

ARIMA K., IWASAKI S., TAMURA G., 1967. Milk clotting enzyme from microorganisms. Part I. Screening test and the identification of the potent fungus. *Agr.Biol.Chem.*, **31**, 540-545.

ARIMA K., YU J., IWASAKI S., TAMURA G., 1968. Milk clotting enzyme from microorganisms V. Purification and crystallisation of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* var. *Lindt. Appl. Microbiol.*, **16**, 1727-1733.

AUSTIN A.J., JONES C.E., VAN HEEKE G., 1998. Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expres. Purif.*, **13**, 136-142.

BARBANO D.M., RASMUSSEN R.R., 1992. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1-12.

BARRETT A.J., 1986. An introduction to the proteinases. BARRETT A.J. et SALVESSEN G. *Proteinase Inhibitors*, (1), 3-22.

BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., 1995. Perspectives in Biochemistry and Biophysics. Families and Clans of Serine Peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 247-250.

BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., WOESSNER J.F., 1998. Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, Londres, 1666p.

BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., O´BRIEN E.A., 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.*, **134**, 95-102.

BARROS E.V.S.A., BATAUS L.A.M., VALENCIA F.F., MARANHÃO A.Q., ASTOLFI-FILHO S., 1996. A novel cloning system for direct screening using a suicidal strategy. *Gene*, **179**, 287-289.

BERRIDGE N.J., 1945. The purification and crystallization of rennin. *Biochem. J.*, **39**, 179-186.

BINES V.E., YOUNG P., LAW B.A., 1989. Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. Dairy Res.*, **56**, 657-664.

BIRNBOIM H.C., DOLY J.A., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.

BROOME M.C., HICKEY M.W., 1990. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, **45**, 53-59.

BUNN C.W., MOEWS P.C., BAUMBER M.E., 1971. The crystallography of calf rennin (chymosin). *Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B*, **178**, 245-258.

BURNETTE W.N., 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203.

CEREGHINO J.L., CREGG J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 45-66.

CEREGHINO G.P.L, CEREGHINO J.L., ILGEN C., CREGG J.M., 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. in Biotech.*, **13**, 329-332.

CHITPINITYOL S., GOODE D., CRABBE M.J.C., 1998. Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity. *Food Chem.*, **62**, 133-139.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

CREGG J.M., BARRINGER K.J., HESSLER A.Y., MADDEN K.R., 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3376-3385.

CREGG J.M., MADDEN K.R., BARRINGER K.J., THILL G.P., STILLMAN C.A., 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1316-1323.

CREGG J.M., VEDVICK T.S., RASCHKE W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio-Technol.*, **11**, 369-376

CREGG J.M., CEREGHINO J.L., SHI J., HIGGINS D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, **16**, 23-52.

CULLEN D., GRAY G.L., WILSON L.J., HAYENGA K.J., LAMSA M.H., REY M.W., NORTON S., BERKA R.M., 1987. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio-Technol.*, **5**, 369-376.

DAHLBÄCK B., 2000. Blood coagulation. *Lancet*, **355**, 1627-1632.

DAHLMANN B., KOPP F., KUEHN L., NIEDEL B., PFEIFER G., HEGERL R., BAUMEISTER W., 1989. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett.*, **251**, 125-131.

DANLEY D.E., GEOGHEGAN K.F., 1988. Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9785-9789.

DAVIS J.G., 1965. Rennet (I): Preparation and Properties. Dans : Cheese, Vol1. Basic Technology (J.& A. Churchill Ltd, Ed), Londres, 244-261.

DUNN S.D., 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, **157**, 144-153.

DUNN-COLEMAN N.S., BLOEBAUM P., BERKA R.M., BODIE E., ROBINSON N., ARMSTRONG G., WARD M., PRZETAK M., GARTER G. L., LACOST R., WILSON L.J., KODAMA K.H., BALIU E.F., BOWER B., LAMSA M., HEINSOHN H., 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio-Technol.*, **9**, 976-981.

EMTAGE J.S., ANGAL S., DOEL M.T., HARRIS T.J.R., JENKINS B., LILLEY G., LOWE P.A., 1983. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 3671-3675.

ESPINOSA A.E.S., PENA J.S., SANTANA V.M., FERNANDEZ R.G., GRILLO J.M., 1999. Comparison of bovine chymosin secreted to the culture medium by recombinant strains of the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Biotecnol. Aplic.*, **16**, 160-164.

FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., JACOBSEN H., KAUFFMAN D., WYBRANDT G., 1977. The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 2321-2324.

FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., KAUFFMAN D., WYBRANDT G., 1979. The primary structure of calf chymosin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8447-8456.

FOUNDLING S.I., COOPER J., WATSON F.E., CLEASBY A., PEARL L.H., SIBANDA B.L., HEMMINGS A., WOOD S.P., BLUNDELL T.L., VALLER M.J., NOREY C.G., KAY J., BOGER J., DUNN B.M., LECKIE B.J., JONES D.M., ATRASH B., HALLETT A., SZELKE M., 1987. High resolution X-ray analyses of renin inhibitor-aspartic proteinase complexes. *Nature*, **327**, 349-352.

FRANKE A.E., KACZMAREK F.S., EISENHARD M.E., GEOGHEGAN K.F., DANLEY D.E., DE ZEEUW J.R., O'DONNELL M.M., GOLLAHER M.G. Jr., DAVIDOW L.S., 1988. Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev. Ind. Microbiol.*, **29**, 43-57.

FUKUMOTO J., TSURU D., YAMAMOTO T., 1967. A rennin-like enzyme from *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710-717.

GARNOT P., TOULLEC R., THAPON J.L., MARTIN P., HOANG M.T., MATHIEU C.-M., RIBADEAU DUMAS B., 1977. Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion. *J. Dairy Res.*, **44**, 9-23.

GELLISSEN G., 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biot.*, **54**, 741-750.

GILLIGAND G.L., WINBORNE E.L., NACHMAN J., WLODAWER A., 1990. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins*, **8**, 82-101.

GOFF C.G., MOIR D.T., KOHNO T., GRAVIUS T.C., SMITH R.A., YAMASAKI E., TAUNTON-RIGBY A., 1984. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **27**, 35-46.

GROVES M.R., DHANARAJ V., BADASSO M., NUGENT P., PITTS J.E., HOOVER D.J., BLUNDELL T.L., 1998. A 2.3 Å resolution structure of chymosin complexed with a reduced bond inhibitor shows that the active site β-hairpin flap is rearranged when compared with the native crystal structure. *Protein Eng.*, **11**, 833-840.

GUSTCHINA E., RUMSH L., GINODMAN L., MAJER P., ANDREEVA N., 1996. Post X-ray crystallographic studies of chymosin : the existence of two structural forms and the regulation of activity by the interaction with the histidine-proline cluster of k-casein. *FEBS Lett.*, **379**, 60-62.

GUSTCHINA E., LI M., PHYLIP L.H., LEES W.E., KAY J., WLODAWER A., 2002. An unusual orientation for Tyr75 in the active site of the aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **295**, 1020-1026.

HARKKI A., UUSITALO J., BAILEY M., PENTILLA M., KNOWLES J.K.C., 1989. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio-Technol.*, **7**, 596-600.

HARRIS T.J., LOWE P.A., LYONS A., THOMAS P.G., EATON M.A., MILLICAN T.A., PATEL T.P., BOSE C.C., CAREY N.H., DOEL M.T., 1982. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2177-2187.

HIDAKA M., SASAKI K., UOZUMI T., BEPPU T., 1986. Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene*, **43**, 197-203.

HOFMANN T., SHAW R., 1964. Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. I. Purification and properties of a trypsinogen-activating enzyme (peptidase A). *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 543-557.

JAMES M.N.G., SIELECKI A., SALITURO F., RICH D.H., HOFMAN T., 1982. Conformational flexibility in the active sitres of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 6137-6141.

KASHPAROV I.V., RUSS A.V., ANDREEVA N.S., 2002. Molecular dynamics analysis of chymosin in solution and in a crystalline environment. *Mol. Biol.*, **36**, 754-759.

KLESSEN C., SCHMIDT K.H., GUMPERT J., GROSSE H.H., MALKE H., 1989. Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Appl. Environ. Microb.*, **55**, 1009-1015.

KOLMER M., ORD T., ULMANEN I., 1991. Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, **20**, 131-140.

KOTEWICZ M.L., SAMPSON C.M., ALESSIO J.M.D., GERARD G.F., 1988. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 265-277.

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of estructural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature,* **227**, 680-685.

LAROCHE Y., STORME V., DE MEUTTER J., MESSENS J., LAUWEREYS M., 1994. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio-Technol.,* **12**, 1119-1124.

LEROY C., 1997. Les nouvelles fonctions des enzymes et des ferments. *RIA*, **567**, 32-36.

MACEDO I.M.Q, FARO C.J.F., PIRES E.M.V., 1993. Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ-casein. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, 1537-1540.

