

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République algérienne démocratique et populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب  
Université de Ain Temouchent Belhadj Bouchaib  
Faculté des Sciences et de Technologie  
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes  
Pour l'obtention du diplôme de Master en: Biochimie  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie  
Thème

**Caractérisation *in silico* des cutinases de *Pseudomonas putida***

**Présenté Par :**

- 1) Mlle. BOUGUIR Safa
- 2) Mlle. MEDRAOUI Amel

**Devant le jury composé de :**

Dr. AMARA Mohamed	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. BENHABIB Ouassila	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinateur
Dr. BAKLI Mahfoud	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

*Année Universitaire 2021/2022*

# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier notre clément DIEU de nous avoir accompagnées durant notre parcours et aider à arriver à cette étape.

Qu'il nous soit dans cette prestigieuse occasion l'honneur d'adresser nos sincères remerciements à tous enseignants et enseignantes qui nous ont formé, nous ont aidé, étaient présent pour nous et suivi nos pas pour arriver à cette étape, à ceux-là nous sommes profondément reconnaissantes.

Nous adressons toutes nos gratitude à notre encadreur **M. BAKLI Mahfoud**, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion, malgré ses lourdes et bien nombreuses charges.

Nous remercions les membres de jury **M. AMARA Mohamed, Mme. BENHABIB Ouassila** et **M. BAKLI Mahfoud** d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Enfin, nous remercions toutes les personnes, de proche ou de loin, pour leurs soutiens, conseils ainsi que leur disponibilité, de nous apporter le support moral et intellectuel à la réalisation de ce modeste mémoire de fin d'étude de Master de Biochimie tout au long de notre démarche.



## *Dédicace*

*Je remercie Dieu, qui je sens toujours est à côté de moi*

*Je dédie ce travail à mes parents, à moi-même, à Mme.*

*Zerriouh, à mes grands pères*

*Zineb et Mohamed et à tous ceux qui se tenaient à mes côtés.*

*Mlle. BOUGUIR Safa*





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail avec l'amour et le respect à :*

*Mon cher père et ma chère mère, les parents les plus gentils de terre, qui ont éclairé mon chemin, qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de mes études.*

*À mes grands-mères : Zainab et Khaira*

*À mon fiancé : Abdel Rezek qui est été toujours à mon côté pour m'aider, soutenu et encourager.*

*Je remercie également M. Mahfoud Bakli*

*À Tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Mlle. MEDRAOUI Amel*



## Tableau des matières

Listes des figures.....	9
Liste Des Tableaux.....	12
Liste des abréviations.....	13
Introduction.....	14

### Revue bibliographique

<b>1. Les cutinases</b> .....	16
1.1. Structure de la cuticule .....	16
1.2. Structure de la cutine .....	17
1.3. Biosynthèse de la cutine .....	19
1.4. Interactions plante-pathogène .....	19
1.5. Fonctions biologiques de la cutine .....	20
1.5.1. Barrière d'eau .....	20
1.5.2. Organogenèse et contribution biomécanique .....	21
1.5.3. Barrière pathogène .....	22
1.6. Cutinases et leur identification .....	22
1.7. Structure de la cutinase .....	23
1.8. Propriétés enzymatiques des cutinases .....	24
1.9. Applications des cutinases .....	25
<b>2. <i>Pseudomonas putida</i></b> .....	27
2.1. Définition .....	27
2.2. Historique d'isolement et caractérisation de <i>Pseudomonas putida</i> .....	28
2.3. Applications de <i>Pseudomonas putida</i> .....	29

## **Matériels et méthodes**

1. Récupération des séquences protéiques et alignements. :.....	32
2. Analyse des propriétés physico-chimiques.....	32
3. Localisation subcellulaire .....	33
4. Prédiction de la solubilité protéique .....	33
5. Prédiction du signal peptide .....	33
6. Analyse de la structure secondaire .....	33
7. Analyse de la structure tertiaire .....	33
7.1. Prédiction de la structure tertiaire .....	34
7.2. Raffinement .....	34
7.3. Validation .....	35
8. Analyse fonctionnelle .....	35
8.1. Interactions protéine-protéine .....	35
8.2. Recherche de motifs protéiques .....	35
8.3. Analyse du site actif .....	35

## **Résultats et discussion**

1. Analyse des structures primaires .....	37
2. Analyse des propriétés physico-chimiques .....	39
3. Localisation subcellulaire .....	40
4. Prédiction de la solubilité protéique .....	43
5. Prédiction du signal peptide .....	43
6. Prédiction de la structure secondaire .....	43
7. Analyse de la structure tertiaire .....	48
7.1. Prédiction de la structure tertiaire .....	48

7.2. Raffinement .....	48
7.3. Validation .....	50
8. Analyse fonctionnelle .....	53
8.1. Interactions protéine-protéine .....	53
8.2. Recherche de motifs protéiques .....	58
8.3. Analyse du site actif .....	60

### **Conclusion et perspectives**

Conclusion et perspectives.....	65
Références bibliographiques.....	67

Résumé

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure de la cuticule .....	17
<b>Figure 2:</b> Molécule de cutine et certains monomères issus de l'hydrolyse. ....	18
<b>Figure 3:</b> Fonction biologique de la cutine. ....	21
<b>Figure 4:</b> Repliement « fold » des protéines $\alpha/\beta$ hydrolases et cutinases .....	23
<b>Figure 5:</b> Structure de la cutinase de <i>Fusarium solani pisi</i> .....	24
<b>Figure 6:</b> Isolement, source et distribution des souches de <i>P. putida</i> . ....	27
<b>Figure 7:</b> Chronologie schématique des principaux résultats sur l'isolement et la caractérisation de <i>P. putida</i> . ....	28
<b>Figure 8:</b> Perspectives dans la recherche et l'application de <i>P. putida</i> .....	30
<b>Figure 9:</b> Alignement multiple des séquences d'acides aminés des cutinases de <i>P. putida</i> ....	39
<b>Figure 10:</b> Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi 746571207) de <i>P. putida</i> .....	41
<b>Figure 11:</b> Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi 1944846450) de <i>P. putida</i> . ....	41
<b>Figure 12:</b> Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi 1767043782) de <i>P. putida</i> .....	42
<b>Figure 13:</b> Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi 558521729) de <i>P. putida</i> .....	43
<b>Figure 14:</b> Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) par le serveur PSIPRED 4.0. ....	44
<b>Figure 15:</b> Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) par le serveur PSIPRED 4.0. ....	45
<b>Figure 16:</b> Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) par le serveur PSIPRED 4.0. ....	46
<b>Figure 17:</b> Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729) par le serveur PSIPRED 4.0. ....	47
<b>Figure 18:</b> Structure 3D prédite de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) produite par Phyre <sup>2</sup> , raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	49



<b>Figure 19:</b> Structure 3D prédite de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) produite par Phyre <sup>2</sup> , raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	49
<b>Figure 20:</b> Structure 3D prédite de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) produite par Phyre <sup>2</sup> , raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	50
<b>Figure 21:</b> Structure 3D prédite de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729) produite par Phyre <sup>2</sup> , raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	50
<b>Figure 22:</b> Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	51
<b>Figure 23:</b> Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	51
<b>Figure 24:</b> Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	52
<b>Figure 25:</b> Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).....	52
<b>Figure 26:</b> Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) détectée via la base de données STRING.....	54
<b>Figure 27:</b> Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) détectée via la base de données STRING.....	55
<b>Figure 28:</b> Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) détectée via la base de données STRING.....	56
<b>Figure 29:</b> Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729) détectée via la base de données STRING.....	57
<b>Figure 30:</b> Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207).....	58
<b>Figure 31:</b> Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450).....	58
<b>Figure 32:</b> Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782).....	59
<b>Figure 33:</b> Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729).....	59

<b>Figure 34:</b> Sites de liaison des ligands de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	60
<b>Figure 35:</b> Sites de liaison des ligands de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	61
<b>Figure 36:</b> Sites de liaison des ligands de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	61
<b>Figure 37:</b> Sites de liaison des ligands de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.....	62

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Applications des cutinases. ....	26
<b>Tableau 2:</b> Caractérisation des séquences récupérées des cutinases de <i>P. putida</i> . ....	37
<b>Tableau 3:</b> Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207) contre PDB.....	37
<b>Tableau 4:</b> Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450) contre PDB.....	38
<b>Tableau 5:</b> Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782) contre PDB.....	38
<b>Tableau 6:</b> Propriétés physicochimiques des cutinases de <i>P. putida</i> . ....	40
<b>Tableau 7:</b> Score hydrophobe et position des protéines cutinase de <i>P. putida</i> à l'aide de l'outil ProtScale.....	40
<b>Tableau 8:</b> Prédiction de la structure secondaire des cutinases de <i>P. putida</i> par SOPMA.....	44
<b>Tableau 9:</b> Prédiction de la structure tertiaire des cutinases de <i>P. putida</i> par Phyre <sup>2</sup> .....	48
<b>Tableau 10:</b> La validation de la prédiction des structures tertiaires originales et raffinées des cutinases de <i>P. putida</i> par les diagrammes de Ramachandran. ....	53
<b>Tableau 11:</b> Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 746571207). ....	54
<b>Tableau 12:</b> Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1944846450). ....	55
<b>Tableau 13:</b> Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 1767043782). ....	56
<b>Tableau 14:</b> Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de <i>P. putida</i> (gi 558521729). ....	57

## Liste des abréviations

***P. putida***: *Pseudomonas putida*

**RMN**: Résonance Magnétique Nucléaire

**FASTA**: FAST Alignment

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**BLASTp**: Protein Basic Local Alignment Search Tool

**PSI-BLAST**: Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool

**PDB**: Protein Data Bank

**PDB ID**: Protein Data Bank Identifiant

**Å**: ångström

**Per. identity**: Percentage identity

**Max, Min**: Maximum, Minimum

**ExPASy**: Expert Protein Analysis System

**CELLO**: subCELlular LOcalization predictor

**SignalP**: Signal Peptid

**SOPMA**: Self Optimized Prediction Method with Alignment

**PSIPRED**: PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction

**PHYRE**: Protein Homology/analogy Recognition Engine

**STRING**: Search Tool for the Retrieval of Inter- acting Genes/Proteins

**CE**: Carbohydrate Esterase

**CAZy**: Carbohydrate-Active Enzymes database

**aa**: Acide aminé

**GI**: Gene Identifiant

**kDa**: kilo Dalton

**GRAVY**: Grand average of hydropathicity

**pI**: Isoelectric point

**pH**: Potentiel d'Hydrogène

**EC**: Extinction coefficient

**II**: Instability index

**AI**: Aliphatic index

**-R**: Nombre des résidus négatifs (acide aspartique et acide glutamique)

**+R**: Nombre des résidus positifs (arginine et lysine)

# *Introduction*

Les cutinases (EC 3.1.1.74) sont des enzymes qui sont produites par certains champignons et bactéries et qui peuvent décomposer la cutine présente dans les plantes (Dutta *et al.*, 2009). Le substrat naturel de la cutinase est donc la cutine qui, en recouvrant toutes les surfaces aériennes des plantes supérieures, est l'un des principaux composants polymériques de la cuticule végétale (Fortuna *et al.*, 2021).

En raison de leur capacité à catalyser les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification, les cutinases sont également des enzymes multifonctionnelles avec de nombreuses applications industrielles; dans le domaine d'industrie alimentaire, textile, chimique, désintoxication, agriculture et bien d'autres (Chen *et al.*, 2013; Nyssölä, 2015; Qamar et Ali, 2021). Pour une meilleure intégration des cutinases dans les processus industriel à grande échelle, une compréhension détaillée du mécanisme d'action enzymatique est nécessaire.

Les études précédentes se sont davantage concentrées sur les cutinases fongiques que sur les cutinases bactériennes. Cependant, les cutinases se trouvent dans la famille Carbohydre Esterase 5 (CE5) qui contient aujourd'hui plus de 3000 entrées dans la base de données Carbohydre-Active Enzymes (CAZy, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)) (Novy *et al.*, 2021). Seules environ 106 structures protéiques tridimensionnelles de la cutinase sont disponibles dans la Protein Data Bank (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) dont 32 issues de bactéries (Bakli *et al.*, 2021).

Au vu de l'importance de la structure et fonction des cutinases bactériennes et parce que les techniques d'identification expérimentales de la structure tertiaire d'une protéine, en général, par de la cristallographie aux rayons X ou par la résonance magnétique nucléaire (RMN) prennent du temps, sont coûteuses et ne réussissent pas avec toutes les protéines (Bakli *et al.*, 2020), la modélisation structurale par homologie et l'analyse *in silico* utilisant des outils bioinformatiques a fourni, durant ces dernières décennies, une application alternative pour prédire la structure tridimensionnelle des protéines et analyser leurs caractéristiques liées à la structure et fonction avec une meilleure validation (Dahlström, 2015; Hoda *et al.*, 2021; Mohamad Sobri *et al.*, 2020).

Dans notre étude, une approche *in silico* a été adoptée pour mieux comprendre les paramètres physicochimiques globaux, la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines, la localisation subcellulaire, la Prédiction de la solubilité protéique et du signal peptide, l'analyse fonctionnelle incluant les interactions protéine-protéine, la recherche de motifs et l'analyse des sites actifs des cutinases de la bactérie *Pseudomonas putida*.

*Revue*

*Bibliographique*

## **1. Les cutinases**

### **1.1. Structure de la cuticule**

La cuticule des plantes est la couche la plus externe des plantes, qui recouvre les feuilles, les fruits, les fleurs et les tiges non ligneuses des plantes supérieures. Il protège les plantes contre la sécheresse, la dessiccation, les températures extrêmes, l'exposition aux rayons UV, les attaques chimiques, les blessures mécaniques et les infections par des agents pathogènes/parasitaires. Il fournit également un support mécanique et sert de barrière contre la fusion des organes (Kim *et al.*, 2017).

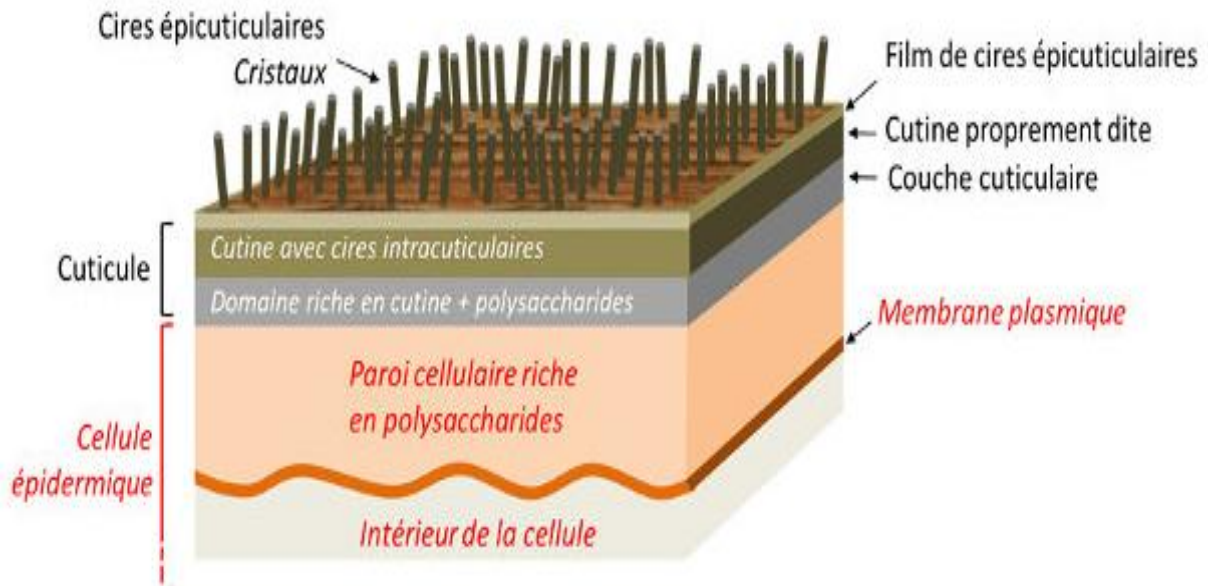
La cuticule de chaque organe a des caractéristiques spécifiques, par exemple, la cuticule du fruit est généralement plus épaisse que la cuticule de la feuille et manque de stomates. Parce que la cuticule des fruits est un modulateur essentiel de la qualité des fruits après la récolte, comme ses effets sur la rétention d'eau des fruits, les réponses aux stress physiques et biologiques et la fermeté (Ziv *et al.*, 2018).

Les cuticules végétales sont des structures composites, composées d'un échafaudage macromoléculaire lié de manière covalente de cutine (un polyester insoluble) et d'une variété de lipides solubles dans les solvants organiques qui sont collectivement appelés cires (lipides solubles) (Kunst et Samuels, 2009). Les compositions de cire et de cutine de la cuticule végétale peuvent varier considérablement dans leur architecture et, selon les espèces végétales et divers organes, diffèrent considérablement en épaisseur, du nanomètre au micromètre (Jeffree, 2006).

Bien que la cuticule soit généralement considérée indépendamment de la paroi cellulaire polysaccharidique sous-jacente de l'épiderme, les deux structures sont physiquement associées et ont des fonctions qui se chevauchent. En effet, la cuticule peut être considérée comme une modification lipidique spécialisée de la paroi cellulaire, tout comme la lignification est une modification courante des parois cellulaires secondaires des plantes (Yeats et Rose, 2013).

La structure microscopique de la cuticule est souvent divisée en deux domaines en fonction de la coloration histochimique et de leur composition chimique présumée : un domaine riche en cutine avec des polysaccharides intégrés, appelé « couche cuticulaire », et une couche sus-jacente moins abondante en polysaccharides mais enrichie en cires, appelée « cuticule proprement dite » (**Figure 1**).





**Figure 1: Structure de la cuticule**

La cuticule proprement dite contient de la cutine incrustée dans de la cire. La cutine est également un composant de la couche cuticulaire qui, en plus de la cutine, contient des polysaccharides et de la cire (<https://www.encyclopedie-environnement.org/zoom/entre-protection-defense-cuticule-plantes/>).

Structurellement, les cires sont soit déposées dans la matrice cutanée (cire intracuticulaire), soit s'accumulent à sa surface sous forme de cristaux de cire épicuticulaires ou de films. Ces cires épicuticulaires peuvent conférer des propriétés de surface macroscopiques distinctes : les films épicuticulaires sont responsables de l'aspect brillant commun à de nombreuses feuilles et fruits, tandis que les cristaux de cire épicuticulaires expliquent l'aspect terne et glauque des feuilles de brocoli (*Brassica oleracea*) et des tiges d'*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Pio et Macedo, 2009).

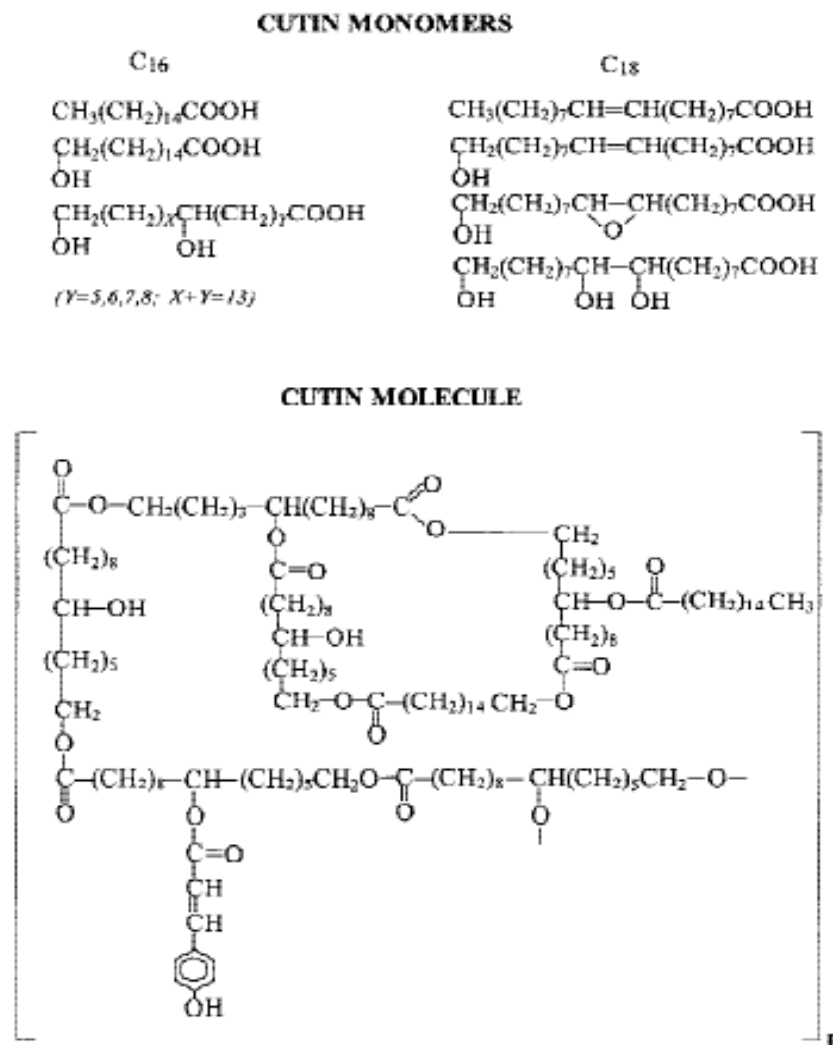
## 1.2. Structure de la cutine

Le polyester lipidique qui est insoluble dans la nature est connu pour être un composant important de la cuticule végétale et est connu sous le nom de cutine.

Pour la plupart des espèces végétales, les polymères de cutine sont constitués d'acides gras (AG) à 16 et 18 atomes de carbone qui contiennent un groupe hydroxyle et que les liaisons ester se révèlent être une source de liaison entre eux, avec de petites quantités de glycérol, des phényl-propanoïdes, etc. (Heredia, 2003). Les liaisons ester prédominent dans

les cutines, bien que des ponts peroxyde et une liaison éther aient également été décrits (**Figure 2**).

Le polymère estérifié est formé via des alcools primaires, résultant en une structure tridimensionnelle complexe, dans laquelle des cires cuticulaires sont intégrées (Kunst et Samuels, 2003). Ce polymère peut également être hydrolysé par l'action d'une enzyme produite par une variété de micro-organismes principalement des champignons et des bactéries et cette enzyme est connue sous le nom de cutinases (Carvalho *et al.*, 1999).



**Figure 2:** Molécule de cutine et certains monomères issus de l'hydrolyse (Carvalho *et al.*, 1999).

L'écorce et les racines des arbres, des vignes et des arbustes ne contiennent généralement pas de cutine. Au lieu de cela, ils sont protégés par la subérine, qui consiste en un domaine polyphénolique de type lignine avec des composés aromatiques liés au C-C et à l'éther et d'un domaine polyester similaire à la cutine (Nyyssölä, 2015). Cependant, les  $\alpha$ ,  $\omega$ -diacides à longue chaîne sont généralement plus courants et les acides substitués en chaîne

moins courants dans la subérine que dans la cutine. Habituellement, le glycérol est également un composant majeur. Le domaine polyester de la subérine est sensible à l'hydrolyse catalysée par la cutinase, alors que le domaine polyphénolique ne l'est pas (Graça et Santos, 2007; Kolattukudy, 2001).

### **1.3. Biosynthèse de la cutine**

La biosynthèse de la cutine commence par la formation de monomères de cutine. La biosynthèse des précurseurs lipidiques de la cutine se produit principalement dans le réticulum endoplasmique et implique l'estérification des acides gras C16 et C18 dérivés des plastes en CoA par les protéines acyl-coenzyme A synthétase (LACS) à longue chaîne, l'oxydation de l'acyl-CoA, médiée par les enzymes du cytochrome P450 de la famille CYP86A et CYP77A et la protéine HOTHEAD, ainsi que la synthèse de monoacylglycérols précurseurs de la cutine à partir d'acides gras oxygénés activés par CoA par les enzymes glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT).

De plus, une étude récente chez *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) a révélé que l'époxide hydrolase1 (AtEH1) code pour une époxyde hydrolase cytosolique impliquée dans la synthèse de monomères polyhydroxylés de cutine (Kong *et al.*, 2020; Pineau *et al.*, 2017).