MARKARYAN A., MOROZOVA I., LEE B.S., KAPLAN A., 1999. Atypical processing of amyloid precursor fusion protein by proteolytic activity in *Pichia pastoris*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **262**, 263-268.

McGUIRE J., 1986. Cloning, expression, purification and testing of chymosin. *Bio-expo-86 Proceedings*, 121-141.

MARCHUK D., DRUMM M., SAULINO A., COLLINS F.S., 1990. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1154.

MARSTON F.A.O., LOWE P.A., DOEL M.T., SCHOEMAKER J.M., WHITE S., ANGAL S., 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio-Technol.,* **2**, 800-804.

MARTIN P., RAYMOND M.N., BRICAS E., RIBADEAU DUMAS B. (1980) Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor Miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochim. Biophys. Acta,* **612**, 410-420.

MELLOR J., DOBSON M.J., ROBERTS N.A., TUITE M.F., EMTAGE J.S., WHITE S., LOWE P.A., PATEL T., KINGSMAN A.J., KINGSMAN S.M., 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene,* **24**, 1-14.

MISTRY A.R., FALCIONA L., MONACO L., TAGLIABUE R., ACERBIS G., KNIGHT A, HARBOTTLE R.P., SORIA M., BIANCHI M.E., COUTELLE C., HART S.L., 1997. Recombinant HMG1 protein produced in *Pichia pastoris* : a nonviral gene delivery agent. *Biotechniques*, **22**, 718-729.

MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY S., GROVER S., BATISH V.K., 1999. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.*, **17**, 205-217.

MOIR D., MAO J.i, SCHUMM J.W., VOVIS G.F., ALFORD B.L., TAUNTON-RIGBY A., 1982. Molecular cloning and characterization of double-stranded cDNA coding for bovine chymosin. *Gene*, **19**, 127-138.

NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry), 1992. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and classification of enzymes. San Diego: Academic Press, Inc., 862p.

NEURATH H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, **224**, 350-357.

NEWMAN M., SAFRO M., FRAZAO C., KHAN G., ZDANOV A., TICKLE I.J., BLUNDELL T.L., ANDREEVA N., 1991. X-ray analyses of aspartic proteinases IV-Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J. Mol. Biol.*, **221**, 1295-1309.

NICHOLSON B.H., JONES P., 1984. Isolation and in vitro translation of mRNA from the calf abomasal mucosa and identification of an mRNA coding for a precursor of prochymosin. *J. Dairy Res.*, **51**, 79-89.

NISHIMORI K., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1982. Expression of cloned prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*. *Gene*, **19**, 337-344.

NISHIMORI K., SHIMIZU, N., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1984. Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene,* **29**, 41-49.

NUGENT P.G., ALBERT A., ORPRAYOON P., WILSHER J., PITTS J.E., BLUNDELL T.L., DHANARAJ V., 1996. Protein engineering loops in aspartic proteinases: site-directed mutagenesis, biochemical characterization and X-ray analysis of chymosin with a replaced loop from rhizopuspepsin. *Protein Eng.*, **9**, 885-893.

ORLOWSKI M., WILK S., 2000. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, 1-16.

PARENTE D., DE FERRA F., GALLI G., GRANDI, G., 1991. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.,* **77**, 243-250.

RAWLINGS N.D., BARRETT A.J., 1994. Families of cysteine peptidases. *Method Enzymol.*, **244**, 461-486.

RAWLINGS N.D., BARRETT A.J., 1999. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 325-331.

RAYMOND M.N., BRICAS E., SALESSE R., GARNIER J., GARNOT P., RIBADEAU DUMAS B., 1973. A proteolytic unit fot chymosin (rennin) activity based on a reference synthetic peptide. *J. Dairy Sci.*, **56**, 419-422.

RICHTER C., TANAKA T., YADA R.Y., 1998. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.*, **335**, 481-490.

ROTHE G.A.L, AXELSEN N.H., JOHNK P., FOLTMANN B., 1976. Immunochemical, chromatographic, and milk-clotting activity measurements for quantification of milk-clotting enzymes in bovine rennets. *J. Dairy Res.*, **43**, 85-95.

SALESSE R., GARNIER J., 1976. Synthetic peptides for chymosin and pepsin assays : pH effect and pepsin independent-determination in mixtures. *J. Dairy Sci.*, **59**, 1215-1221.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467.

SARDINAS J.L., 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.*, **16**, 248-253.

SCHECHTER I., BERGER A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **27**, 157-162.

STEPANOV V.M., LAVRENOVA G.I., TERENT'EVA E.Y., KHODOVA O.M., 1990. Prochymosin activation by non-aspartic proteinases. *FEB*, **260**, 173-175.

STERNBERG M., 1971. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.*, **54**, 159-167.

STERNBERG M., 1976. Microbial rennets. *Adv. Appl. Microbiol.*, **20**, 135-157.

STREBEL K., BECK E., STROHMAIER K., SHALLER H., 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.*, **57**, 983-991.

STROP P., SEDLACEK J., STYS J., KADERABKOVA Z., BLAHA I., PAVLICKOVA L., POHL J., FABRY M., KOSTKA V., NEWMAN M., FRAZAO C., SHEARER A., TICKLE I.J., BLUNDELL T.L., 1990. Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization and X-ray analysis at 2.0-Å resolution of Val111Phe site-mutated calf chymosin. *Biochemistry*, **29**, 9863-9871.

SUGUNA K., PADLAN E.A., SMITH C.W., CARLSON W.D., DAVIES D.R., 1987. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7009-7013.

SUSUKI J., SASAKI K., SASAO Y., HAMU A., KAWASAKI H., NISHIYAMA M., HORINOUCHI S., BEPPU T., 1989. Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis. *Protein Eng.*, **2**, 563-569.

TANG J., JAMES M.N.G., HSU I.N., JENKINS J.A., BLUNDELL T.L., 1978. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature*, **271**, 618-621.

TANG J., KOELSCH G., 1995. A possible function of the flaps of aspartic proteases : the capture of substrate side chains determines the specificity of cleavage positions. *Protein Peptide Lett.*, **2**, 257-266.

TEUBER M., 1990. Production of chymosin by microorganisms and its use for cheesemaking. *Bull. IDF*, **251**, 3-15

THILL G.P., DAVIES G.R., STILLMAN C., HOLTZ G., BRIERLEY R., ENGEL M., BUCKHOLTZ R., KINNEY J., PROVOW S., VEDVICK T., SIEGEL R.S., 1990. Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms (Heslot H., Davies J., Florent J., Bobichon L., Durand G., Penasse L., Eds) Société Française de Microbiologie, Paris, **2**, 477-490.

TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354.

TSUCHIYA K., GOMI K., KITAMOTO K., KUMAGAI C., TAMURA G., 1993. Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biot.*, **40**, 327-332.

UCHIYAMA H., UOZUMI T., BEPPU T., ARIMA K., 1980. Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1373-1381.

UUSITALO J.M., NEVALAINEN K.M.H., HARKKI A.M., KNOWLES J.K.C., PENTTILA M.E., 1991. Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *J. Biotechnol.*, **17**, 35-50.

VAN DEN BERG J.A., VAN DER LAKEN K.J., VAN OOYEN A.J.J., RENNIERS T.C.H.M., RIETVELD K., SCHAAP A., BRAKE A.J., BISHOP R.J., SCHULTZ K., MOYER D., RICHMAN M., SHUSTER J.F., 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio-Technol.*, **8**, 135-139.

VASSILEVA A., CHUGH D.A., SWAMINATHAN S., KHANNA N., 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expres. Purif.*, **21**, 71-80.

VERISSIMO P.C., ESTEVES C.L.C., FARO C.J.F., PIRES E.M.V, 1995. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Lett.*, **17**, 621-626.

VILLATTE F., HUSSEIN A.S., BACHMANN T.T., SCHMID R.D., 2001. Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *App. Microbiol. Biot.*, **55**, 463-465.

WARD M., WILSON L.J., KODAMA K.H., REY M.W., BERKA R.M., 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio-Technol.*, **8**, 435-440.

YAMASHITA T., HIGASHI S., HIGASHI T., MACHIDA H., IWASAKI S., NISHIYAMA M., BEPPU T., 1994. Mutation of a fungal aspartic proteinase, *Mucor pusillus* rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant. *J. Biotechnol.*, **32**, 17-28.

YONG V., MARGOLLES E., MORALES J., SOSA A.E., MARTINEZ V., HERRERA L., 1991. Method for the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*, expression vectors and transformed microorganisms. *European Patent Application* NE91200074.2.

YOSHIMASU M.A., AHN J.K., TANAKA T., YADA R.Y., 2002. Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris*. *Protein Expres. Purif.*, **25**, 229-236.

ZINOVIEVA N., MULLER M., BREM G., 2002. Short communication: Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. *J. Dairy Sci.*, **85**, 3476-3479.