Les monomères de cutine résultants sont ensuite exportés vers l'apoplaste de la cellule par des transporteurs de cassette de liaison à l'ATP (ABC) localisés dans la membrane plasmique (PM) et sont déposés dans la paroi cellulaire. Les enzymes cutine synthase (CUS) de la superfamille des lipases/estérases à motif GDSL catalysent ensuite la polymérisation de la cutine (Hong *et al.*, 2017; Philippe *et al.*, 2016; Philippe *et al.*, 2020).

### **1.4. Interactions plante-pathogène**

Les compositions de la cuticule ainsi que la paroi cellulaire des plantes peuvent être affectées par les agents pathogènes (champignons, par exemple) et, inversement au cours des interactions plante-pathogène, les agents pathogènes peuvent détecter les composants de la surface de la plante et ajuster leur pathogénèse et leur virulence en conséquence (Ziv *et al.*, 2018).

À un stade précoce de l'infection, les champignons phytopathogènes peuvent synthétiser des enzymes hydrolytiques, telles que les cutinases, les estérases et les lipases, qui ciblent

directement la cuticule et jouent ainsi un rôle clé dans l'infection pathogène (Berto *et al.*, 1999; Leroch *et al.*, 2013).

Afin de faciliter la pénétration et l'infection ultérieures dans la couche de cuticule végétale, l'activité cutinase d'un agent pathogène peut être étendue une fois qu'il détecte les monomères de cuticule végétale résultants (Woloshuk et Kolattukudy, 1986).

Le polymère de la cutine doit être traversée au cours de la pénétration directe de la surface des plantes par lors de l'infection par des les champignons pathogènes. Diverses observations ont suggéré que des cutinases produites dans des conditions saprophytes, en utilisant la cutine comme seule source de carbone (Köller *et al.*, 1995).

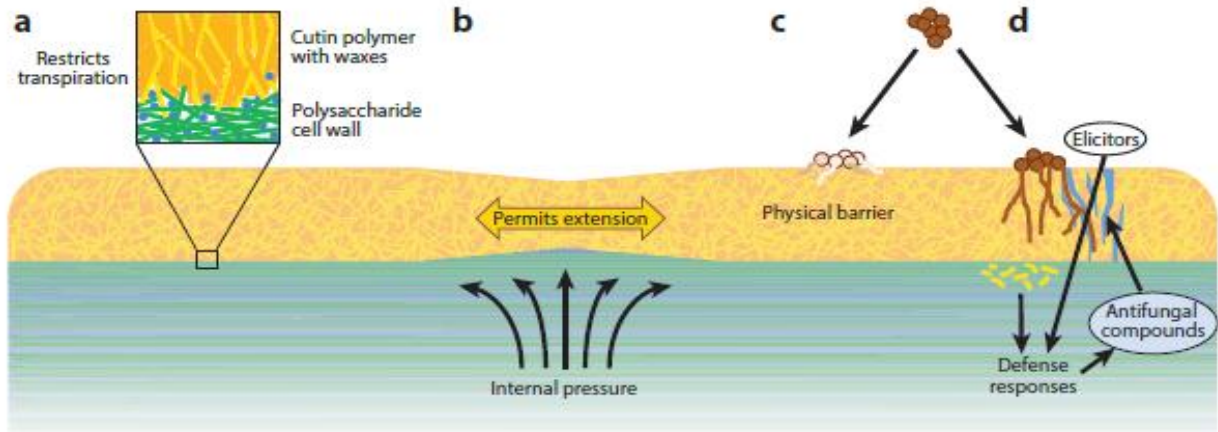
### **1.5. Fonctions biologiques de la cutine**

Le caractère de la cutine lipophile et sa structure chimique contribue à protéger les plantes contre de nombreux stress environnementaux qui prévalent dans les écosystèmes terrestres. Ces stress sont de deux types; les stress biotiques (champignons, pathogènes) et les stress abiotiques (agressions chimiques, radiations UV, pertes hydriques) (Kong *et al.*, 2020).

#### **1.5.1. Barrière d'eau**

Une fonction essentielle de la cuticule est de limiter la perte d'eau végétale par transpiration, mais la contribution relative de la cutine n'est pas très claire. Il été montrés que les cires cuticulaires constituent le composant clé de la barrière à l'eau car la perméabilité de la cuticule augmente de 100 à 1 000 fois après l'extraction de la cire, selon l'espèce (Schreiber, 2010). En effet, des études génétiques des mutants liés à la cutine analysés montrent une perméabilité cuticulaire accrue, généralement en conjonction avec une ultrastructure anormale de la cuticule (Isaacson *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la quantité de cutine ne détermine pas l'efficacité de la cuticule en tant que barrière pour limiter la perte d'eau, mais qu'une matrice de cutine correctement formée et structurée est essentielle (Kissinger *et al.*, 2005; Leide *et al.*, 2007). À cet égard, la cutine fournit probablement un échafaudage hydrophobe pour maintenir les cires (**Figure 3a**) et maintient la continuité de la cuticule sur toute la surface de la plante.



**Figure 3: Fonction biologique de la cutine** (Fich *et al.*, 2016). (a) Les molécules d'eau (cercles bleus) diffusent facilement à travers la paroi cellulaire du polysaccharide (vert) mais pas à travers les cires (orange) intercalées dans la structure du polymère de cutine (jaune). (b) La cutine fournit une extensibilité à la cuticule, lui permettant de s'étirer en réponse à une forte pression interne, s'adaptant à la croissance des organes. (c,d) La cutine facilite la défense contre les agents pathogènes (cercles bruns) en servant de barrière physique (panneau c) ou par l'action de signalisation des produits de dégradation de la cutine (panneau d). La dégradation de la cutine peut également augmenter la résistance aux agents pathogènes en permettant l'entrée dans la cellule d'éliciteurs de défense et l'exportation par diffusion de composés antifongiques.

### 1.5.2. Organogenèse et contribution biomécanique

La cuticule, en tant que partie de l'épiderme, est sous tension et se contracte lorsqu'elle est isolée. En tant que couche la plus externe, la cuticule subirait les forces les plus fortes et nécessiterait donc une rigidité et une résistance importantes (Domínguez *et al.*, 2011). Pour s'adapter aux forces externes et à la déformation, la cuticule doit également être capable d'une réponse élastique, et la déformation plastique ainsi que l'intercalation de nouveaux matériaux seraient importantes pour permettre la croissance des organes sans rupture de la cuticule.

À de faibles niveaux de stress biomécanique, la cuticule se comporte de manière élastique mais devient viscoélastique à mesure que le stress augmente (Domínguez *et al.*, 2011). A cet égard Les résultats des études antérieures ont mis en évidence que la cutine contribue à la plasticité mais pas à la force de la cuticule, lui permettant d'être étirée pendant la croissance des organes (López-Casado *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2012; Tsubaki *et al.*, 2012) (**Figure 3b**) (Fich *et al.*, 2016).

Un autre rôle important de la cuticule est de permettre aux organes de se séparer complètement les uns des autres au cours de l'organogenèse. Des études antérieures ont suggéré que l'intégrité structurelle de la cuticule, fournie par la cutine, est nécessaire pour empêcher la fusion des organes (Sieber *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2004).

### **1.5.3. Barrière pathogène**

La cuticule peut jouer un rôle majeur dans les défenses des plantes contre les agents pathogènes potentiels, et plusieurs études ont fourni des preuves corrélatives suggérant que le composant cutine est essentiel à cet égard (Dickman *et al.*, 1982; Isaacson *et al.*, 2009; Saladié *et al.*, 2007). Les fruits produisent des quantités substantielles de cutine, qui sert de barrière physique efficace pour empêcher l'entrée de la plupart des agents pathogènes (**Figure 3c**) (Fich *et al.*, 2016). Les cuticules généralement beaucoup plus minces des feuilles (au moins chez *Arabidopsis thaliana*) peuvent inhiber l'entrée de certaines bactéries, telles que *Pseudomonas syringae*, mais constituent un obstacle insignifiant pour de nombreux champignons pathogènes. Les feuilles utilisent donc un système dans lequel la dégradation du réseau de cutine déclenche des réponses de défense et entraîne la libération de composés antifongiques (**Figure 3d**). Cependant, cette idée est basée sur des données provenant d'une variété limitée de plantes, et des analyses similaires devraient être effectuées avec d'autres espèces pour tester l'hypothèse (Fich *et al.*, 2016).

### **1.6. Cutinases et leur identification**

Les cutinases (EC 3.1.1.74) sont des estérases à sérine appartenant à la superfamille des hydrolases  $\alpha/\beta$ . Ce sont des enzymes qui possèdent une triade catalytique Ser-His-Asp classique, dans laquelle la sérine catalytique est exposée au solvant. Le site actif de la cutinase est suffisamment grand pour accueillir la cutine de substrat de poids moléculaire élevé, et certains d'entre eux peuvent également hydrolyser les polyesters synthétiques de poids moléculaire élevé. En outre, les cutinases sont capables d'hydrolyser une plus grande variété de substrats, y compris les esters solubles de faible poids moléculaire, les triacylglycérols à chaîne courte et longue. Les cutinases sont également capables de catalyser l'estérification et la transestérification (Chen *et al.*, 2013).

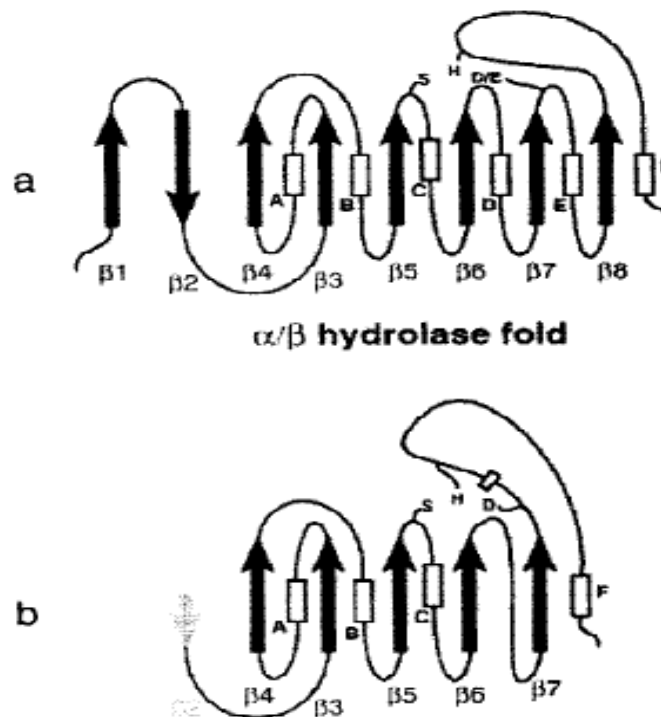
La cutinase a été identifiée pour la première fois dans les années 1960 et caractérisée au début des années 1970. Par conséquent, la cutinase du champignon filamenteux et phytopathogène, *Fusarium solani pisi*, qui est l'agent responsable de la formation de mycétome chez l'homme, est rapidement devenue un système modèle pour l'étude de la structure, de la fonction et de la réactivité de l'enzyme cutinase. En effet, l'identification des gènes codant la cutinase ont été identifiés à l'origine en observant l'effet de leur délétion sur la virulence de l'organisme d'expression. Bien que les cutinases ont été trouvées à l'origine dans

des champignons pathogènes, elles ont été isolées et caractérisées, par la suite, à partir des bactéries, telles que *Thermobifida fusca* (Chen *et al.*, 2008), et d'une variété de champignons pathogènes et non pathogènes, y compris la levure *Cryptococcus* (Masaki *et al.*, 2005).

### 1.7. Structure de la cutinase

La première structure cristalline tridimensionnelle résolue aux rayons X de la cutinase de *Fusarium solani pisi* a été décrite en 1992, clonée et exprimée dans *E. coli*, ensuite déposée dans la base des données des structures protéiques, PDB, (PDB ID : 1CUS) avec une résolution de 1.6 Å (Martinez *et al.*, 1992). Cette structure a révélé que la cutinase de *F. solani pisi* adopte un repliement  $\alpha/\beta$  qui expose la sérine catalytique (Ser 120) au solvant.

Étant donné que l'activité accrue que les lipases présentent aux interfaces aqueuse/lipidique (activation interfaciale) implique l'interaction des boucles hydrophobes du site actif avec l'interface (Cambillau *et al.*, 1996). Depuis lors, des structures cristallines tridimensionnelles aux rayons X d'un nombre important de variantes de la protéine cutinase, y compris des complexes inhibés, ont été déposées dans la PDB. Le site catalytique à sérine de la cutinase est située au milieu d'une boucle serrée entre un brin  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . Le feuillet  $\beta$  central, composé de cinq brins  $\beta$  parallèles, est recouvert de deux et trois hélices  $\alpha$  de part et d'autre de feuillet  $\beta$ . Ces brins  $\beta$  sont les équivalents des brins  $\beta_3$ – $\beta_7$  du repliement des hydrolases  $\alpha/\beta$  (Schrag et Cygler, 1997) (**Figure 4**).

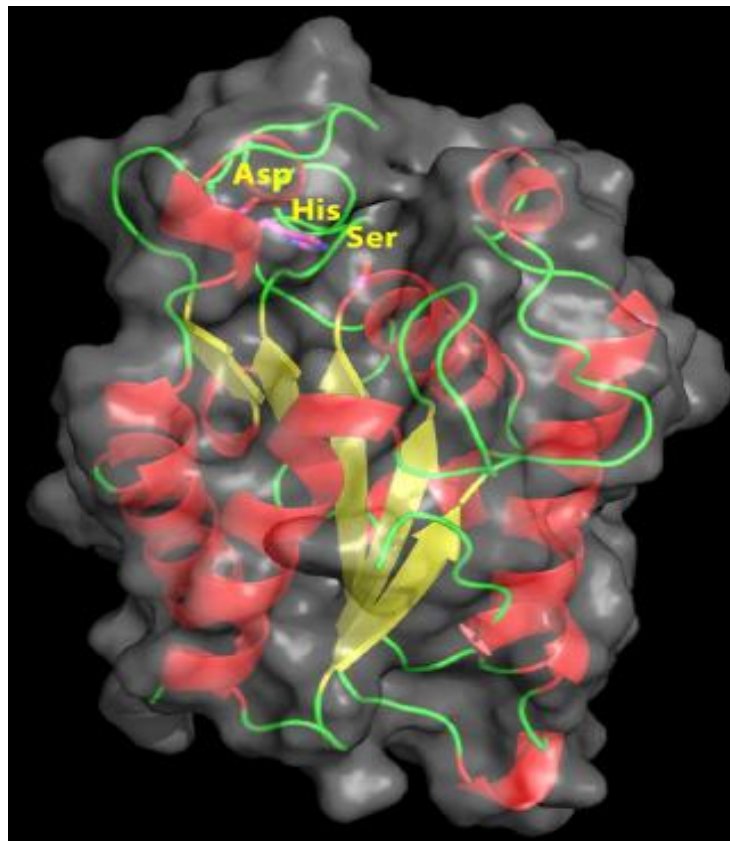


**Figure 4: Repliement « fold » des protéines  $\alpha/\beta$  hydrolases (a) et cutinases (b) (Carvalho *et al.*, 1999).**

Le brin équivalent  $\beta_2$  antiparallèle dans la cutinase est déformé et ne forme que deux liaisons hydrogène. Des équivalents topologiques des hélices A, B, C, D et F ont été trouvés dans la cutinase, bien qu'un déplacement de l'hélice D ait été détecté. Le brin  $\beta_7$  est une boucle hélicoïdale unique déformée et il n'y a pas de brin  $\beta_8$ . Après  $\beta_7$ , il y a le site catalytique de l'aspartate et l'histidine, puis l'hélice F qui se trouve près de l'extrémité C-terminale de la protéine (Carvalho *et al.*, 1999; Schrag et Cygler, 1997).

### 1.8. Propriétés enzymatiques des cutinases

Les cutinases appartiennent à la super famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et consistent en des polypeptides simples avec des poids moléculaires inférieurs à 40 kDa. Ce sont des estérases à sérine avec la triade classique Ser-His-Asp similaire à plusieurs lipases et sérine protéases (**Figure 5**) (Nyyssölä, 2015). Le motif Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly, contenant le site actif Ser-120, a une homologie encore plus forte avec la séquence consensus Gly-(Tyr ou His)-Ser-X-Gly couramment présente dans les lipases. La triade catalytique Ser-Asp-His est accessible au solvant. De plus, le site actif présente une grande flexibilité qui peut expliquer l'adaptation à différents substrats (Jelsch *et al.*, 1998; Longhi *et al.*, 1997b).



**Figure 5:** Structure de la cutinase de *Fusarium solani pisi* (Longhi *et al.*, 1997a; Nyyssölä, 2015).



La quasi majorité des cutinases caractérisées jusqu'à présent ont des optima de pH allant du pH neutre à alcalin et ne sont pas fonctionnelles à pH acide, du moins vis-à-vis du substrat naturel, la cutine. Ceci est quelque peu surprenant, puisque les producteurs de cutinase fongique croître à un pH acide (inférieur à pH 5). Cependant, certaines cutinases montrant une activité enzymatique avec la cutine comme substrat à un pH inférieur à 4,0 ont été rapportées (Nyyssölä *et al.*, 2014; Nyyssölä *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010).

Malgré le fait que les cutinases présentent une activité lipolytique, elles diffèrent des lipases classiques car elles ne présentent pas d'activation interfaciale. L'absence d'une région masquant la sérine du site actif dans la majorité des cutinases comme dans d'autres lipases, explique probablement pourquoi la cutinase n'est pas activée par la présence d'interfaces (Carvalho *et al.*, 1999). Par ailleurs, les cutinases sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et aux estérases à la différence qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces. Ces enzymes sont à la fois actives en solution moléculaire et en système biphasique, donc elles sont le lien entre les estérases et lipases, ce qui est considéré comme étant un avantage industriel (voir plus bas les applications des cutinases) (Fickers *et al.*, 2008).

Une autre caractéristique importante basée sur la structure protéique de la cutinase est le trou oxyanion (oxyanion hole). En effet certains résidus, par exemple les acides aminés qui sont différents de ceux de la triade catalytique, semblent être importants dans le mécanisme catalytique de l'enzyme cutinase, à titre d'exemple (les atomes d'azote de la chaîne principale de Gln121 et Ser42) de la structure tridimensionnelle de la cutinase chez *Fusarium solani pisi* (Martinez *et al.*, 1994). Ces résidus forment ce que l'on dénomme le trou de l'oxyanion. Leur rôle serait essentiellement de stabiliser des intermédiaires réactionnels (Fickers *et al.*, 2008).

### **1.9. Applications des cutinases**

Les cutinases sont un groupe d'enzymes versatiles montrant des utilisations et de diverses applications dans des produits et des processus industrielles (Pio et Macedo, 2009). En raison de la multifonctionnalité des cutinases qui peuvent catalyser des réactions d'hydrolyse, des estérifications et des transestérifications. Ces propriétés les rendent adaptés à la dégradation des polyesters de haut poids moléculaire (Dimarogona *et al.*, 2015) et utiles dans la modification des fibres synthétiques (Silva *et al.*, 2005).

Ces enzymes ont un potentiel substantiel pour être largement utilisés dans les industries alimentaires, chimiques, détergents, environnementales, textiles, les produits pétroliers (production de biodiesel) et laitiers, les composés aromatiques, la production de composés phénoliques, la dégradation des insecticides et des pesticides (désintoxication) dans le domaine d'agrochimie, la chimie des polymères (par exemple dans la dégradation du plastique), l'industrie pharmaceutique, l'industrie textile et la blanchisserie. De plus, il a été démontré que les déchets agricoles, tels que le marc de pomme et la peau de tomate, contenant de la cutine représentent des inducteurs à faible coût pour la production commerciale de cutinase bactérienne par fermentation (Fett *et al.*, 2000). Quelques applications de la cutinase sont brièvement décrites dans le **tableau 1** (Chen *et al.*, 2013; Qamar et Ali, 2021).

**Tableau 1: Applications des cutinases** (Qamar et Ali, 2021).

Réaction	Substrats
<b>Hydrolyse</b>	
Triglycérides	Trioléine Tricapryline
Esters	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\rho</math>-Nitrophenyl butyrate</li> <li>▪ <math>\rho</math>-Nitrophenylvalerate</li> <li>▪ <math>\rho</math>Nitrophenylpalmitate</li> <li>▪ Méthyle-, éthyle-, propionate de propyle</li> </ul>
<b>Synthèse</b>	
Estérification	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acide oléique et hexanol</li> <li>▪ Acide butyrique et 2-butanol</li> <li>▪ Acide oléique et glycérol</li> <li>▪ Acide butyrique et hexanol</li> <li>▪ Acide laurique et pentanol</li> </ul>
Transestérification	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Méthyle propionate et propanol</li> <li>▪ Butylacetate et hexanol</li> <li>▪ 1-phenylethanol et vinylacetate</li> </ul>

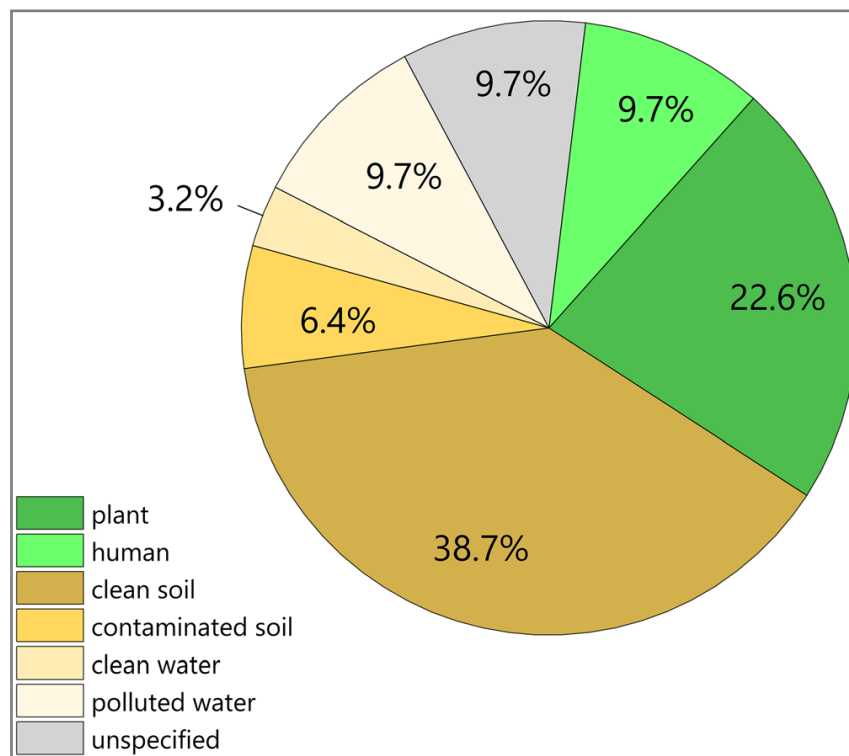
En effet, les cutinases présentent une activité hydrolytique *in vitro* vis-à-vis d'une grande variété d'esters, des esters synthétiques solubles (par exemple, les p-nitrophénylesters) aux triglycérides à longue chaîne insolubles et à courtes longues chaînes d'acides gras aussi avec une efficacité comparable à celle de la lipase pancréatique (Longhi et Cambillau, 1999). De plus, les cutinases peuvent être considérées comme un lien entre les estérases et les lipases car elles hydrolysent efficacement les esters solubles et les triacylglycérols émulsionnés. Par conséquent, la cutinase a été largement appliquée en tant qu'enzyme lipolytique dans une

composition détergente pour la lessive ou la vaisselle pour éliminer les graisses (Carvalho *et al.*, 1999).

## **2. *Pseudomonas putida***

### **2.1. Définition**

*Pseudomonas putida* est une bactérie à Gram négatif, saprophyte, omniprésente dans le rhizosphère et un colonisateur du sol qui appartient au vaste groupe des espèces fluorescentes de *Pseudomonas* (Volke *et al.*, 2020). La bactérie *P. putida* est en forme de bâtonnet et est fréquemment isolée à partir des eaux, des plantes et des sols (en particulier les sites pollués) (Weimer *et al.*, 2020) (**Figure 6**).



**Figure 6: Isolement, source et distribution des souches de *P. putida*.**

Les souches de *P. putida* ont été isolées du sol, du sol pollué, de l'eau, de l'eau polluée et/ou des eaux usées et d'autres sources non spécifiées (données de *Pseudomonas* Genome DB et NCBI BioSamples Database) (Weimer *et al.*, 2020).

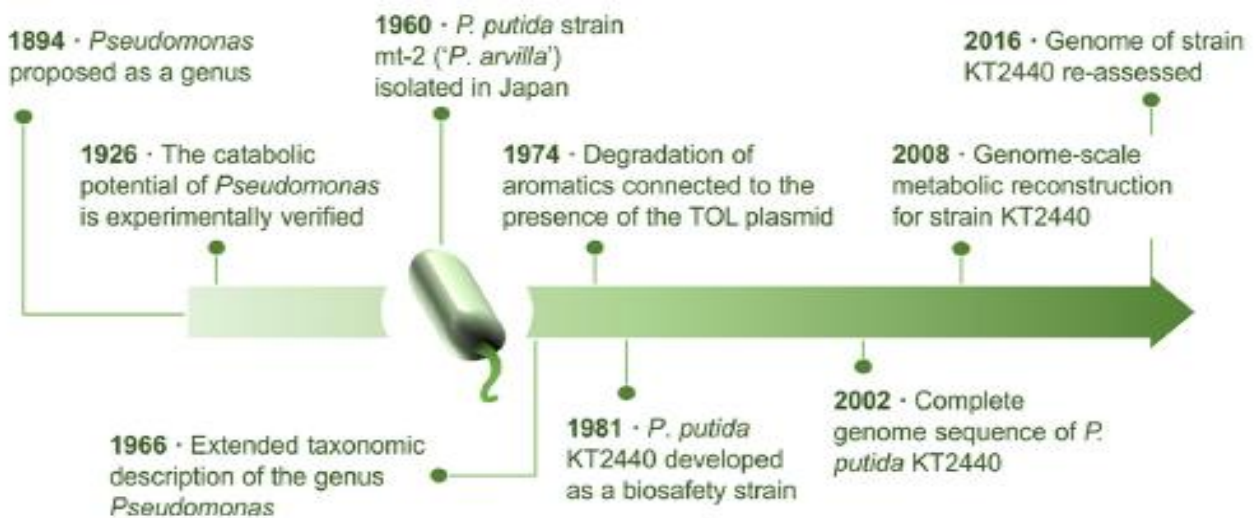
Cette bactérie qui est bien caractérisée est dotée de nombreuses caractéristiques qui en font un outil approprié pour l'ingénierie métabolique contemporaine à vocation industrielle (Löwe *et al.*, 2017). De plus, *P. putida* est couramment utilisée dans la recherche environnementale en raison de sa capacité à dégrader de nombreux composés aromatiques (Clark et Pazdernik, 2016).

## 2.2. Historique d'isolement et caractérisation de *Pseudomonas putida*

L'acquisition de connaissances sur la génétique, la biochimie et la physiologie de ce microbe n'a cessé de progresser au cours des cinq dernières décennies. Cela a conduit, entre autres, au décryptage du répertoire génomique complet (Weimer *et al.*, 2020).

Le nom « *Pseudomonas* » a été inventé en 1894 par Migula, qui a décrit ce genre comme un groupe de cellules avec des organes polaires de motilité et, dans certains cas particuliers, la formation de structures ressemblant à des spores (Migula, 1894).

Sur la base des caractéristiques nutritionnelles et des caractéristiques morphologiques, une proposition de la classification des espèces de *Pseudomonas* les plus pertinentes connues à ce moment-là (y compris *P. putida*). En effet, lors de l'obtention de la séquence du gène de l'ARNr 16S de plusieurs espèces de *Pseudomonas* en 1973, le genre bactérien a été redéfini (Palleroni, 2003, 2010). La chronologie décrivant les développements historiques dans le domaine de la biologie du genre *Pseudomonas* jusqu'à le séquençage du génome entier en 2002 de la souche *P. putida* KT2440 est détaillée dans la **figure 7** (Nikel et de Lorenzo, 2018).



**Figure 7: Chronologie schématique des principaux résultats sur l'isolement et la caractérisation de *P. putida*** (Nikel et de Lorenzo, 2018). Cette représentation non exhaustive comprend les dates de publication des articles clés.

La souche KT2440 de *P. putida*, le membre le mieux caractérisé du groupe, est devenue une espèce de laboratoire modèle qui a attiré une attention considérable en tant qu'hôte cellulaire pour la biologie synthétique et l'ingénierie métabolique en raison de son métabolisme remarquable et polyvalent (Nikel et de Lorenzo, 2018).

### **2.3. Applications de *Pseudomonas putida***

En raison de ses propriétés exceptionnelles d'adaptation aux conditions environnementales difficiles, en particulier les fortes concentrations de solvants organiques, les réactions redox difficiles et les stress oxydatifs, *Pseudomonas putida* a été considéré comme un organisme hôte prometteur pour la valorisation de la biomasse végétale (Elmore *et al.*, 2020; Martin-Pascual *et al.*, 2021).

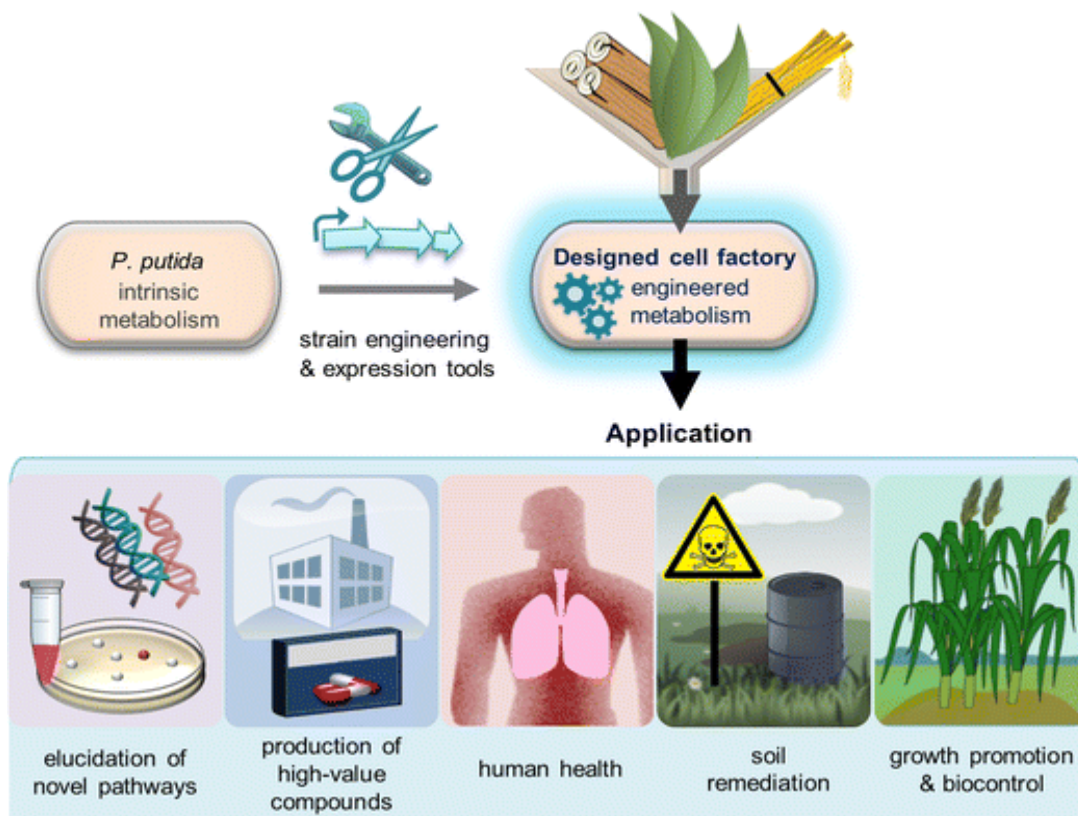
Par ailleurs, cette bactérie a été utilisée comme étant un organisme hôte pour la biosynthèse recombinante des produits naturels et métabolites secondaires tels que les biosurfactants rhamnolipides, les terpénoïdes, les polycétides et les peptides non ribosomiques, et d'autres composés dérivés d'acides aminés (Loeschcke et Thies, 2015). De plus, cette bactérie possède de nombreuses caractéristiques qui ont été mises en évidence tels que ses exigences nutritionnelles simples, sa croissance relativement rapide et son métabolisme flexible qui en font un outil approprié pour l'ingénierie métabolique contemporaine à vocation industrielle (Löwe *et al.*, 2017; Martin-Pascual *et al.*, 2021).

La libération de *P. putida* de sa nature aérobique obligatoire a été montrée, fournissant la base de processus basés sur des bioréacteurs sans aération et permettant la formation de produits naturels par des biocatalyseurs sensibles à l'oxygène (Schmitz *et al.*, 2015). Par ailleurs, des outils d'ingénierie et d'expression de souches sophistiqués nouvellement développés généreront des usines de cellules de *P. putida* de nouvelle génération capables de convertir divers substrats renouvelables en une multitude de composés souhaités avec une précision et une efficacité élevées (Loeschcke et Thies, 2020). En effet, en utilisant la bioproduction à l'aide de souches de *P. putida* modifiées, des substrats ont été générés à partir de matières premières renouvelables, telles que la lignocellulose, les huiles et l'ensilage, peuvent être utilisés pour produire des produits à valeur ajoutée destinés à être appliqués dans l'alimentation humaine et animale, la santé et l'hygiène, l'emballage et le logement, le transport et le secteur de l'énergie et pour l'agriculture (Weimer *et al.*, 2020).

En outre, la bactérie peut être appliquée dans un contexte écologique et/ou agricole, notamment l'assainissement des sols, la promotion de la croissance des plantes et l'activité de lutte biologique phytopathogène (Bakli et Zenasni, 2019). De même, l'application potentielle de *P. putida* modifiée dans le contexte de l'assainissement des sols via la livraison de métabolites ou d'enzymes appropriés a été soulignée (Mardani *et al.*, 2022).

Dans ces usines cellulaires avancées (**Figure 8**), de nouvelles technologies de clonage et d'expression permettront la mise en œuvre de divers pipelines de production biosynthétique, élargissant encore l'utilisation de produits de *P. putida* (Loeschcke et Thies, 2015). De plus, par une analyse approfondie du métabolisme du carbone de la bactérie ainsi que l'application des outils biotechnologiques disponibles, une perspective de biologie des systèmes fournira la base d'une ingénierie métabolique basée sur la connaissance de *P. putida* afin d'augmenter les rendements de produits naturels (Loeschcke et Thies, 2020).

Les opportunités futures d'application de *P. putida* peuvent inclure la production de composés précieux, mais également l'utilisation comme système de délivrance pour une variété de molécules bioactives (Loeschcke et Thies, 2015) (**Figure 8**). Dans ce contexte et à l'interface de la microbiologie synthétique et de la médecine, une application pharmaceutique, par exemple, de vésicules de la membrane externe de la bactérie est suggérée pour leur potentiel en tant qu'adjuvants ou vecteurs de vaccins en raison de leur faible activité pathologique (Balhuizen *et al.*, 2021).



**Figure 8: Perspectives dans la recherche et l'application de *P. putida*** (Loeschcke et Thies, 2015).

*Matériel*  
*et méthodes*

## **1. Récupération des séquences protéiques et alignements**

Les séquences d'acides aminés des cutinases de la souche DLL-E4 de *Pseudomonas putida* ont été extraites au format FASTA à partir de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Coordinators, 2018). Ces séquences dont les numéros d'accèsion GI sont; 746571207, 1944846450, 1767043782 et 558521729 ont été utilisées pour toutes les analyses bioinformatiques.

Les mêmes séquences FASTA des cutinases de *P. putida* ont été utilisées comme séquences de requête pour l'analyse PSI-BLAST (outil de recherche d'alignement local de base itératif spécifique à la position, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)) contre la banque de données de protéines (PDB) pour identifier ses structures homologues.

L'alignement multiple de ces séquences d'acides aminés de cutinases a été généré à l'aide du logiciel CLUSTALW avec les paramètres par défaut et visualisé par le programme BioEdit v7.2.5 (Hall *et al.*, 2011).

## **2. Analyse des propriétés physico-chimiques**

Le serveur ExPASy ProtParam tool (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) (Gasteiger *et al.*, 2005) a été utilisé pour calculer différentes propriétés physico-chimiques des séquences protéiques récupérées de cutinases chez *P. putida* telles que la composition en acides aminés, l'indice aliphatique (AI), le point isoélectrique (pI), l'indice d'instabilité (II), le nombre de résidus chargés positifs et négatifs, la grande moyenne d'hydrophathie (GRAVY) et le coefficient d'extinction (CE).

Le point isoélectrique (pI) est déterminé sur la base de la valeur pK de la protéine lors de la migration de la protéine dans des conditions de dénaturation (Bjellqvist *et al.*, 1993). La concentration de protéine purifiée dans l'échantillon est évaluée à partir de la valeur du coefficient d'extinction (EC) (Lugani et Sookh, 2017).

La stabilité de la protéine est calculée à partir de son indice d'instabilité (II) et les protéines sont prédites comme stables lorsque leur indice d'instabilité est inférieur à 40; cependant lorsque la valeur de l'indice d'instabilité est supérieure à 40, la protéine est considérée comme instable (Guruprasad *et al.*, 1990). Le volume occupé par la chaîne latérale des acides aminés aliphatiques (alanine, valine, leucine et isoleucine) par rapport au volume



total occupé est appelé indice aliphatique et il détermine la thermostabilité d'une protéine globulaire (Walker, 2005).

L'hydrophilie ou l'hydrophobicité de la protéine est déterminée par grande moyenne d'hydropathie (GRAVY), qui est le rapport de la somme des valeurs d'hydropathie de tous les acides aminés au nombre total de résidus dans la séquence (Umang *et al.*, 2012).

L'hydropathie des séquences d'acides aminés des cutinases de *P. putida* a été prédite à l'aide l'outil ExPASy ProtScale basé sur l'échelle d'hydrophobie de Kyte et Doolittle (<https://web.expasy.org/protscale/>) (Kyte et Doolittle, 1982).

### 3. Localisation subcellulaire

La localisation subcellulaire des protéines cutinases de la bactérie *P. putida* a été prédite par le logiciel en ligne CELLO 2.5, subCELLular LOcalization predictor (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu *et al.*, 2006). Cet outil prédit la composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition physico-chimique, la composition de séquence voisine et la composition de séquence partitionnée de la protéine.

### 4. Prédiction de la solubilité protéique

La prédiction de la solubilité protéique a été réalisée à l'aide du serveur en ligne SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) (Hirokawa *et al.*, 1998) afin d'identifier les hélices transmembranaires dans chaque protéine cutinase de *P. putida*.

### 5. Prédiction du signal peptide

Le logiciel en ligne SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Armenteros *et al.*, 2019) a été utilisé pour rechercher la présence de peptide signal et pour déterminer aussi la localisation de la protéine cutinase de *P. putida*.

### 6. Analyse de la structure secondaire

Deux outils bioinformatiques; le logiciel en ligne PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction, PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (McGuffin *et al.*, 2000) et le logiciel en ligne Self-Optimized Prediction Method with Alignment (SOPMA) (Geourjon et Deleage, 1995) qui est dans le serveur Network Protein Sequence Analysis (NPS@) ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)), ont été utilisés pour prédire la structure secondaire des protéines, y compris les hélices  $\alpha$ , le brins  $\beta$ ,

le brin étendu, les coudes  $\beta$  et les boucles des séquences d'acides aminés des cutinases extraites de *P. putida*. Par ailleurs, l'analyse de prédiction de structure secondaire via le programme en ligne SOPMA a été soumise pour ces quatre protéines de *P. putida* en utilisant les paramètres par défaut (window width, 17; similarity threshold, 8; and number of states, 4).

### 7. Analyse de la structure tertiaire

#### 7.1. Prédiction de la structure tertiaire

Les séquences de protéines des cutinases de *P. putida* au format FASTA ont été soumises au logiciel en ligne, Protein Homology/analogy Recognition Engine V2.0 (Phyre<sup>2</sup>) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015) pour la modélisation de ces protéines et la prédiction de leurs structures tridimensionnelles.

En fonction de la disponibilité des modèles structuraux pour une séquence protéique donnée, la modélisation peut s'agir d'une modélisation comparative/d'homologie ou de threading (qui consiste à identifier structurellement l'adéquation entre un repliement protéique et une séquence particulière) ou *Ab Initio* (Singh *et al.*, 2016). Dans notre cas, la prédiction de la structure tertiaire des cutinases de *P. putida* est basée sur l'approche de modélisation par homologie qui est une technique de modélisation moléculaire.

La modélisation moléculaire par homologie permet d'obtenir la structure tridimensionnelle de la protéine d'intérêt lorsque la séquence de celle-ci est suffisamment proche de celle d'une protéine dont la structure tridimensionnelle a été résolue expérimentalement par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) et qui est disponible dans la base des données, Protein Data Bank PDB (Pellequer, 1999).

En effet, il a été rapporté que la méthode de calcul la plus précise pour générer des modèles structuraux fiables des protéines était la méthode de modélisation par homologie et elle a été utilisée dans de nombreuses applications biologiques (Bordoli *et al.*, 2009).

#### 7.2. Raffinement

The ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>), qui est un raffineur de structure protéique à haute résolution, a été utilisé pour améliorer la qualité physique de la structure tridimensionnelle prédite pour chaque protéine de *P. putida* (Xu et Zhang, 2011).

### **7.3. Validation**

La qualité stéréochimique des modèles structuraux tridimensionnels prédits et raffinés des cutinases de *P. putida* a été évaluée par le diagramme de Ramachandran à l'aide des outils d'analyse PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) via le serveur d'analyse et de vérification structurale, SAVES v6.0 (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

Les modèles structuraux 3D des protéines cutinases de *P. putida* ainsi obtenus après le raffinement et la validation ont été visualisés et optimisés à l'aide du logiciel graphique moléculaire PyMOL, version 2.3 (DeLano, 2019).

## **8. Analyse fonctionnelle**

### **8.1. Interactions protéine-protéine**

Afin d'étudier les interactions fonctionnelles des protéines cutinase chez la bactérie *Pseudomonas putida* avec d'autres protéines potentielles, la base de données STRING (Search Tool for the Retrieval of Inter-acting Genes/Proteins) version 11.5 (<http://string-db.org/>) a été utilisée (Szklarczyk *et al.*, 2021). Pour ce faire, le serveur STRING va construire un réseau d'interaction protéine-protéine pour différentes interactions protéiques connues et prédites.

### **8.2. Recherche de motifs protéiques**

De plus, des soumissions des différentes séquences requêtes des protéines d'intérêt dans l'outil de recherche MOTIF finder (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) ont été réalisées pour analyser les motifs fonctionnels communs et déterminer les familles auxquelles appartiennent les protéines cutinases de *P. putida*.

### **8.3. Analyse du site actif**

Par ailleurs, la prédiction des sites de liaison des ligands (sites actifs) des enzymes cutinases de *P. putida* a été réalisée en utilisant le serveur COFACTOR (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>) (Roy *et al.*, 2012) basée sur les structures des modèles générés, les séquences et les interactions protéine-protéine.

*Résultats*

*et*

*discussion*

**1. Analyse des structures primaires**

Les séquences d'acides aminés des enzymes de cutinase de *P. putida* ont été extraites à partir de la base de données NCBI au format FASTA en se basant sur la recherche en mots clés « cutinase *Pseudomonas putida* ». Les caractéristiques générales des protéines ainsi obtenues sont montrées dans le **tableau 2**.

**Tableau 2: Caractérisation des séquences récupérées des cutinases de *P. putida*.**

Nom	Numéro d'accésion (GI)	Nombre d'aa	Poids moléculaire (Da)
HlyD family secretion protein	gi 746571207	145	15876.83
HlyD family secretion protein	gi 1944846450	398	42988.41
HlyD family secretion protein	gi 1767043782	277	30012.69
cutinase family protein	gi 558521729	430	46740.71

Une recherche de PSI-BLASTp de chaque séquence protéique de cutinase de *P. putida* contre la base de données des structures protéiques, Protein Data Bank (PDB) a été effectuée, pour trouver les structures protéiques homologues les plus appropriées comme modèles.

Les résultats sont du PSI-BLASTp pour la séquence de la protéine (gi|746571207) sont détaillés dans le **tableau 3**, qui montre les caractéristiques de la seule structure protéique homologue trouvée, (PDB ID : 4TKO\_B) ainsi que sa relation avec la séquence de la protéine requête.

La couverture de la séquence requête (Query) par rapport à la structure homologue était égale à 64% et le pourcentage d'identité était de 29.03%.

**Tableau 3: Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de *P. putida* (gi|746571207) contre PDB.**

PDB ID	Max score	Total score	Query coverage	E value	Per. identity	Accession length	Resolution (Å)	Description	Organism
4TKO_B	59.7	59.7	64%	9e-11	29.03%	358	2.85	Structure of the periplasmic adaptor protein EmrA	<i>Aquifex aeolicus</i> VF5

Les résultats de PSI-BLASTp pour la séquence de la protéine (gi|1944846450) sont détaillés dans le **tableau 4**, qui montre les caractéristiques des quatre structures protéiques homologues trouvées (PDB IDs : 4TKO\_B, 5NIK\_D, 3FPP\_A et 3LNN\_A) ainsi que leurs relations avec la séquence de la protéine requête.

La couverture de la séquence requête par rapport aux structures homologues variait de 57% à 83% et le pourcentage d'identité variait de 22,44 à 24,26 %.

**Tableau 4: Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) contre PDB.**

PDB ID	Max score	Total score	Query coverage	E value	Per. identity	Accession length	Resolution (Å)	Description	Organism
4TKO_B	99.0	99.0	69%	2e-22	24.09%	358	2.85	Structure of the periplasmic adaptor protein EmrA	<i>Aquifex aeolicus</i> VF5
5NIK_D	47.8	47.8	83%	2e-05	22.44%	371	5.3	Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump	<i>Escherichia coli</i> K-12
3FPP_A	46.6	46.6	72%	4e-05	22.95%	341	2.99	Crystal structure of E.coli MacA	<i>Escherichia coli</i>
3LNN_A	39.7	39.7	57%	0.007	24.26%	359	2.8	Crystal structure of ZneB	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34

Les résultats de PSI-BLASTp pour la séquence de la protéine (gi|1767043782) sont détaillés dans le **tableau 5**, qui montre les caractéristiques des trois structures protéiques homologues trouvées (PDB IDs : 4TKO\_B, 5NIK\_D et 3FPP\_A) ainsi que leurs relations avec la séquence de la protéine requête.

La couverture de la séquence requête par rapport aux structures homologues variait de 40% à 81% et le pourcentage d'identité variait de 24,90 à 26,79%.

**Tableau 5: Résultats de l'analyse PSI-BLASTp de la séquence de cutinase de *P. putida* (gi|1767043782) contre PDB.**

PDB ID	Max score	Total score	Query coverage	E value	Per. identity	Accession length	Resolution (Å)	Description	Organism
4TKO_B	84.3	84.3	81%	4e-18	24.90%	358	2.85	Structure of the periplasmic adaptor protein EmrA	<i>Aquifex aeolicus</i> VF5
3FPP_A	38.1	38.1	40%	0.011	26.79%	341	2.99	Crystal structure of E.coli MacA	<i>Escherichia coli</i>
5NIK_D	38.1	38.1	40%	0.012	26.79%	371	5.3	Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump	<i>Escherichia coli</i> K-12

Le résultat de PSI-BLASTp pour la séquence de la protéine (gi|558521729) contre PDB était négatif (pas de similarité structurale significative trouvée).

La recherche de similarité de séquences par l'alignement multiple des séquences d'acides aminés des cutinases de *P. putida* a révélée des régions conservées d'acides aminés, KET, YGSXV, AXXLL, AFXLL et DQSG qui peuvent être impliquées dans la fonction biologique de chaque enzyme de cutinase de la bactérie *P. putida* (Figure 9).

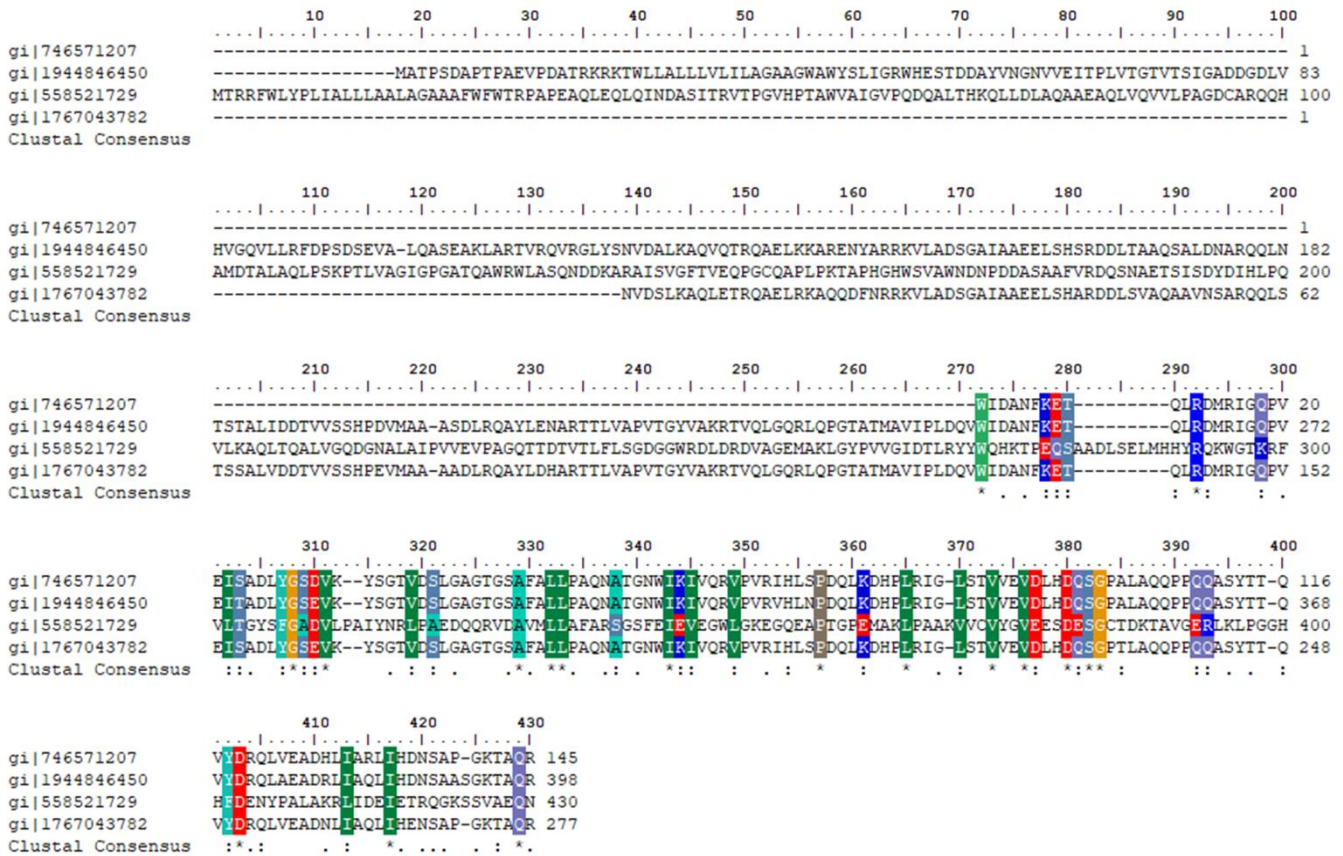


Figure 9: Alignement multiple des séquences d'acides aminés des cutinases de *P. putida*. Les symboles de Clustal consensus indiquent le degré de conservation (\*: Exacte, ': Substitution conservée, !: Substitution semi-conservée).

## 2. Analyse des propriétés physico-chimiques

Les propriétés physicochimiques, comme le point isoélectrique (pI), le nombre de résidus chargés négativement “Asp + Glu” (-R), le nombre de résidus chargés positivement “Arg + Lys” (+R), le coefficient d'extinction (EC), l'indice d'instabilité (II), la demi-vie, l'indice aliphatique (AI) et la grande moyenne d'hydrophathie (GRAVY) pour les enzymes cutinase de *P. putida* sont donnés dans le **tableau 6**.

Les valeurs théoriques du point isoélectrique (pI) de ces protéines étaient de 5.90, 5.66, 5.80 et 5.06, ce qui suggère que les protéines cutinase de *P. putida* sont modérément acides. Les valeurs d'indice d'instabilité (II) pour les protéines (gi|746571207) (gi|1944846450) (gi|1767043782) étaient respectivement de 25,55, 29,08 et 30,55 (< 40), ce qui classait cette

cutinase comme protéine stable. Alors que la valeur de l'indice d'instabilité (II) pour la protéine (gi|558521729) était de 42,01 (> 40), ce qui classait cette cutinase comme protéine instable. De plus, le coefficient d'extinction (EC) pour chaque protéine était calculé. EC fait référence à la quantité de lumière pouvant être absorbée par les protéines en 280 nm (Gill et Von Hippel, 1989) et les valeurs d'indice aliphatique (AI) étaient élevées, allant de 85.86 à 96.63, indiquant que ces protéines sont thermostables. Par ailleurs, la valeur de la grande moyenne d'hydrophatie (GRAVY) représente les interactions protéine-eau. Les valeurs de GRAVY pour toutes les cutinases de *P. putida* se sont avérées négatives, indiquant la nature hydrophile de ces enzymes.

**Tableau 6: Propriétés physicochimiques des cutinases de *P. putida*.**

Numéro d'accèsion (GI)	PI	- R	+ R	EC	II	Demi-vie	AI	GRAVY
gi 746571207	5.90	16	13	16960	25.55	2.8 heures	93.52	-0.368
gi 1944846450	5.66	45	38	47900	29.08	30 heures	96.63	-0.222
gi 1767043782	5.80	31	26	19940	30.55	1.4 heures	94.08	-0.312
gi 558521729	5.06	52	35	81150	42.01	30 heures	85.86	-0.235

L'outil bioinformatique en ligne ExPASy ProtScale selon l'algorithme de Kyte et Doolittle a permis de prédire les positions hydrophobes minimales et maximales ainsi que les scores hydrophobes pour les séquences des cutinases de *P. putida* (**tableau 7**).

**Tableau 7: Score hydrophobe et position des protéines cutinase de *P. putida* à l'aide de l'outil ProtScale.**

Numéro d'accèsion (GI)	Position		Score	
	Min	Max	Min	Max
gi 746571207	11	89	-2.044	1.722
gi 1944846450	142	28, 29	-2.456	3.700, 3.700
gi 1767043782	21, 22	221	-2.478, -2.478	1.722
gi 558521729	295	14	-2.622	3.211

### 3. Localisation subcellulaire

Le programme CELLO a prédit pour la protéine (gi|746571207) de *P. putida* la composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition de séquence partitionnée, la composition physico-chimique et la composition de séquence voisine les valeurs de 0.520, 0.523, 0.307, 0.906 et 0.508, respectivement (**Figure 10**).

De plus, les valeurs de prédiction de la localisation subcellulaire par le programme CELLO pour la protéine de *P. putida* (gi|746571207), y compris les fiabilités pour la localisation cytoplasmique, périplasmique, membrane externe, extracellulaire et membrane



interne, sont (de grandes à petites valeurs) 1.721, 1.714, 0.797, 0.405 et 0.363, respectivement.

**CELLO RESULTS**

SeqID: gi|746571207|ref|WP\_039601103.1| HlyD family secretion protein, partial [Pseudomonas putida]

Analysis Report: SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Periplasmic	0.520
N-peptide Comp.	Periplasmic	0.523
Partitioned seq. Comp.	Cytoplasmic	0.307
Physico-chemical Comp.	Cytoplasmic	0.906
Neighboring seq. Comp.	Periplasmic	0.508
CELLO Prediction:		
	Cytoplasmic	1.721 *
	Periplasmic	1.714 *
	OuterMembrane	0.797
	Extracellular	0.405
	InnerMembrane	0.363

**Figure 10: Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi|746571207) de *P. putida*.**

\* CELLO a prédit que la localisation subcellulaire de la protéine était cytoplasmique et périplasmique.

Le programme CELLO a prédit pour la protéine (gi|1944846450) de *P. putida* la composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition de séquence partitionnée, la composition physico-chimique et la composition de séquence voisine les valeurs de 0.784, 0.672, 0.942, 0.650 et 0.695, respectivement (**Figure 11**).

De plus, les valeurs de prédiction de la localisation subcellulaire par le programme CELLO pour la protéine de *P. putida* (gi|1944846450), y compris les fiabilités pour la localisation de membrane externe, périplasmique, membrane interne, cytoplasmique et extracellulaire sont (de grandes à petites valeurs) 3.216, 1.199, 0.286, 0.198 et 0.101, respectivement.

**CELLO RESULTS**

SeqID: gi|1944846450|ref|WP\_197893446.1| HlyD family secretion protein [Pseudomonas putida]

Analysis Report: SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	OuterMembrane	0.784
N-peptide Comp.	Periplasmic	0.672
Partitioned seq. Comp.	OuterMembrane	0.942
Physico-chemical Comp.	OuterMembrane	0.650
Neighboring seq. Comp.	OuterMembrane	0.695
CELLO Prediction:		
	OuterMembrane	3.216 *
	Periplasmic	1.199
	InnerMembrane	0.286
	Cytoplasmic	0.198
	Extracellular	0.101

**Figure 11: Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi|1944846450) de *P. putida*.**

\* CELLO a prédit que la localisation subcellulaire de la protéine était membrane externe.

Le programme CELLO a prédit pour la protéine (gi|1767043782) de *P. putida* la composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition de séquence partitionnée, la composition physico-chimique et la composition de séquence voisine les valeurs de 0.693, 0.573, 0.444, 0.312 et 0.660, respectivement (**Figure 12**).

De plus, les valeurs de prédiction de la localisation subcellulaire par le programme CELLO pour la protéine de *P. putida* (gi|1767043782), y compris les fiabilités pour la localisation de membrane externe, périplasmique, cytoplasmique, extracellulaire et membrane interne sont (de grandes à petites valeurs) 1.976, 1.592, 0.549, 0.499 et 0.384, respectivement.

### CELLO RESULTS

SeqID: gi|1767043782|ref|WP\_151884050.1| HlyD family secretion protein, partial [*Pseudomonas putida*]

Analysis Report:

SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	OuterMembrane	0.693
N-peptide Comp.	Periplasmic	0.573
Partitioned seq. Comp.	OuterMembrane	0.444
Physico-chemical Comp.	Periplasmic	0.312
Neighboring seq. Comp.	OuterMembrane	0.660

CELLO Prediction:

OuterMembrane	1.976 *
Periplasmic	1.592 *
Cytoplasmic	0.549
Extracellular	0.499
InnerMembrane	0.384

**Figure 12: Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi|1767043782) de *P. putida*.** \* CELLO a prédit que la localisation subcellulaire de la protéine était membrane externe et périplasmique.

Le programme CELLO a prédit pour la protéine (gi|558521729) de *P. putida* la composition en acides aminés, la composition de N-peptide, la composition de séquence partitionnée, la composition physico-chimique et la composition de séquence voisine les valeurs de 0.576, 0.463, 0.983, 0.608 et 0.865, respectivement (**Figure 13**).

De plus, les valeurs de prédiction de la localisation subcellulaire par le programme CELLO pour la protéine de *P. putida* (gi|558521729), y compris les fiabilités pour la localisation périplasmique, cytoplasmique, membrane interne, membrane externe et extracellulaire sont (de grandes à petites valeurs) 3.185, 1.035, 0.708, 0.052 et 0.020, respectivement.

## CELLO RESULTS

SeqID: gi|558521729|gb|EST13734.1| cutinase family protein [Pseudomonas putida S610]

Analysis Report:

SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Periplasmic	0.576
N-peptide Comp.	Periplasmic	0.463
Partitioned seq. Comp.	Periplasmic	0.983
Physico-chemical Comp.	InnerMembrane	0.608
Neighboring seq. Comp.	Periplasmic	0.865

CELLO Prediction:

Periplasmic	3.185 *
Cytoplasmic	1.035
InnerMembrane	0.708
OuterMembrane	0.052
Extracellular	0.020

**Figure 13: Analyse de prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine (gi|558521729) de *P. putida*.**\* CELLO a prédit que la localisation subcellulaire de la protéine était périplasmique.

#### 4. Prédiction de la solubilité protéique

La prédiction de la solubilité a été réalisée à l'aide du serveur SOSUI qui calcule l'hydrophobicité moyenne et détermine si la protéine est une protéine soluble ou transmembranaire. Ainsi, toute partie hydrophobe de la protéine est marquée comme région transmembranaire. SOSUI a prédit la séquence des protéines (gi|746571207) et (gi|1767043782) de *P. putida* en tant que des protéines solubles non transmembranaires. Par contre, les séquences protéiques (gi|1944846450) et (gi|558521729) ont été prédites comme des protéines membranaires contenant les régions transmembranaires allant des positions; 24-46 et de 6-28, respectivement.

#### 5. Prédiction du signal peptide

Le serveur SignalP n'a suggéré aucun peptide signal dans les quatre protéines de cutinases de *P. putida*.

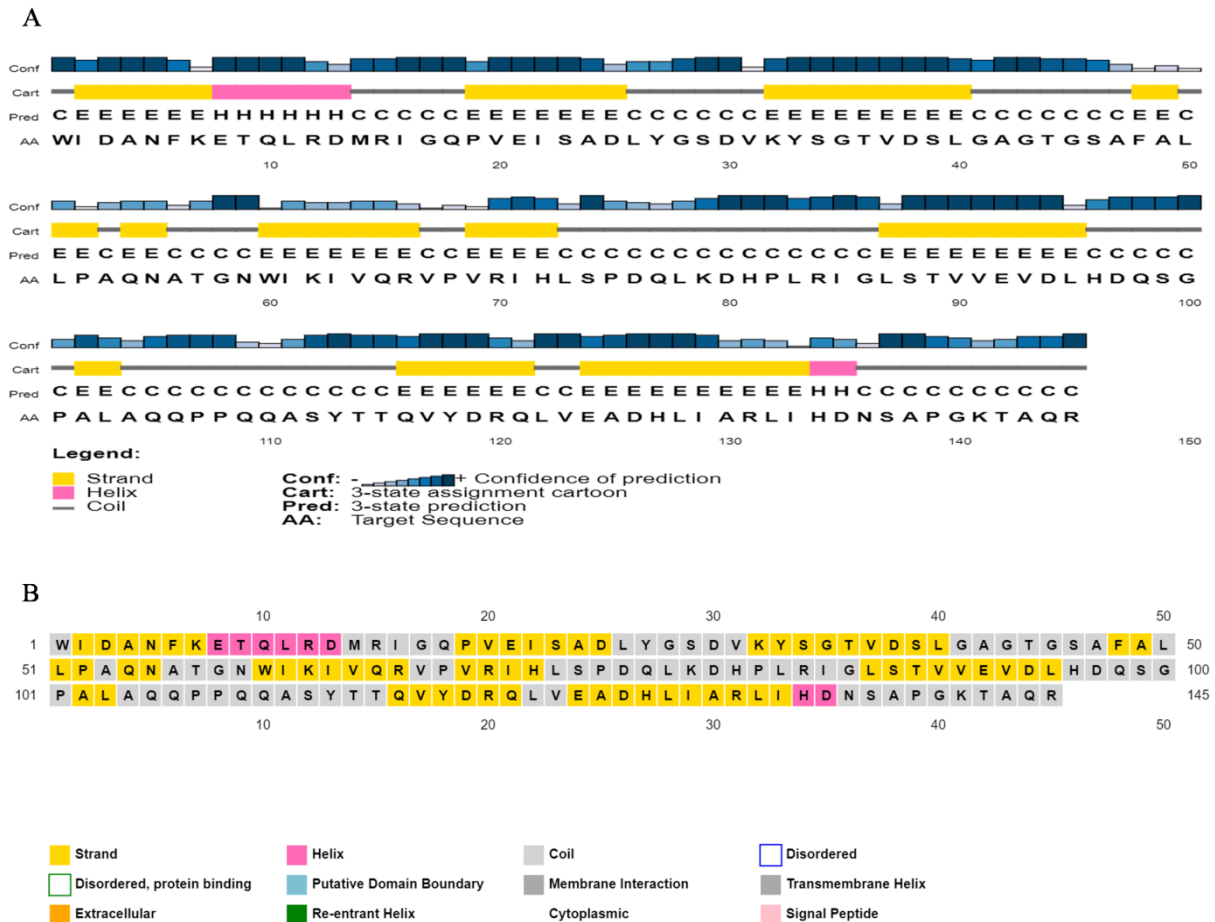
#### 6. Prédiction de la structure secondaire

Le serveur de prédiction de structure secondaire SOPMA a révélé que les cutinases (gi|1944846450) et (gi|1767043782) de *P. putida* sont dominées par les hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ -helix), puis les boucles (Random coils), ensuite les brins  $\beta$  (Extended strand) et les coudes  $\beta$  ( $\beta$ -turn). Alors que pour les protéines (gi|746571207) et (gi|558521729) de *P. putida* la structure secondaire qui dominait était les boucles (Random coils) et les hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ -helix) et les brins  $\beta$ , suivi par les coudes  $\beta$  ( $\beta$ -turn) (**tableau 8**).

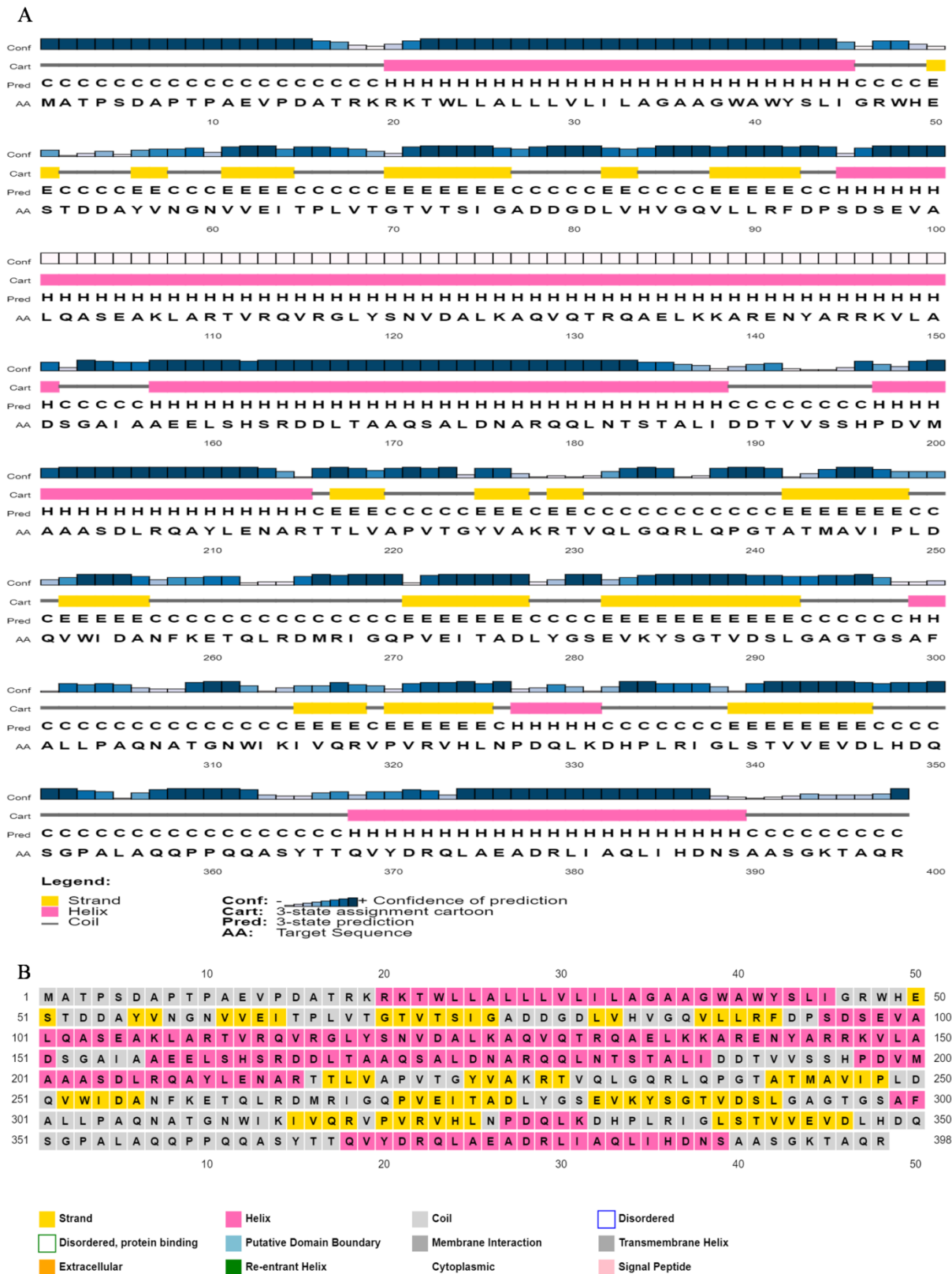
**Tableau 8: Prédiction de la structure secondaire des cutinases de *P. putida* par SOPMA**

Accession number (GI)	$\alpha$ -helix	Extended strand	$\beta$ -turn	Random coils
gi 746571207	25.52%	26.90%	8.28%	39.31%
gi 1944846450	41.91%	19.60%	5.53%	32.91%
gi 1767043782	41.88%	19.49%	6.14%	32.49%
gi 558521729	37.67%	17.44%	3.02%	41.86%

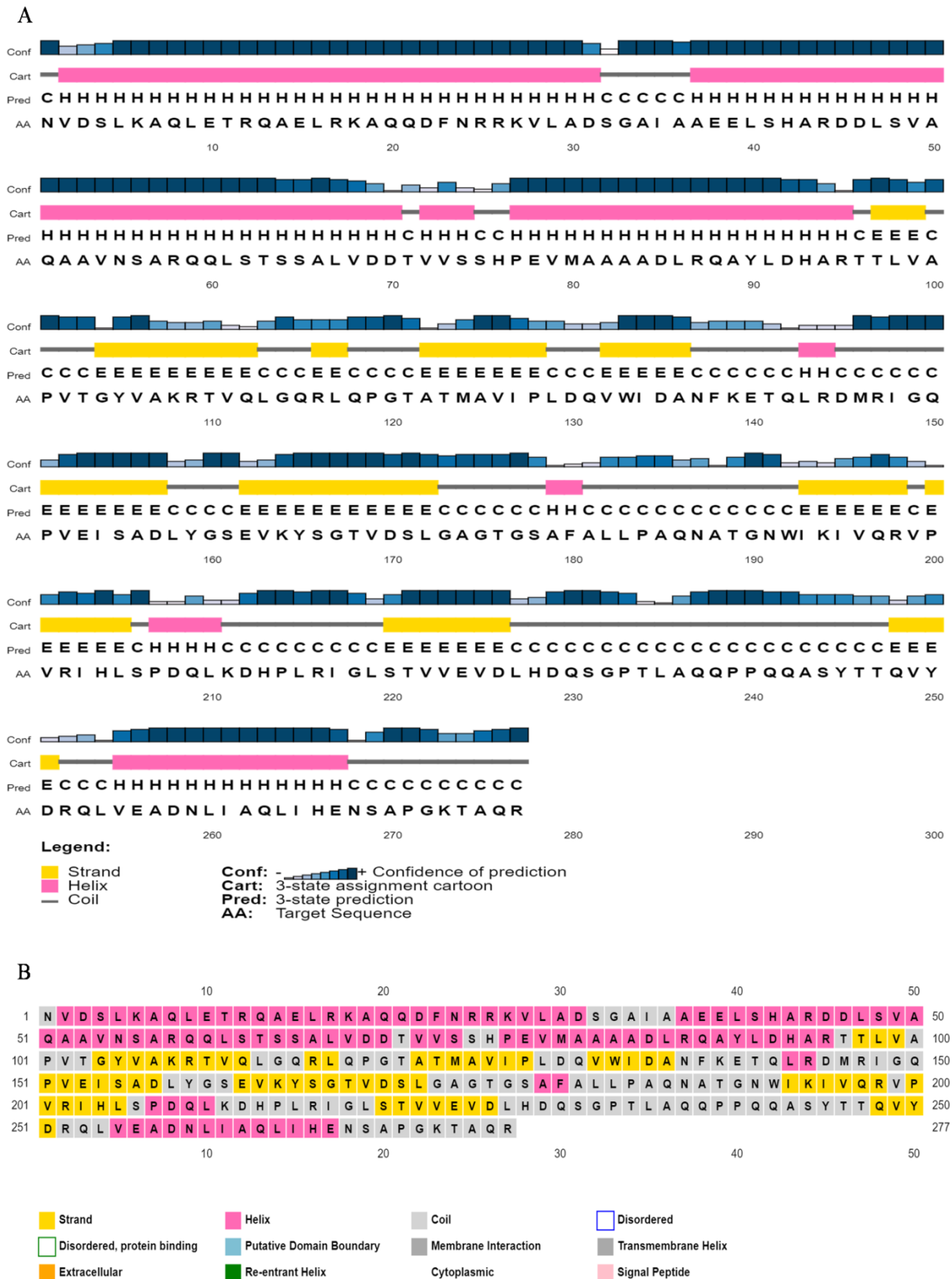
La structure secondaire des cutinases de *P. putida* a également été prédite par le serveur en ligne PSIPRED 4.0. Les résultats de prédiction de la structure secondaire par PSIPRED pour toutes ces cutinases de *P. putida* semblent être en accord avec les résultats de SOPMA et avaient des valeurs de confiance de prédiction qui sont élevées (voir **figure 14**, **figure 15**, **figure 16** et **figure 17**).



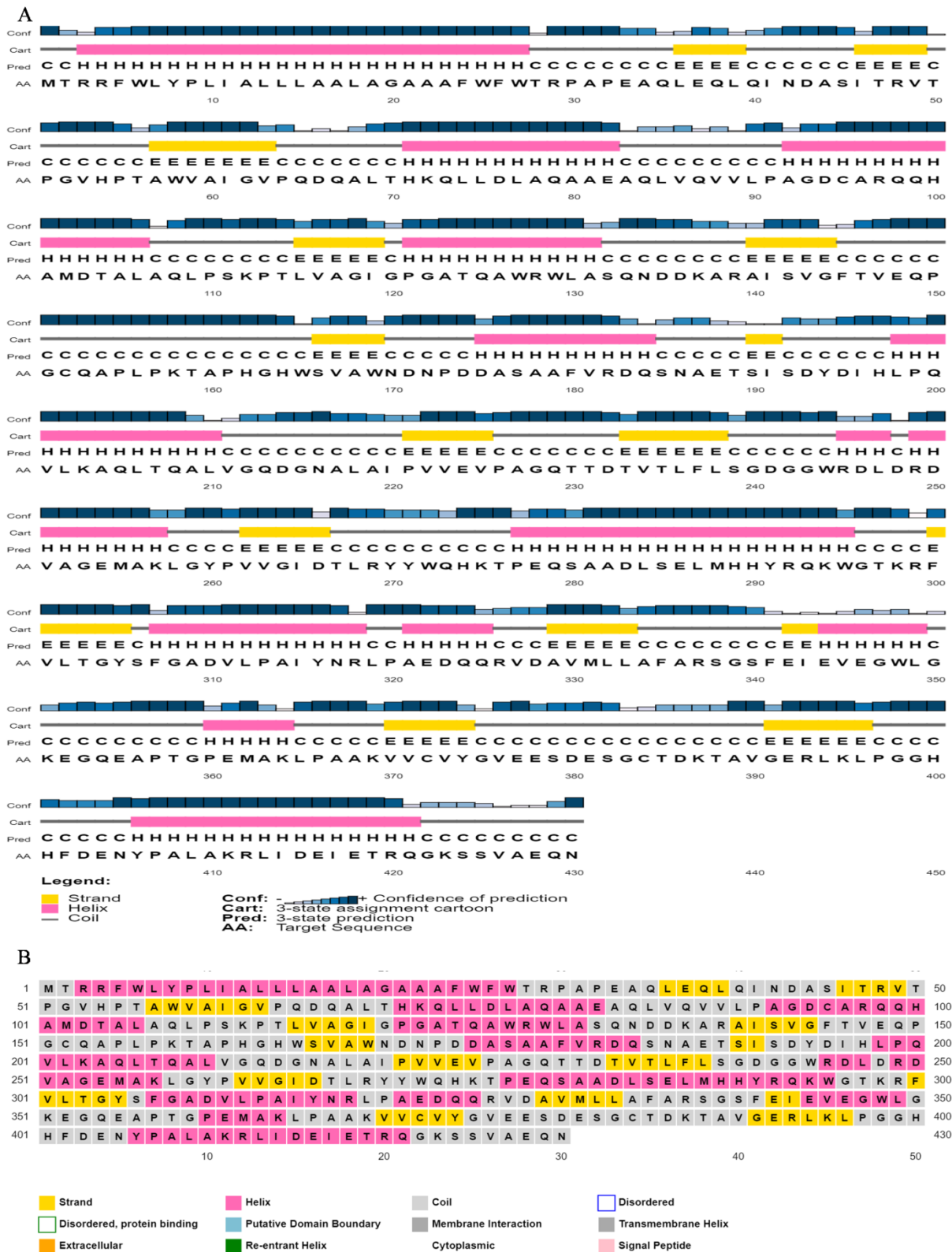
**Figure 14: Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207) par le serveur PSIPRED 4.0.** (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins  $\beta$ , rose pour les hélices  $\alpha$  et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.



**Figure 15: Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) par le serveur PSIPRED 4.0. (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins  $\beta$ , rose pour les hélices  $\alpha$  et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.**



**Figure 16: Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de *P. putida* (gi|1767043782) par le serveur PSIPRED 4.0. (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins  $\beta$ , rose pour les hélices  $\alpha$  et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.**



**Figure 17: Prédiction de la structure secondaire de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729) par le serveur PSIPRED 4.0.** (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. Les couleurs représentent les éléments de structure secondaire des protéines (jaune pour les brins  $\beta$ , rose pour les hélices  $\alpha$  et gris pour les boucles). La confiance de la prédiction observée dans toute la structure secondaire prédite était élevée, indiquant une grande fiabilité de cette prédiction.

## 7. Analyse de la structure tertiaire

### 7.1. Prédiction de la structure tertiaire

Les structures tridimensionnelles des cutinases de *P. putida* ne sont pas encore disponibles à la base des données PDB. Par conséquent, le logiciel Phyre<sup>2</sup> a été utilisé pour prédire ces structures 3D en utilisant une approche de modélisation par homologie. Les résultats de cette prédiction structurale sont indiqués dans le **tableau 9**.

Phyre<sup>2</sup> a suggéré le modèle c4dk1B (Structure of the periplasmic adaptor protein EmrA de *Aquifex aeolicus*) comme l'un des meilleurs modèles homologues structuraux pour 3D pour les protéines cutinases de *P. putida* (gi|746571207), (gi|1944846450) et (gi|1767043782) avec une confiance de 98.3%, 99.8% et 99.7%, une identité de 21%, 24% et 24% et de couverture de 77%, 66 % et 84%, respectivement. Ce résultat a confirmé les structures protéiques les plus homologues en tant que modèle (premier homologue structural « premier hit») trouvées par l'analyse PSI-BLASTp sur les séquences de cutinases (gi|746571207), (gi|1944846450) et (gi|1767043782) contre PDB (voir ci-dessus, tableau 5).

Tandis que pour la cutinase (gi|558521729) de *P. putida*, le modèle structural suggéré par Phyre<sup>2</sup> était c2e3jA (la structure cristalline structure d'époxyde hydrolase b « rv1938 » de *Mycobacterium tuberculosis* avec une résolution de 2.1 Å) qui avait une confiance de 98.3, une identité de 24% et de couverture de 47%.

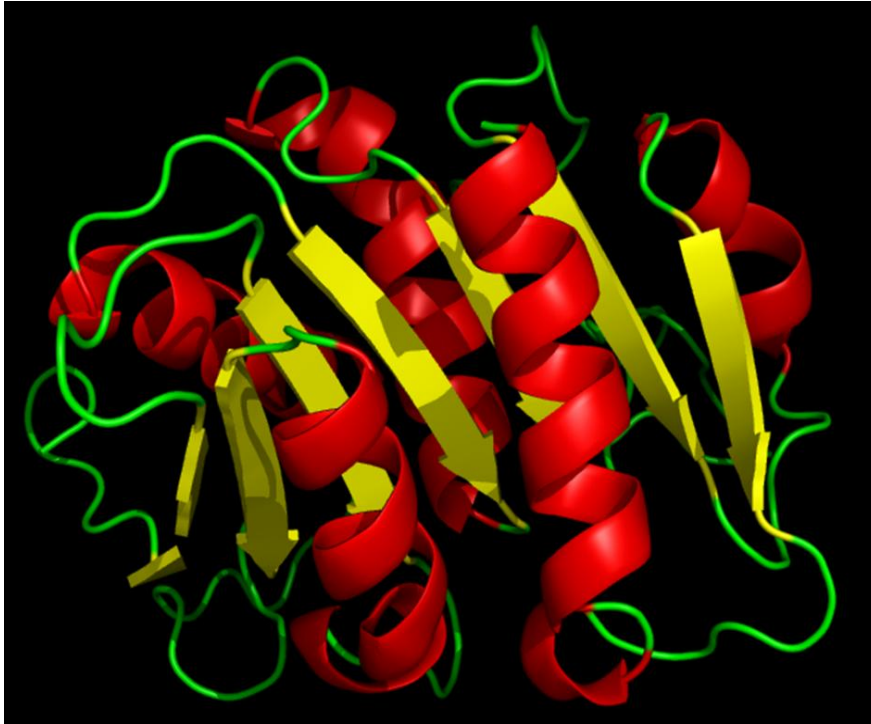
**Tableau 9: Prédiction de la structure tertiaire des cutinases de *P. putida* par Phyre<sup>2</sup>.**

Numéro d'accension (GI)	Modèle	Confidence (%)	Identity (%)	Coverage (%)
gi 746571207	c4dk1B	98.3	21	77
gi 1944846450	c4dk1B	99.8	24	66
gi 1767043782	c4dk0A	99.7	24	84
gi 558521729	c2e3jA	98.3	24	47

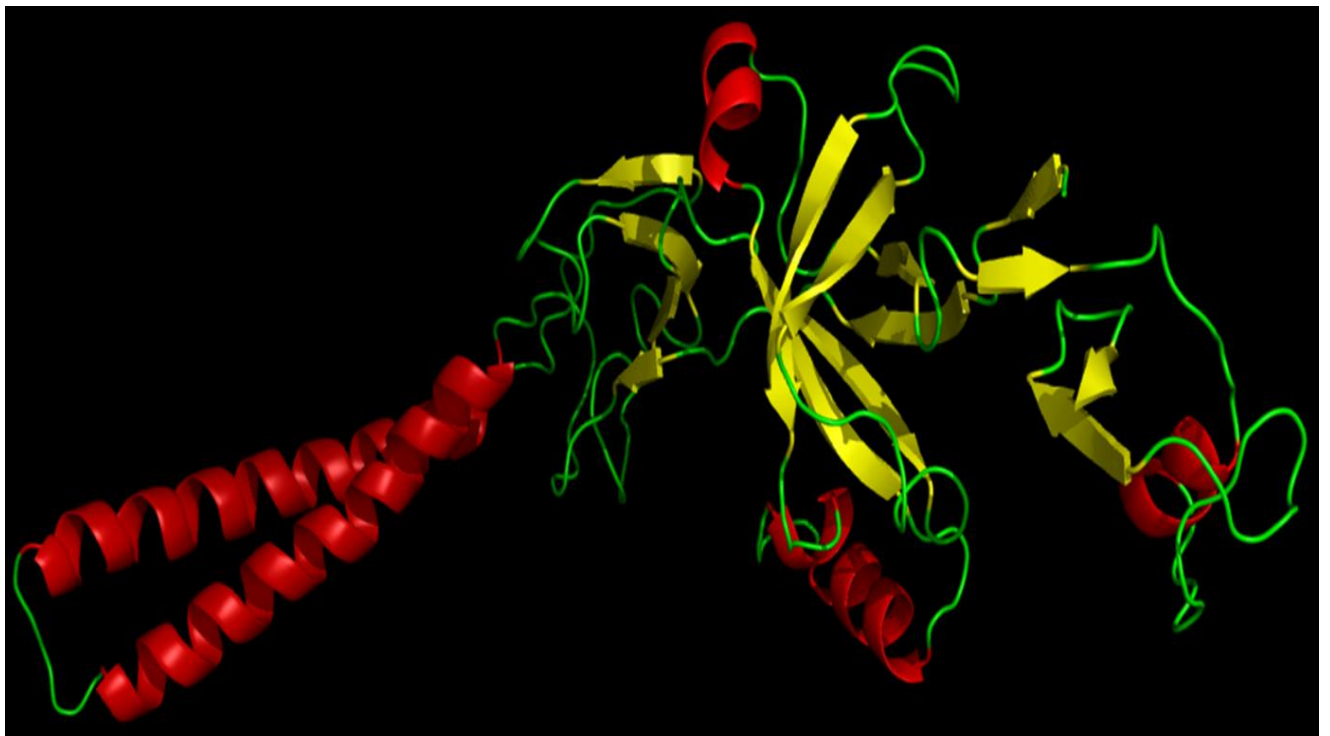
### 7.2. Raffinement

Le raffinement des modèles est important pour améliorer la qualité des modèles structuraux prédits. Le raffinement de ces modèles 3D prédits pour les protéines cutinases de *P. putida* a été réalisé par le programme en ligne ModRefiner. En effet, il s'agit d'une étape cruciale pour rapprocher les modèles de la précision expérimentale en vue d'études informatiques ultérieures (Adiyaman et McGuffin, 2019). Ces Structures tridimensionnelles prédites des cutinases de *P. putida* par Phyre<sup>2</sup> après le raffinement structural ont été visualisées et optimisées par le logiciel de visualisation moléculaire PyMOL (Voir **figures 18, 19, 20 et 21**).





**Figure 18:** Structure 3D prédite de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207) produite par Phyre<sup>2</sup>, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. Prédiction de la structure secondaire de la cutinase montrant l'hélice  $\alpha$  (rubans rouges), les feuillets  $\beta$  (flèches jaunes) et les boucles (vert).



**Figure 19:** Structure 3D prédite de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) produite par Phyre<sup>2</sup>, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. Prédiction de la structure secondaire de la cutinase montrant l'hélice  $\alpha$  (rubans rouges), les feuillets  $\beta$  (flèches jaunes) et les boucles (vert).

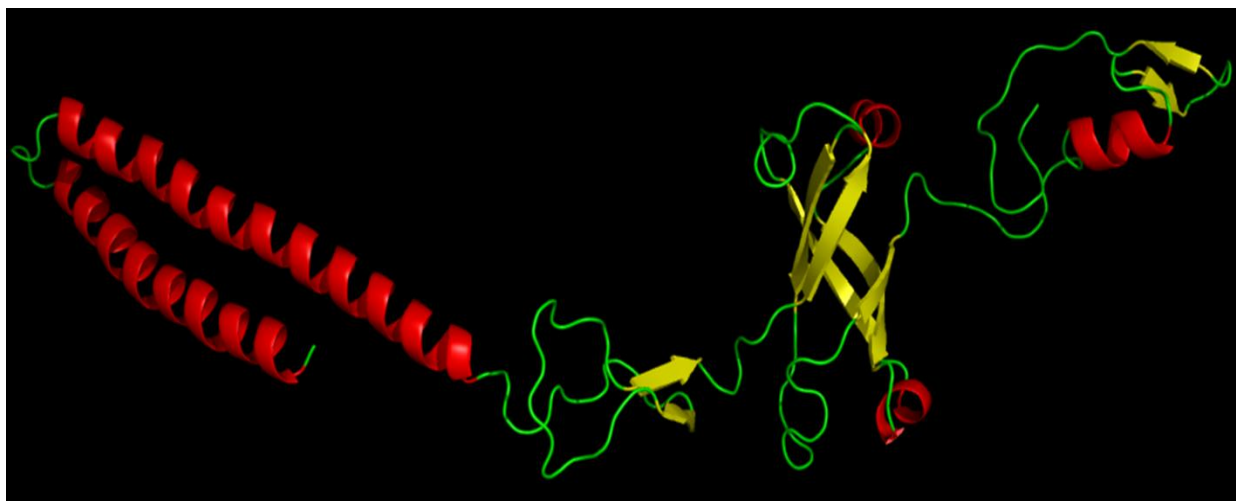


Figure 20: Structure 3D prédite de la cutinase de *P. putida* (gi|1767043782) produite par Phyre<sup>2</sup>, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. Prédiction de la structure secondaire de la cutinase montrant l'hélice  $\alpha$  (rubans rouges), les feuilletts  $\beta$  (flèches jaunes) et les boucles (vert).

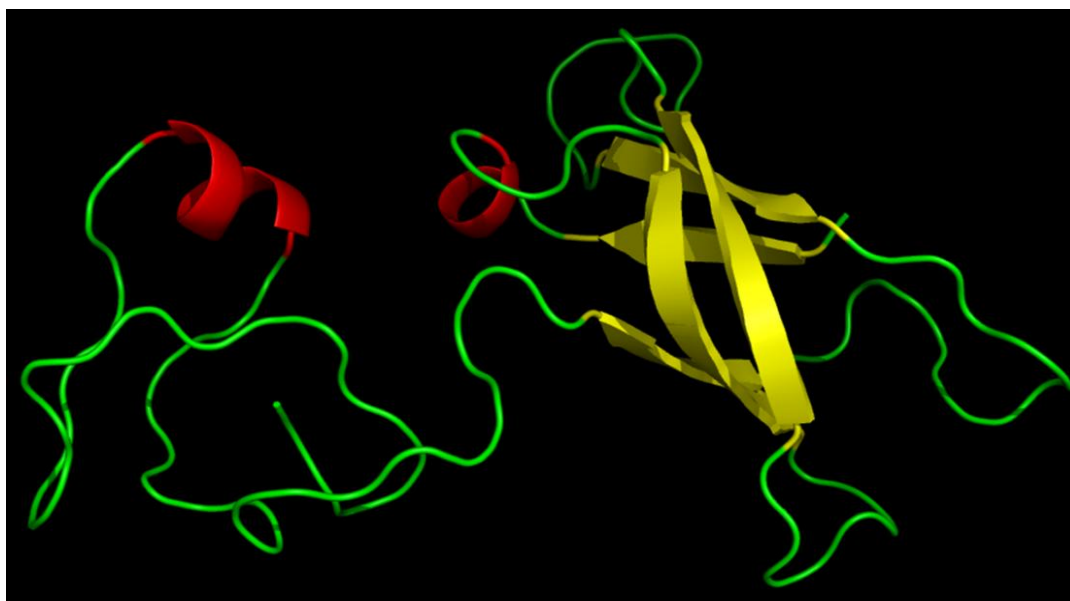
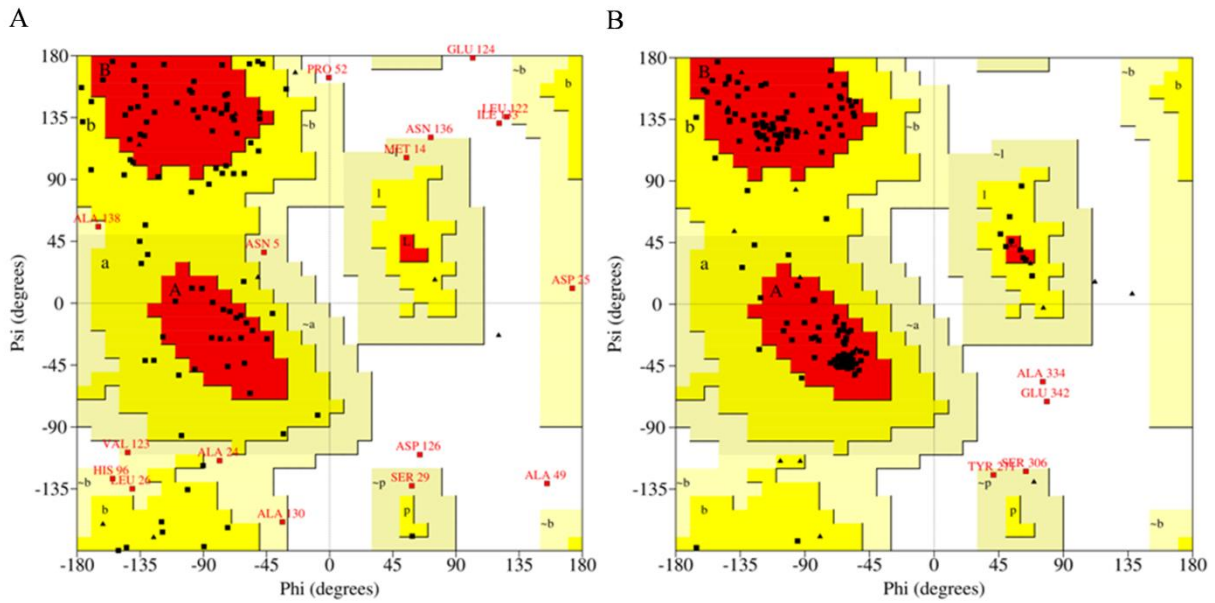


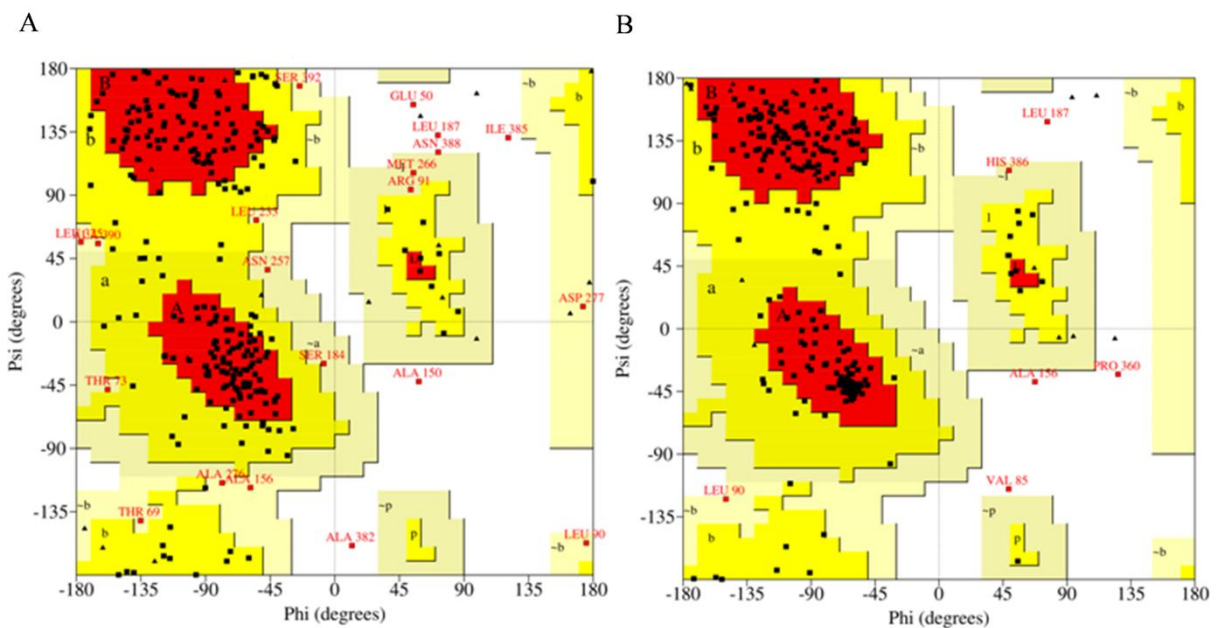
Figure 21: Structure 3D prédite de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729) produite par Phyre<sup>2</sup>, raffinée par le serveur ModRefiner et visualisée par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. Prédiction de la structure secondaire de la cutinase montrant l'hélice  $\alpha$  (rubans rouges), les feuilletts  $\beta$  (flèches jaunes) et les boucles (vert).

### 7.3. Validation

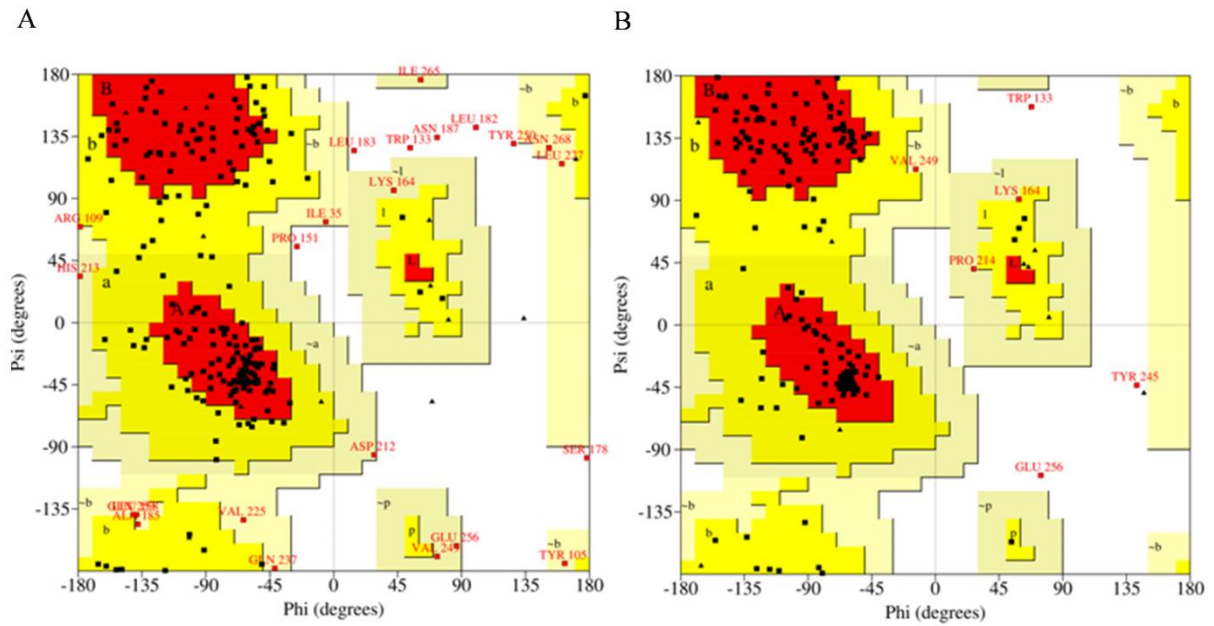
La qualité stéréochimique des modèles initiaux et des modèles raffinés des cutinases de *P. putida* a été évaluée après le processus de raffinement à l'aide de calculs du diagramme de Ramachandran calculés à l'aide du programme PROCHECK dans le serveur d'analyse et de vérification structurale, SAVES v6.0 (Voir figures 22, 23, 24 et 25).



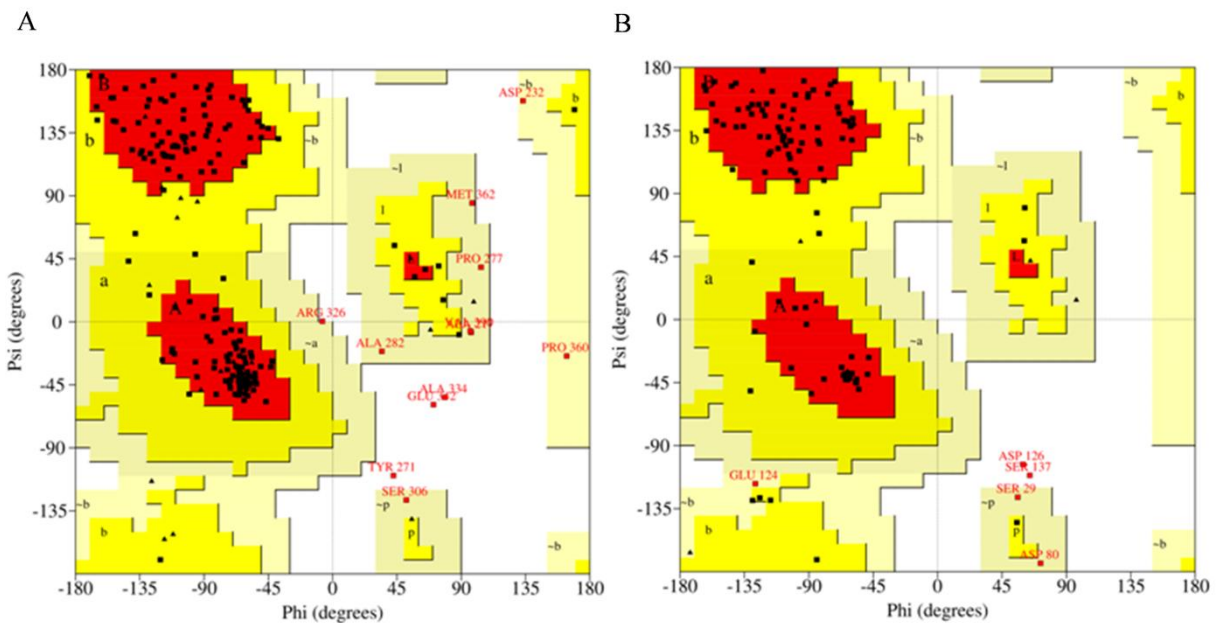
**Figure 22: Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de *P. putida* (gi|746571207) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).** A. modèle initial. B. Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont marquées comme A, B et L (rouge). Les régions supplémentaires autorisées sont marquées comme a, b, l et p (jaune), les régions généreusement autorisées sont marquées comme ~a, ~b, ~l et ~p (jaune clair) et les régions non autorisées (blanc). Tous les résidus non glycine et non proline sont représentés par des carrés noirs pleins, tandis que les glycines (non terminales) sont représentées par des triangles noirs pleins.



**Figure 23: Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).** A. modèle initial. B. Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont marquées comme A, B et L (rouge). Les régions supplémentaires autorisées sont marquées comme a, b, l et p (jaune), les régions généreusement autorisées sont marquées comme ~a, ~b, ~l et ~p (jaune clair) et les régions non autorisées (blanc). Tous les résidus non glycine et non proline sont représentés par des carrés noirs pleins, tandis que les glycines (non terminales) sont représentées par des triangles noirs pleins.



**Figure 24: Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de *P. putida* (gi1767043782) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).** A. modèle initial. B. Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont marquées comme A, B et L (rouge). Les régions supplémentaires autorisées sont marquées comme a, b, l et p (jaune), les régions généreusement autorisées sont marquées comme ~a, ~b, ~l et ~p (jaune clair) et les régions non autorisées (blanc). Tous les résidus non glycine et non proline sont représentés par des carrés noirs pleins, tandis que les glycines (non terminales) sont représentées par des triangles noirs pleins.



**Figure 25: Validation de la structure par le diagramme de Ramachandran du modèle de cutinase de *P. putida* (gi558521729) de PROCHECK (serveur SAVE v6.0).** A. modèle initial. B. Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont marquées comme A, B et L (rouge). Les régions supplémentaires autorisées sont marquées comme a, b, l et p (jaune), les régions généreusement autorisées sont marquées comme ~a, ~b, ~l et ~p (jaune clair) et les régions non autorisées (blanc). Tous les résidus non glycine et non proline sont représentés par des carrés noirs pleins, tandis que les glycines (non terminales) sont représentées par des triangles noirs pleins.

Dans le diagramme de Ramachandran de tous les modèles protéiques prédits (initiaux et raffinés) des cutinases de *P. putida*, les pourcentages de résidus présents dans les différentes régions ont été rapportés dans le **tableau 10**.

Par conséquent, le diagramme de Ramachandran de toutes les cutinases de *P. putida* a validé la structure des modèles 3D raffinés de ces protéines, car ces modèles suivent les angles dièdres du diagramme de Ramachandran occupés dans les régions favorables.

**Tableau 10: La validation de la prédiction des structures tertiaires originales et raffinées des cutinases de *P. putida* par les diagrammes de Ramachandran.**

Protein	Type du modèle	Region favorisée (%)	Region autorisée supplémentaire (%)	Region généreusement autorisée (%)	Region non autorisée (%)
gi 746571207	Initial	49.5	35.2	9.5	5.7
	Raffiné	89	8.7	1.2	1.2
gi 1944846450	Initial	65.4	26.8	5.4	2.3
	Raffiné	81.7	16.3	0.8	1.2
gi 1767043782	Initial	61.8	27.8	7.5	2.8
	Raffiné	84.4	13.2	0.9	1.4
gi 558521729	Initial	84.4	9.8	3.5	2.3
	Raffiné	82.9	12.4	2.9	1.9

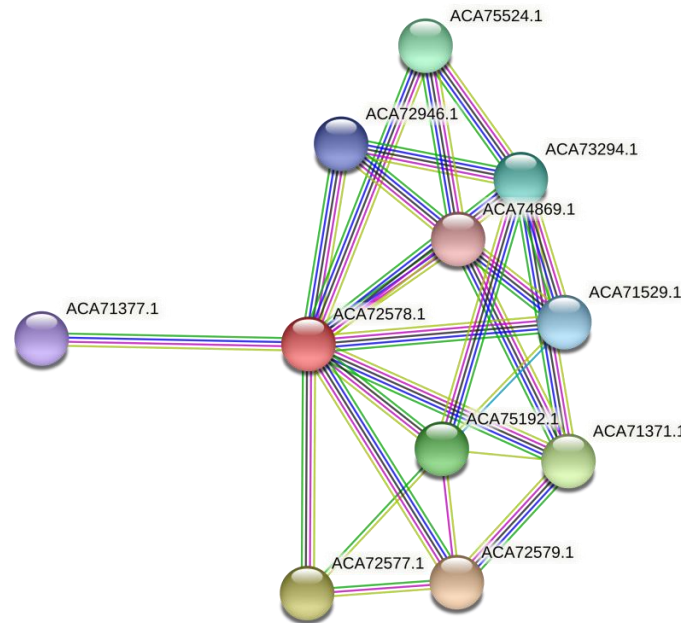
## 8. Analyse fonctionnelle

### 8.1. Interactions protéine-protéine

L'analyse fonctionnelle de la protéine (gi|746571207) a révélée dix interactions avec des partenaires protéiques potentielles dans le réseau d'interaction protéique tels que résolus par l'analyse de la base des données STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) v11.5. La protéine de requête (nœud rouge, ACA72578.1) avait dix protéines partenaires avec des scores de confiance de 0,997 à 0,507, qui indiquait le réseau fonctionnel parmi l'ensemble des protéines d'un organisme donné (ici la bactérie *Pseudomonas putida*).

Par conséquent, la protéine d'interaction la plus proche a été détectée avec le nœud le plus court, ACA72579.1 (transporteur Mfs, famille dha2, protéine de résistance multidrogue) et ayant un score de 0,997, alors que la protéine d'interaction distante a été détectée avec le nœud le plus distant, ACA74869.1 (membrane protéine de fusion, système d'efflux multidrogues) et ayant un score de 0,507.

L'interaction protéine-protéine de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207) générée par STRING est présentée à la **figure 26** et au **tableau 11**.



**Figure 26: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de *P. putida* (gi|746571207) détectée via la base de données STRING.** Le nœud rouge (cutinase de *P. putida*) et d'autres nœuds représentaient ses partenaires fonctionnels prédits de *P. putida* (tableau 11).

**Tableau 11: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207).**

Node	Annotation	Score
ACA72579.1	Mfs transporter, dha2 family, multidrug resistance protein	0.997
ACA72577.1	regulatory protein MarR	0.846
ACA71371.1	outer membrane efflux protein	0.787
ACA75192.1	outer membrane efflux protein	0.646
ACA75524.1	outer membrane efflux protein	0.525
ACA73294.1	Membrane fusion protein, multidrug efflux system	0.518
ACA71529.1	outer membrane efflux protein	0.516
ACA72946.1	outer membrane efflux protein	0.512
ACA71377.1	major facilitator superfamily MFS_1	0.507
ACA74869.1	Membrane fusion protein, multidrug efflux system	0.507

Concernant la protéine (gi|1944846450), la protéine de requête (nœud rouge, AGN79370.1) avait dix protéines partenaires avec des scores de confiance de 0, 843 à 0, 478.

Par conséquent, la protéine d'interaction la plus proche a été détectée avec le nœud le plus court, emrB (Multidrug resistance protein B) et ayant un score de 0,843, alors que la protéine d'interaction distante a été détectée avec le nœud le plus distant, AGN80217.1 (Secretion protein HylD) et ayant un score de 0,478.

L'interaction protéine-protéine de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) générée par STRING est présentée à la **figure 27** et au **tableau 12**.

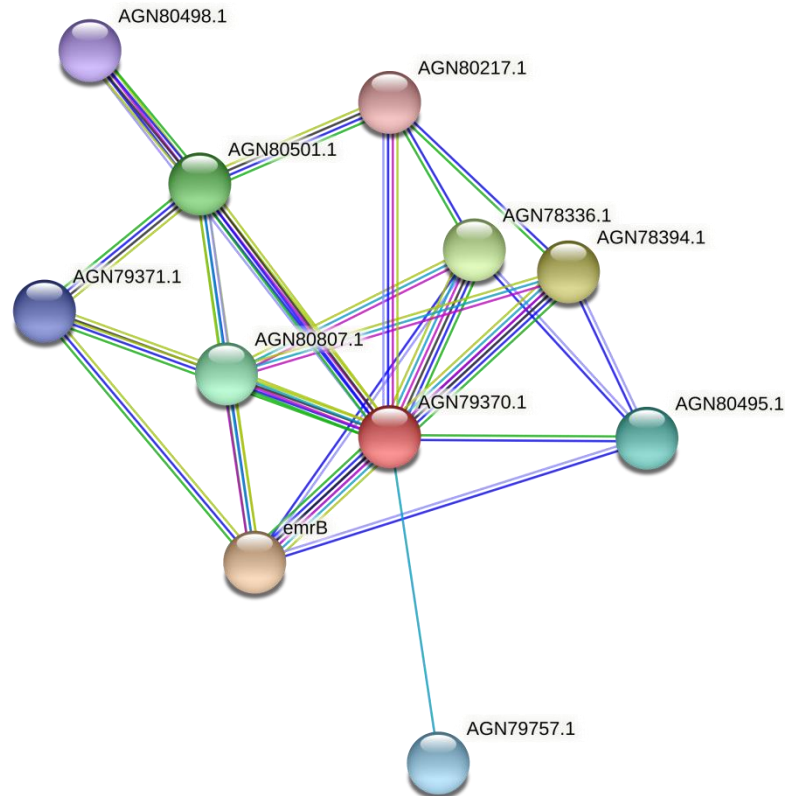


Figure 27: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) détectée via la base de données STRING. Le nœud rouge (cutinase de *P. putida*) et d'autres nœuds représentaient ses partenaires fonctionnels prédits de *P. putida* (tableau 12).

Tableau 12: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450).

Node	Annotation	Score
emrB	Multidrug resistance protein B	0.843
AGN78394.1	DSBA oxidoreductase	0.835
AGN78336.1	DSBA oxidoreductase	0.815
AGN80501.1	RND transporter	0.671
AGN80807.1	Channel protein TolC	0.665
AGN80495.1	MFS transporter	0.514
AGN79757.1	Catalyzes the hydration of gamma-carboxygeranoyl-CoA to 3-hydroxy-gamma-carboxygeranoyl-CoA	0.512
AGN79371.1	MarR family transcriptional regulator	0.500
AGN80498.1	Membrane protein	0.490
AGN80217.1	Secretion protein HylD	0.478

Le résultat détaillé d'analyse fonctionnelle (nom et nombre de partenaires protéiques potentiels ainsi que leurs scores) de la protéine (gi|1767043782) était le même par rapport à celui trouvé pour la protéine (gi|1944846450) de *P. putida* (Voir **figure 28** et au **tableau 13**).

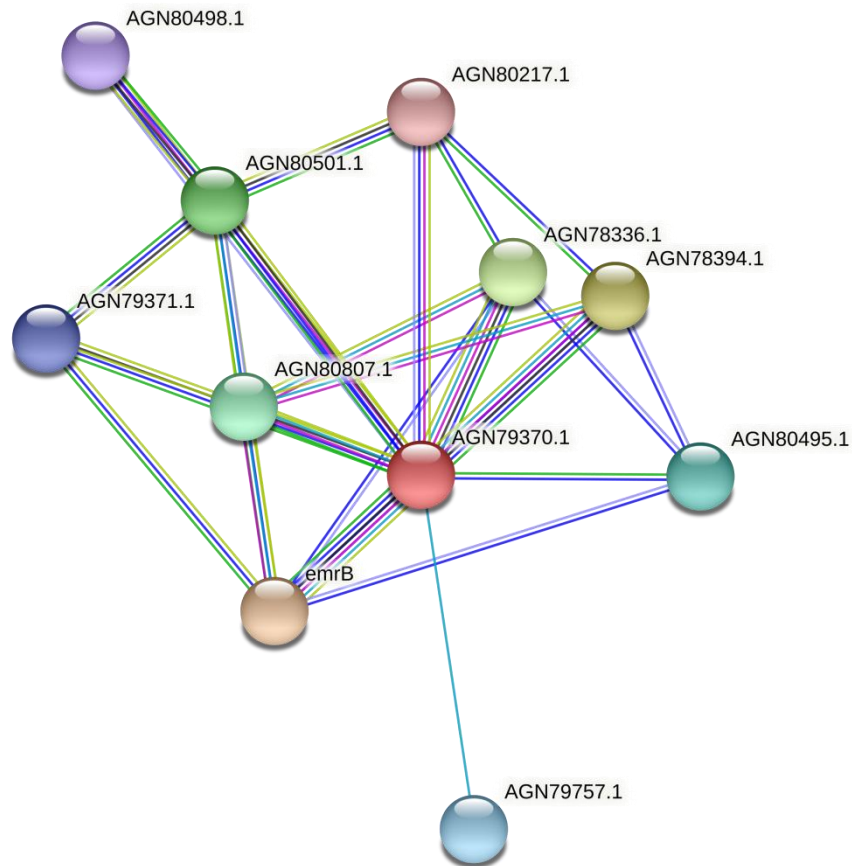


Figure 28: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de *P. putida* (gi|1767043782) détectée via la base de données STRING. Le nœud rouge (cutinase de *P. putida*) et d'autres nœuds représentaient ses partenaires fonctionnels prédits de *P. putida* (tableau 13).

Tableau 13: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de *P. putida* (gi|1767043782).

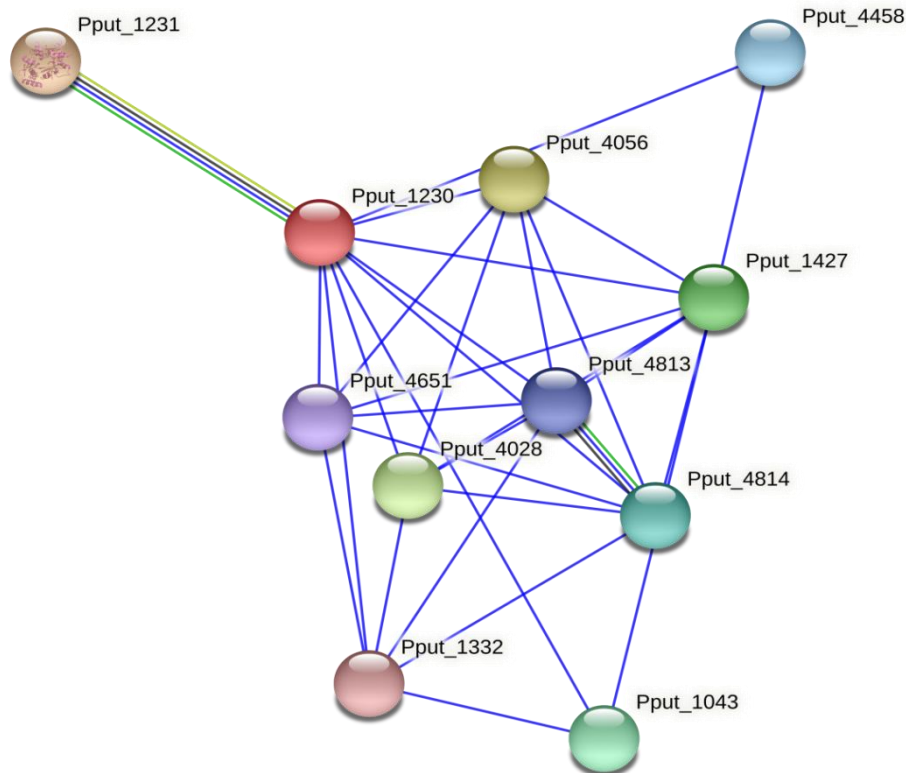
Node	Annotation	Score
emrB	Multidrug resistance protein B	0.843
AGN78394.1	DSBA oxidoreductase	0.835
AGN78336.1	DSBA oxidoreductase	0.815
AGN80501.1	RND transporter	0.671
AGN80807.1	Channel protein TolC	0.665
AGN80495.1	MFS transporter	0.514
AGN79757.1	Catalyzes the hydration of gamma-carboxygeranoyl-CoA to 3-hydroxy-gamma-carboxygeranoyl-CoA	0.512
AGN79371.1	MarR family transcriptional regulator	0.500
AGN80498.1	Membrane protein	0.490
AGN80217.1	Secretion protein HylD	0.478

Concernant la protéine (gi|558521729), la protéine de requête (nœud rouge, Pput\_1230) avait dix protéines partenaires avec des scores de confiance de 0,981 à 0,419.



Par conséquent, la protéine d'interaction la plus proche a été détectée avec le nœud le plus court, Pput\_1231 (Phosphatidyl glycerol lysyl transferase) et ayant un score de 0,981, alors que la protéine d'interaction distante a été détectée avec le nœud le plus distant, Pput\_1332 (annotation not available) et ayant un score de 0,419.

L'interaction protéine-protéine de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729) générée par STRING est présentée à la **figure 29** et au **tableau 14**.



**Figure 29: Analyse du réseau d'interaction protéine-protéine pour la cutinase de *P. putida* (gi|558521729) détectée via la base de données STRING.** Le nœud rouge (cutinase de *P. putida*) et d'autres nœuds représentaient ses partenaires fonctionnels prédits de *P. putida* (tableau 14).

**Tableau 14: Partenaires protéiques fonctionnels prédits de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729).**

Node	Annotation	Score
Pput_1231	Phosphatidyl glycerol lysyl transferase	0.981
Pput_4056	annotation not available	0.570
Pput_4028	annotation not available	0.478
Pput_1427	annotation not available	0.477
Pput_1043	TonB-dependent receptor	0.462
Pput_4814	Mig-14 family protein	0.462
Pput_4458	protein of unknown function DUF1656	0.431
Pput_4813	LmbE family protein	0.424
Pput_4651	annotation not available	0.420
Pput_1332	annotation not available	0.419

### 8.2. Recherche de motifs protéiques

À partir de l'étude fonctionnelle de la cutinase de *P. putida* (gi | 746571207), le serveur MOTIF finder a détecté deux motifs fonctionnels (**Figure 30**).

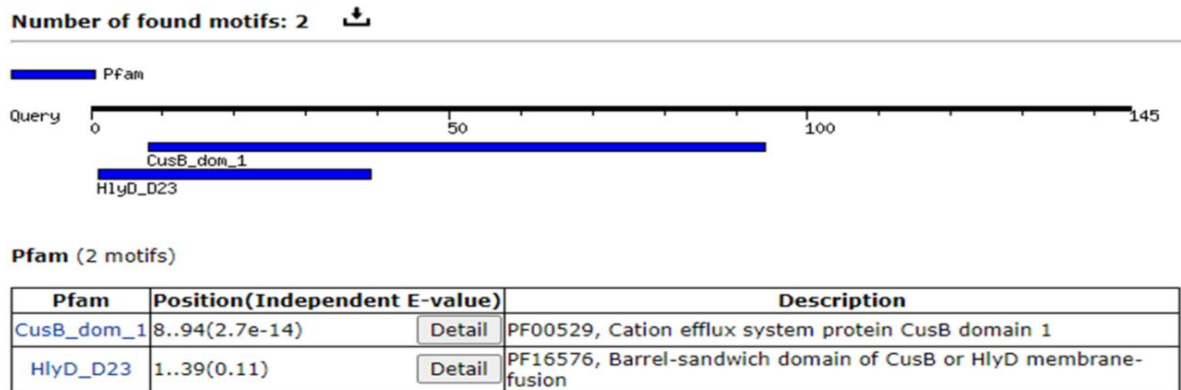


Figure 30: Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207)

Concernant la recherche des motifs protéiques pour la protéine (gi|1944846450) de *P. putida*, le serveur MOTIF finder a détecté dix huit motifs fonctionnels (**Figure 31**).

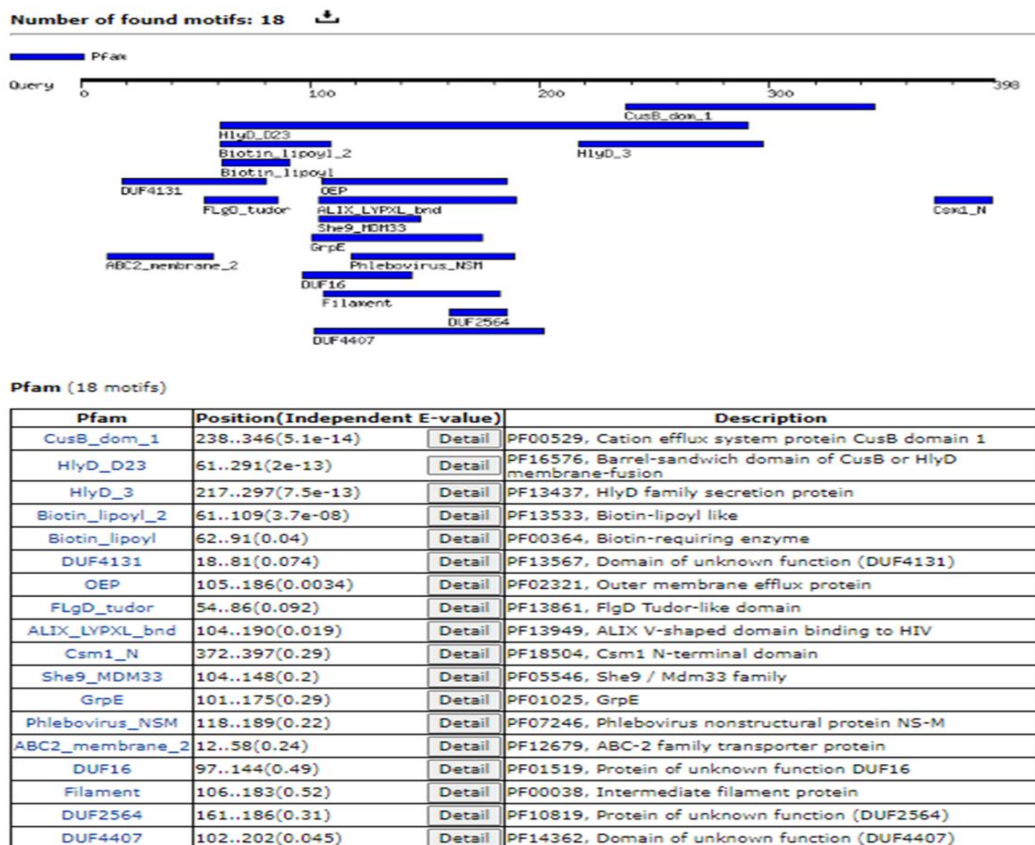


Figure 31: Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450).

Le serveur MOTIF finder a détecté sept motifs fonctionnels pour la protéine (gi|1767043782) de *P. putida* (**Figure 32**).

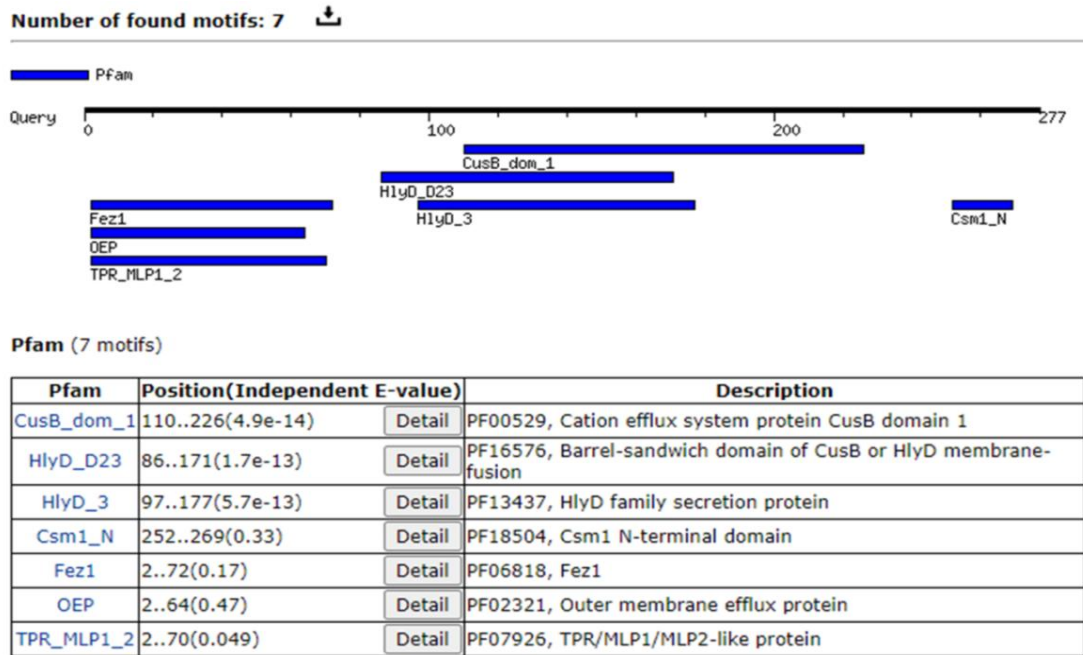


Figure 32: Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de *P. putida* (gi1767043782)

Le serveur MOTIF finder a détecté quatre motifs fonctionnels pour la protéine (gi|558521729) de *P. putida* (Figure 33). On remarque que parmi toutes protéines cutinases de *P. putida*, seulement la protéine (gi|558521729) annotée cutinase family protein possède le motif cutinase (Numéro d'accèsion NCBI Accession PF01083 dans la base des données Pfam) dans les positions 273..333 avec un E-value de 0.0029. De plus, les autres motifs trouvés par MOTIF dans finder cette protéine sont bacterial virulence protein (VirJ),  $\alpha/\beta$  hydrolase fold et Serine aminopeptidase, S33.

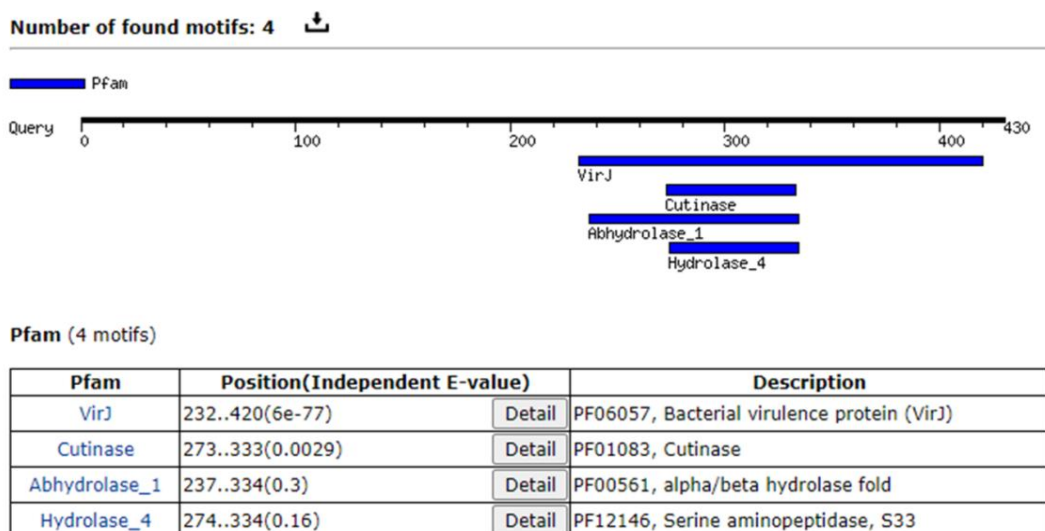


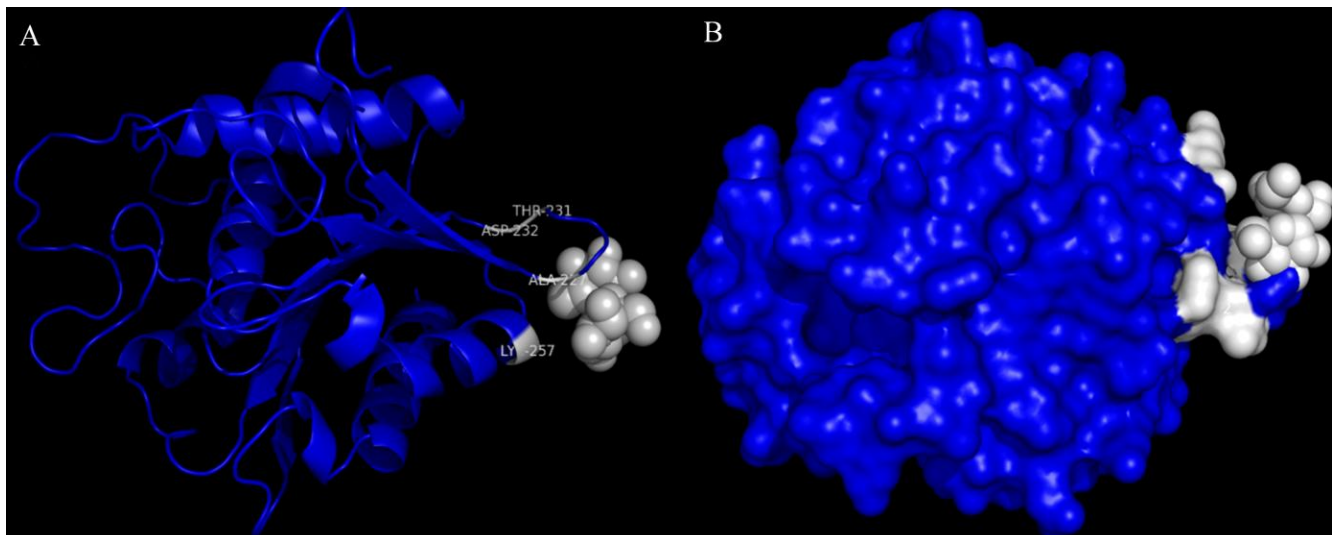
Figure 33: Résultat du MOTIFfinder montrant le motif fonctionnel de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729)

### 8.3. Analyse du site actif

Les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme (gi|746571207) de *P. putida* qui ont été déterminés par le serveur COFACTOR sont alanine 227, thréonine 231, aspartate 232 et lysine 257 par le serveur COFACTOR (**Figure 34**).

Le score « BS-score » est une mesure de la similarité locale (séquence et structure) entre le site de liaison du modèle et le site de liaison prédit dans la structure de la requête était pour cette protéine de 1,26 ( $> 0,5$ ), ce qui représente une correspondance locale significative entre le site de liaison prédit et le site de liaison du modèle.

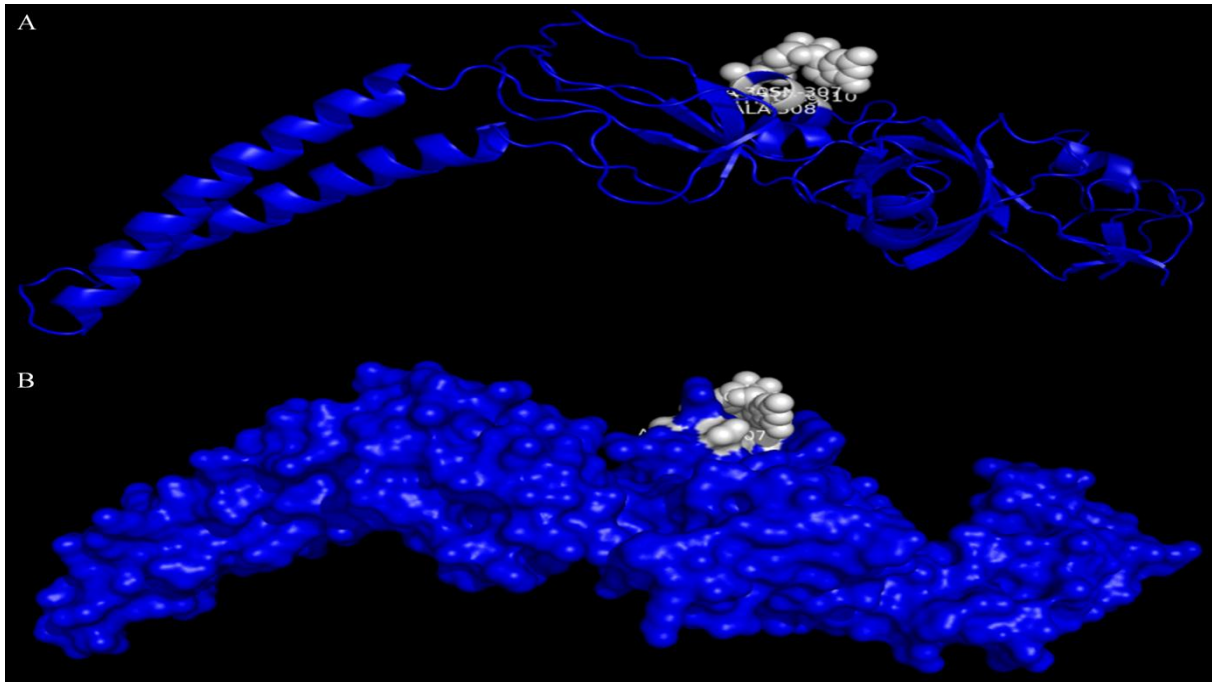
Dans notre cas, le meilleur modèle protéique avec un site de liaison similaire proposé par COFACTOR avec le meilleur BS-score était Haloalkane dehalogenase complexé avec le saccharose (ligand) chez *Bradyrhizobium japonicum*, pdb id, 3A2M.



**Figure 34: Sites de liaison des ligands de la cutinase de *P. putida* (gi|746571207) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. (A) montrant les sites de liaison de ligand (Ala 227, Thr 231, Asp 232 et Lys 257). (B) Vue de surface de la protéine avec son ligand dans le site actif. Les sphères représentent le ligand (blanc). Sites de liaison du ligand (blanc) avec la structure du modèle (bleu).**

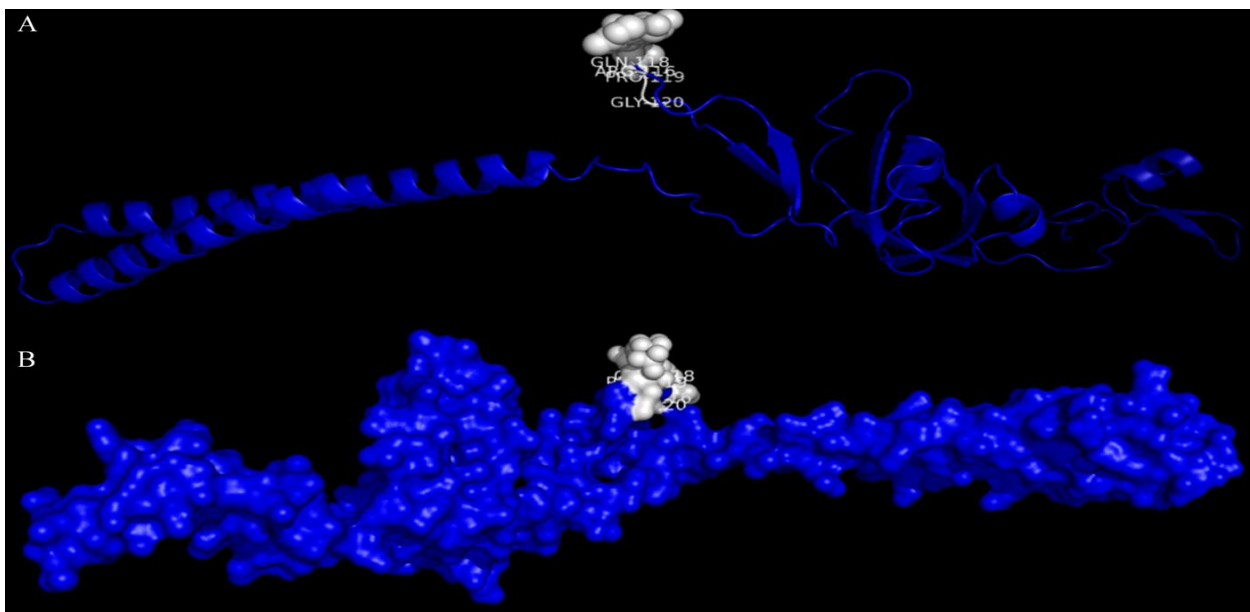
Les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme de *P. putida* (gi|1944846450) qui ont été déterminés alanine 305, asparagine 307, alanine 308, thréonine 309 et glycine 310 COFACTOR sont avec un BS-score qui est égal à 1.22 ( $> 0,5$ ) (**Figure 35**).

Le meilleur modèle protéique avec un site de liaison similaire proposé par COFACTOR avec le meilleur BS-score était similaire était Trypsin-modified Elongation Factor Tu complexé avec le GDP, Guanosine-5'-DiPhosphate (ligand) chez *Escherichia coli*, pdb id, 2hdnA.



**Figure 35: Sites de liaison des ligands de la cutinase de *P. putida* (gi|1944846450) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.** (A) montrant les sites de liaison de ligand (Ala 305, Asp 307, Ala 308, Thr 309 et Gly 310). (B) Vue de surface de la protéine avec son ligand dans le site actif. Les sphères représentent le ligand (blanc). Sites de liaison du ligand (blanc) avec la structure du modèle (bleu).

Les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme de *P. putida* (gi|1767043782) qui ont été déterminés par COFACTOR sont arginine 116, glycine 118, proline 119 et glycine 120 avec un BS-score qui est égal à 0.51 ( $> 0,5$ ) (**Figure 36**).



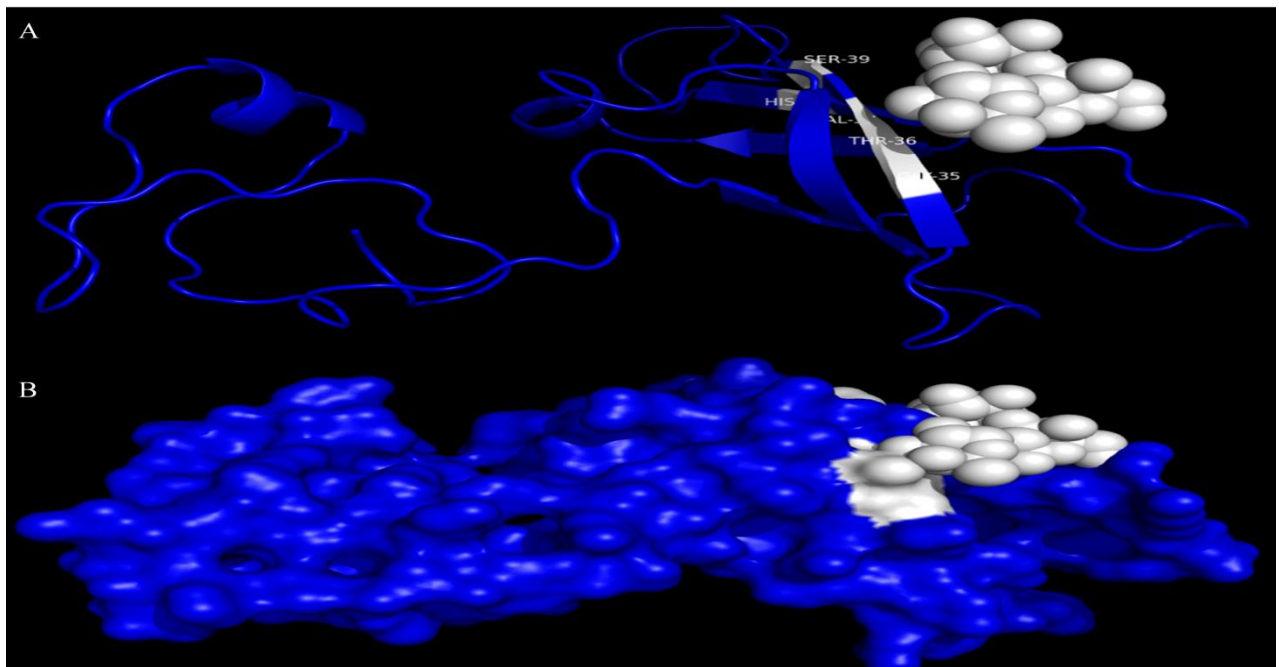
**Figure 36: Sites de liaison des ligands de la cutinase de *P. putida* (gi|1767043782) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3.** (A) montrant les sites de liaison de ligand (Arg 116, Gly 118, Pro 119 et Gly 120). (B) Vue de surface de la protéine avec son ligand dans le site actif. Les sphères représentent le ligand (blanc). Sites de liaison du ligand (blanc) avec la structure du modèle (bleu).

## Résultats et discussion

Le meilleur modèle protéique avec un site de liaison similaire proposé par COFACTOR avec le meilleur BS-score était multidrug ABC transporter Sav1866 complexé avec le ANP, Adenyl-5'-yl imidodiPhosphate (ligand) chez *Staphylococcus aureus*, pdb id, 2ONJ.

Les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme (gi|558521729) de *P. putida* qui ont été déterminés glycine 35, thréonine 36, valine 37, serine 39 et histidine 72 par COFACTOR sont avec un BS-score qui est égal à 0.93 (> 0,5) (**Figure 37**).

Le meilleur modèle protéique avec un site de liaison similaire proposé par COFACTOR avec le meilleur BS-score était P Domain VA387 complexé avec UUU (ligand) chez Norovirus, pdb id, 2obtA.



**Figure 37:** Sites de liaison des ligands de la cutinase de *P. putida* (gi|558521729) prédits par COFACTOR et visualisés par le logiciel de graphisme moléculaire PyMOL 2.3. (A) montrant les sites de liaison de ligand (Gly 35, Thr 36, Val 37, Ser 39 et His 72). (B) Vue de surface de la protéine cutinase avec ligand dans le site actif exposé de la poche. Les sphères représentent le ligand (blanc). Sites de liaison du ligand (blanc) avec structure cutinase (bleu).

L'ensemble de ces résultats de caractérisation bioinformatique des cutinases de la bactérie *P. putida* suggère que le meilleur candidat potentiel protéique pour être produit dans un system d'expression hétérologue est la cutinase (gi|558521729) qui est annotée "cutinase family protein". Cette protein possède, entre autres, un motif de la famille des cutinases et un motif de la famille des hydrolases.

En effet, des études ont montré que les enzymes cutinases appartiennent à la classe des serine estérases (enzymes à serine) et à la super famille des hydrolases avec un repliement

$\alpha/\beta$ , un motif GX SXG conservé et une triade catalytique Ser-His-Asp/Glu « S-H-D/E» (Chen *et al.*, 2008). Cet ordre de séquence d'acides aminés dans la triade catalytique chez les cutinases correspond également à d'autres types d'enzymes lipases (Martinez *et al.*, 1994). De plus, La sérine catalytique de l'enzyme cutinase est située au milieu d'une boucle entre un brin  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  (Carvalho *et al.*, 1999).

Nos résultats de l'alignement multiple des cutinases de *P. putida* de recherche de motif protéique et l'analyse du site actif pour la protéine cutinase (gi|558521729) sont comparables à rapport à l'étude *in silico* de cutinase de *Pseudomonas fluorescence* dans l'analyse fonctionnelle enzymatique (Bakli *et al.*, 2021).

En outre, nos résultats sont en accord avec travaux montrant que contrairement aux lipases, qui ont une structure secondaire ou « coiffe » hydrophobe qui recouvre le site actif, la plupart des cutinases n'ont pas leur site actif catalytique protégé “site actif non couvert” (Martínez et Maicas, 2021) et que la superfamille des hydrolases  $\alpha/\beta$  possède sa serine catalytique exposée au solvant avec un site actif flexible (Zerva *et al.*, 2021). Une exception de cette caractéristique est le site actif de la cutinase fongique de *Trichoderma reesei*, qui a un site actif couvert, similaire à une lipase (Roussel *et al.*, 2014).

De plus, ces caractéristiques enzymatiques structurales et fonctionnelles induisent une adaptation du site actif de l'enzyme cutinase à de différents substrats et à de substrats de, relativement, grande taille comme la cutine « polymères naturels » (Bakli *et al.*, 2021) mais aussi aux polymères synthétiques qui peuvent facilement accéder au site active de la cutinase (Martinez *et al.*, 1992).

Notre étude bioinformatique fonctionnelle et en particulier la prédiction du site actif des enzymes cutinases de *P. putida* nécessite plus d'investigation des ligands et d'analyse d'arrimage moléculaire (docking) afin de prédire la (les) conformation (s) en termes de positions et orientations relatives les plus favorables du ligand au sein de son récepteur pour former un complexe enzymatique stable.

**Conclusion**

**et**

**perspectives**



Les cutinases sont des enzymes complexes produites par de nombreux micro-organismes, notamment des champignons et des bactéries, qui dégradent la cutine de biopolyester insoluble. Il existe de nombreux domaines de l'industrie, notamment l'alimentation, l'agriculture, la désintoxication, les produits laitiers, le textile, la lessive, les produits chimiques et l'industrie pharmaceutique, où les cellulases microbiennes ont une grande application. L'analyse *in silico* des caractéristiques physico-chimiques et autres d'une protéine est donc très importante pour avoir un aperçu théorique de l'enzyme d'intérêt. Cette étude présente la première analyse structurale et fonctionnelle rapportée des cutinases de *Pseudomonas putida*.

En raison de la non-disponibilité des structures cristallines tridimensionnelles de certaines protéines, l'analyse *in silico* et la modélisation par homologie à partir de la séquence primaire protéique est l'une des méthodes très utiles pour étudier les aspects structure-fonction de la protéine d'intérêt.

Notre étude fournit une approche fructueuse pour la sélection des enzymes cutinases de *P. putida* avec les propriétés appropriées, par exemple les propriétés physicochimiques, hydrophobicité et structure et fonction en utilisant les outils bioinformatiques ainsi que les informations contenues dans les bases de données à partir d'un hôte bactérien prometteur pour l'industrie et la valorisation de la biomasse végétale qui est la bactérie *Pseudomonas putida*.

De plus, cette étude de caractérisation bioinformatique serait un outil prometteur afin de concevoir des cutinases aux caractéristiques souhaitables dans le but de les exploiter au niveau industriel. Afin de répondre à la forte demande des secteurs industriels et agroalimentaires pour l'enzyme cutinase, il est nécessaire à l'avenir de produire davantage cette protéine à grande échelle.

Par ailleurs, les enzymes cutinases de *P. putida* caractérisée théoriquement dans notre étude peuvent être testées expérimentalement en présence de différentes conditions industrielles comme par exemple une large gamme de pHs, de températures, de salinité, de pression osmotique, d'agents réducteurs, en présence des ions, des solvants organiques, des métaux lourds, ...etc.

Ces outils bioinformatiques proposés pour caractériser les cutinases de *P. putida* sont prérequis pour prédire les caractéristiques structurales et fonctionnelles, facilitant ainsi l'analyse expérimentale des protéines. L'analyse expérimentale consiste à produire ces protéines recombinantes ou une d'entre elles dans un system bactérien d'expression hétérologue et de clonage (*Escherichia coli*) par exemple, en purifiant la protéine d'intérêt pour des études structurales et/ou fonctionnelles.

*Références*  
*bibliographiques*

## *Références bibliographiques*

Adiyaman, R., and McGuffin, L.J. (2019). Methods for the refinement of protein structure 3D models. *International journal of molecular sciences* 20, 2301.

Armenteros, J.A., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* 37, 420-423.

Bakli, M., Bouras, N., Paşcalău, R., and Şmuleac, L. (2021). *In silico* characterization of a cutinase from *Pseudomonas fluorescens*. *Research Journal of Agricultural Science* 53.

Bakli, M., Karim, L., Mokhtari-Soulimane, N., Merzouk, H., and Vincent, F. (2020). Biochemical characterization of a glycosyltransferase Gtf3 from *Mycobacterium smegmatis*: a case study of improved protein solubilization. *3 Biotech* 10, 1-13.

Bakli, M., and Zenasni, A. (2019). Isolation of fluorescent pseudomonas spp. strains from rhizosphere agricultural soils and assessment of their role in plant growth and phytopathogen biocontrol. *Research Journal of Agricultural Science* 51, 20-29.

Balhuizen, M.D., Veldhuizen, E.J., and Haagsman, H.P. (2021). Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development. *Frontiers in microbiology* 12, 629090.

Berto, P., Comménil, P., Belingheri, L., and Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS microbiology letters* 180, 183-189.

Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S., and Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14, 1023-1031.

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols* 4, 1-13.

Cambillau, C., Longhi, S., Nicolas, A., and Martinez, C. (1996). Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. *Current opinion in structural biology* 6, 449-455.

Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R., and Cabral, J.M. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and bioengineering* 66, 17-34.

Chen, S., Su, L., Chen, J., and Wu, J. (2013). Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology advances* 31, 1754-1767.

Chen, S., Tong, X., Woodard, R.W., Du, G., Wu, J., and Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of biological chemistry* 283, 25854-25862.

## Références bibliographiques

Clark, D.P., and Pazdernik, N.J. (2016). Chapter 1 - Basics of Biotechnology. In *Biotechnology (Second Edition)*, D.P. Clark, and N.J. Pazdernik, eds. (Boston: Academic Cell), pp. 1-31.

Coordinators, N.R. (2018). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research* 46, D8.

Dahlström, K.M. (2015). From protein structure to function with bioinformatics. In *Faculty of Science and Engineering (Turku, Finland: Åbo Akademi University)*, pp. 119.

DeLano, W. (2019). *The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.3. 1.* Schrodinger LLC: New York, NY, USA.

Dickman, M.B., Patil, S.S., and Kolattukudy, P. (1982). Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. *Physiological Plant Pathology* 20, 333-347.

Dimarogona, M., Nikolaiivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., and Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1850, 2308-2317.

Domínguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2011). An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Science* 181, 77-84.

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

Elmore, J.R., Dexter, G.N., Salvachúa, D., O'Brien, M., Klingeman, D.M., Gorday, K., Michener, J.K., Peterson, D.J., Beckham, G.T., and Guss, A.M. (2020). Engineered *Pseudomonas putida* simultaneously catabolizes five major components of corn stover lignocellulose: Glucose, xylose, arabinose, p-coumaric acid, and acetic acid. *Metabolic Engineering* 62, 62-71.

Fett, W., Wijey, C., Moreau, R., and Osman, S. (2000). Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Letters in applied microbiology* 31, 25-29.

Fich, E.A., Segerson, N.A., and Rose, J.K. (2016). The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual review of plant biology*, 207-233.

Fickers, P., Destain, J., and Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 12.

Fortuna, S., Cespugli, M., Todea, A., Pellis, A., and Gardossi, L. (2021). Criteria for Engineering Cutinases: Bioinformatics Analysis of Catalophores. *Catalysts* 11, 784.

## *Références bibliographiques*

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The proteomics protocols handbook, 571-607.

Geourjon, C., and Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* 11, 681-684.

Gill, S.C., and Von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical biochemistry* 182, 319-326.

Graça, J., and Santos, S. (2007). Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromolecular bioscience* 7, 128-135.

Guruprasad, K., Reddy, B.B., and Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection* 4, 155-161.

Hall, T., Biosciences, I., and Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2, 60-61.

Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1620, 1-7.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)* 14, 378-379.

Hoda, A., Tafaj, M., and Sallaku, E. (2021). *In silico* Structural, Functional and Phylogenetic Analyses of cellulase from *Ruminococcus albus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 1-15.

Hong, L., Brown, J., Segerson, N.A., Rose, J.K., and Roeder, A.H. (2017). CUTIN SYNTHASE 2 maintains progressively developing cuticular ridges in *Arabidopsis* sepals. *Molecular Plant* 10, 560-574.

Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., and Jenks, M.A. (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal* 60, 363-377.

Jeffree, C.E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. *Annual plant reviews* 23, 11-125.

Jelsch, C., Longhi, S., and Cambillau, C. (1998). Packing forces in nine crystal forms of cutinase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 31, 320-333.

## *Références bibliographiques*

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10, 845-858.

Kim, H., Choi, D., and Suh, M.C. (2017). Cuticle ultrastructure, cuticular lipid composition, and gene expression in hypoxia-stressed *Arabidopsis* stems and leaves. *Plant cell reports* 36, 815-827.

Kissinger, M., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y., Fallik, E., Elkind, Y., Jenks, M.A., and Goodwin, M.S. (2005). Characterization of physiological and biochemical factors associated with postharvest water loss in ripe pepper fruit during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130, 735-741.

Kolattukudy, P.E. (2001). Polyesters in higher plants. *Biopolyesters*, 1-49.

Köller, W., Yao, C., Trial, F., and Parker, D. (1995). Role of cutinase in the invasion of plants. *Canadian Journal of Botany* 73, 1109-1118.

Kong, L., Liu, Y., Zhi, P., Wang, X., Xu, B., Gong, Z., and Chang, C. (2020). Origins and evolution of cuticle biosynthetic machinery in land plants. *Plant physiology* 184, 1998-2010.

Kunst, L., and Samuels, A.L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research* 42, 51-80.

Kunst, L., and Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current opinion in plant biology* 12, 721-727.

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157, 105-132.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography* 26, 283-291.

Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., and Vogg, G. (2007). The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a  $\beta$ -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant physiology* 144, 1667-1679.

Leroch, M., Kleber, A., Silva, E., Coenen, T., Koppenhöfer, D., Shmaryahu, A., Valenzuela, P.D., and Hahn, M. (2013). Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryotic cell* 12, 614-626.

## *Références bibliographiques*

- Loeschcke, A., and Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 6197-6214.
- Loeschcke, A., and Thies, S. (2020). Engineering of natural product biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Current opinion in biotechnology* 65, 213-224.
- Longhi, S., and Cambillau, C. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1441, 185-196.
- Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A., and Cambillau, C. (1997a). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *Journal of molecular biology* 268, 779-799.
- Longhi, S., Knoops-Mouthuy, E., Cambillau, C., Mannesse, M., Verheij, H.M., De Haas, G.H., and Egmond, M. (1997b). Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Science* 6, 275-286.
- López-Casado, G., Matas, A.J., Domínguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2007). Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* 58, 3875-3883.
- Löwe, H., Schmauder, L., Hobmeier, K., Kremling, A., and Pflüger-Grau, K. (2017). Metabolic engineering to expand the substrate spectrum of *Pseudomonas putida* toward sucrose. *Microbiologyopen* 6, e00473.
- Lugani, Y., and Sooch, B.S. (2017). *In silico* characterization of cellulases from genus *Bacillus*. *Int J Curr Res Rev* 9, 30-37.
- Mardani, G., Ahankoub, M., Alikhani Faradonbeh, M., Raeisi Shahraki, H., and Fadaei, A. (2022). Biodegradation of ceftriaxone in soil using dioxygenase-producing genetically engineered *Pseudomonas putida*. *Bioremediation Journal*, 1-12.
- Martin-Pascual, M., Batianis, C., Bruinsma, L., Asin-Garcia, E., Garcia-Morales, L., Weusthuis, R.A., van Kranenburg, R., and Dos Santos, V.A.M. (2021). A navigation guide of synthetic biology tools for *Pseudomonas putida*. *Biotechnology Advances* 49, 107732.
- Martínez, A., and Maicas, S. (2021). Cutinases: Characteristics and Insights in Industrial Production. *Catalysts* 11, 1194.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., and Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356, 615-618.

## Références bibliographiques

Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Cudrey, C., Verger, R., and Cambillau, C. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry* 33, 83-89.

Masaki, K., Kamini, N.R., Ikeda, H., and Iefuji, H. (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7548-7550.

McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404-405.

Migula, W. (1894). Über ein neues system der bakterien. arbeiten aus dem bakteriologischen institut der technischen hochschule zu karlsruhe.

Mohamad Sobri, M.F., Abd-Aziz, S., Abu Bakar, F.D., and Ramli, N. (2020). *In-Silico* Characterization of Glycosyl Hydrolase Family 1  $\beta$ -Glucosidase from *Trichoderma asperellum* UPM1. *International journal of molecular sciences* 21, 4035.

Nikel, P.I., and de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic engineering* 50, 142-155.

Novy, V., Carneiro, L.V., Shin, J.H., Larsbrink, J., and Olsson, L. (2021). Phylogenetic analysis and in-depth characterization of functionally and structurally diverse CE5 cutinases. *Journal of biological chemistry*, 101302.

Nyyssölä, A. (2015). Which properties of cutinases are important for applications? *Applied microbiology and biotechnology* 99, 4931-4942.

Nyyssölä, A., Pihlajaniemi, V., Häkkinen, M., Kontkanen, H., Saloheimo, M., and Nakari-Setälä, T. (2014). Cloning and characterization of a novel acidic cutinase from *Sirococcus conigenus*. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 3639-3650.

Nyyssölä, A., Pihlajaniemi, V., Järvinen, R., Mikander, S., Kontkanen, H., Kruus, K., Kallio, H., and Buchert, J. (2013). Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme and microbial technology* 52, 272-278.

Palleroni, N.J. (2003). Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 149, 1-7.

Palleroni, N.J. (2010). The *Pseudomonas* story (Wiley Online Library), pp. 1377-1383.

Pellequer, J.-L. (1999). Modélisation moléculaire par homologie des protéines: ses applications en Biologie et en Bioinformatique (Faculté des sciences de Luminy).



## *Références bibliographiques*

Philippe, G., Gaillard, C., Petit, J., Geneix, N., Dalgalarrodo, M., Bres, C., Mauxion, J.-P., Franke, R., Rothan, C., and Schreiber, L. (2016). Ester cross-link profiling of the cutin polymer of wild-type and cutin synthase tomato mutants highlights different mechanisms of polymerization. *Plant physiology* 170, 807-820.

Philippe, G., Sørensen, I., Jiao, C., Sun, X., Fei, Z., Domozych, D.S., and Rose, J.K. (2020). Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current opinion in plant biology* 55, 11-20.

Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Légeret, B., Verdier, G., Beisson, F., and Pinot, F. (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytologist* 215, 173-186.

Pio, T.F., and Macedo, G.A. (2009). Cutinases: Properties and Industrial Applications. *Advances in applied microbiology* 66, 77-95.

Qamar, H., and Ali, S. (2021). Review on production and purification of microbial cutinase for biotechnological applications. *International Journal of Biology and Biotechnology* 18, 83-91.

Roussel, A., Amara, S., Nyssölä, A., Mateos-Diaz, E., Blangy, S., Kontkanen, H., Westerholm-Parvinen, A., Carrière, F., and Cambillau, C. (2014). A cutinase from *Trichoderma reesei* with a lid-covered active site and kinetic properties of true lipases. *Journal of molecular biology* 426, 3757-3772.

Roy, A., Yang, J., and Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic acids research* 40, W471-W477.

Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S.M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., and Fernie, A.R. (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant physiology* 144, 1012-1028.

Schmitz, S., Nies, S., Wierckx, N., Blank, L.M., and Rosenbaum, M.A. (2015). Engineering mediator-based electroactivity in the obligate aerobic bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in microbiology* 6, 284.

Schrag, J.D., and Cygler, M. (1997). [4] Lipases and  $\alpha\beta$  hydrolase fold. *Methods in enzymology* 284, 85-107.

Schreiber, L. (2010). Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in plant science* 15, 546-553.

## *Références bibliographiques*

Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.-P., and Nawrath, C. (2000). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *The Plant Cell* *12*, 721-737.

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

Singh, N., Upadhyay, S., Jaiswar, A., and Mishra, N. (2016). *In silico* analysis of protein. *J Bioinform Genomics Proteomics* *1*, 1007.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., and Bork, P. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research* *49*, D605-D612.

Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2010). Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology* *51*, 123-131.

Takahashi, Y., Tsubaki, S., Sakamoto, M., Watanabe, S., and AZUMA, J.I. (2012). Growth-dependent chemical and mechanical properties of cuticular membranes from leaves of *Sonneratia alba*. *Plant, Cell & Environment* *35*, 1201-1210.

Tanaka, T., Tanaka, H., Machida, C., Watanabe, M., and Machida, Y. (2004). A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* *37*, 139-146.

Tsubaki, S., Ozaki, Y., Yonemori, K., and Azuma, J.-i. (2012). Mechanical properties of fruit-cuticular membranes isolated from 27 cultivars of *Diospyros kaki* Thunb. *Food chemistry* *132*, 2135-2139.

Umang, M., Astha, J., Aastha, C., Neha, A., and Vibha, R. (2012). Computational structural and functional characterization of protein family: Key for the hidden mystery. *J Pharm Res* *5*, 3643-3649.

Volke, D.C., Calero, P., and Nickel, P.I. (2020). *Pseudomonas putida*. *Trends Microbiol* *28*, 512-513.

Walker, J.M. (2005). *The proteomics protocols handbook* (Springer).

## *Références bibliographiques*

Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D.C., Nickel, P.I., and Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. Applied microbiology and biotechnology 104, 7745-7766.

Woloshuk, C.P., and Kolattukudy, P. (1986). Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. Proceedings of the National Academy of Sciences 83, 1704-1708.

Xu, D., and Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. Biophysical journal 101, 2525-2534.

Yeats, T.H., and Rose, J.K. (2013). The formation and function of plant cuticles. Plant physiology 163, 5-20.

Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu, C.H., and Hwang, J.K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 64, 643-651.

Zerva, A., Pentari, C., Ferousi, C., Nikolaiivits, E., Karnaouri, A., and Topakas, E. (2021). Recent advances on key enzymatic activities for the utilisation of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 126058.

Zhang, Y., Chen, S., Xu, M., Cavoco-Paulo, A., Wu, J., and Chen, J. (2010). Characterization of *Thermobifida fusca* cutinase-carbohydrate-binding module fusion proteins and their potential application in bioscouring. Applied and Environmental Microbiology 76, 6870-6876.

Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y.G., and Xia, Y. (2018). Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. Frontiers in plant science 9, 1088.

## Résumé

Les cutinases (E.C. 3.1.1.74) sont des hydrolases ester carboxylique à serine, qui dégradent la cutine, un polyester aliphatique insoluble excrété par la cuticule de la plante. Ces enzymes sont utilisées dans divers secteurs industriels tels que l'alimentation, l'agriculture, la détoxification, le textile, la blanchisserie, la chimie et l'industrie pharmaceutique. Les cutinases sont produites par les champignons et les bactéries phytopathogènes. Cependant, il y a relativement peu de connaissance sur les cutinases bactériennes. Plusieurs caractéristiques d'un hôte prometteur pour l'industrie et la valorisation de la biomasse végétale de la bactérie *Pseudomonas putida* ont été démontrées comme son métabolisme remarquablement polyvalent, sa capacité unique à s'adapter à des conditions environnementales difficiles, et à résister aux réactions redox difficiles, aux solvants industriels et aux stress oxydatifs.

L'objectif de ce travail était de caractériser les cutinases de *P. putida* en utilisant des outils bioinformatiques. Par conséquent, l'analyse détaillée *in silico* de quatre protéines de cutinase a été réalisée en ce qui concerne leurs propriétés physicochimiques, la localisation subcellulaire, la prédiction de la solubilité et la prédiction du signal peptidique, les prédictions de structure secondaire et tertiaire basées sur l'approche de modélisation d'homologie et l'analyse fonctionnelle. Cette étude contribue à la compréhension des propriétés structurales et fonctionnelles des cutinases de *P. putida* permettant leur large production et exploitation dans divers secteurs industriels.

**Mots clés :** cutinase, cutine, *Pseudomonas putida*, analyse *in silico*, modélisation par homologie.

## Abstract

Cutinases (E.C. 3.1.1.74) are serine carboxylic ester hydrolases, that degrade cutin, an insoluble aliphatic polyester excreted from the plant cuticle. These enzymes are used in various industrial sectors such as the food, agriculture, detoxification, dairy product, textile, laundry, chemicals, and pharmaceutical industry. Cutinases are produced by phytopathogenic fungi and bacteria. However, little is known about bacterial cutinases. Several features of a promising host for industry and plant biomass valorization of *Pseudomonas putida* bacteria have been demonstrated like its remarkably versatile metabolism, its unique capacity to adapt to harsh environmental conditions, and to resist to difficult redox reactions, industrial solvents, and oxidative stresses.

The aim of this work was to characterize cutinases from *P. putida* by using bioinformatics tools. Therefore, the detailed *in silico* analysis of four cutinase proteins was performed with respect to their physicochemical properties, subcellular localization, solubility prediction, and peptide signal prediction, secondary and tertiary structure predictions based on homology modeling approach and functional analysis. This study contributes in structural and functional properties understanding of the cutinases from *P. putida* allowing their wide production and exploiting in various industrial sectors.

**Keywords :** cutinase, cutin, *Pseudomonas putida*, *in silico* analysis, homology modeling.

## ملخص:

الكوتينازات (EC 3.1.1.74) عبارة عن هيدروليسات إستر كربوكسيلي سيرين، تعمل على تحلل الكوتين، وهو بوليستر أليفاتي غير قابل للذوبان يفرز من بشرة النبات. تستخدم هذه الإنزيمات في مختلف القطاعات الصناعية مثل الأغذية والزراعة وإزالة السموم ومنتجات الألبان والمنسوجات والغسيل والكيماويات والصناعات الدوائية. يتم إنتاج الكوتينازات عن طريق الفطريات الممرضة للنبات والبكتيريا. ومع ذلك، لا يُعرف الكثير عن الكوتينازات البكتيرية. العديد من ميزات مضيف واعد للصناعة وتنمين الكتلة الحيوية النباتية ل*Pseudomonas putida* قد تم إبطال مفعولها مثل التمثيل الغذائي المتنوع بشكل ملحوظ، وقدرتها الفريدة على التكيف مع الظروف البيئية القاسية، ومقاومة تفاعلات الأكسدة والاختزال الصعبة، والمذيبات الصناعية، والضغوط المؤكسدة. كان الهدف من هذا العمل هو توصيف الكوتينازات من *P. putida* باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية. لذلك، تم إجراء التحليل المفصل *in silico* لأربعة بروتينات كوتيناز فيما يتعلق بخصائصها الفيزيائية والكيميائية، والتوطين الخلوي، والتنبؤ بالذوبان، وتنبؤ إشارة الببتيد، وتنبؤات البنية الثانوية والثالثية بناءً على نهج نمذجة التماثل والتحليل الوظيفي. تساهم هذه الدراسة في فهم الخصائص الهيكلية والوظيفية للـ cutinases من *P. putida* مما يسمح بإنتاجها على نطاق واسع واستغلالها في مختلف القطاعات الصناعية.

**الكلمات المفتاحية :** الكوتيناز، الكوتين، *Pseudomonas putida*، تحليل *in silico*، نمذجة التناذر.