Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

EXPLORATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT DES GLYCOSIDES HYDROLASES DU CLAN GH-A

Par
Nabil Masri

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Maîtrise ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Michel Sylvestre Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Roger C. Levesque Ph. D. Département de biologie médicale Université Laval
Directeur de recherche	Claude Dupont Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier

© droits réservés de *Nabil Masri*, 2003

La révélation de tout cela est pour vous comme les mots d'un document scellé qu'on donne à celui qui sait lire en disant : « Lis donc ceci », il répond : « Je ne peux pas, car le document est scellé. » On le donne alors à celui qui ne sait pas lire en disant : « Lis donc ceci », il répond : « Je ne sais pas lire. »

Es 29.11-12

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ANNEXES vi
LISTE DES FIGURES vii
LISTE DES TABLEAUX x
LISTE DES ABRÉVIATIONS xi
SOMMAIRE xii
INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1.0 LES SACCHARIDES 5
1.1 Généralités 5
1.2 Le lien glycosidique 5

2.0 LES GLYCOSIDES HYDROLASES 7
2.1 Généralités 7
2.2 Modes d'action 8
2.3 Mécanisme d'action 8
2.3.1 Mécanisme d'inversion 9
2.3.2 Mécanisme de rétention 11
2.4 Disposition du site actif 12

3.0 CLASSIFICATION DES GLYCOSIDES HYDROLASES 12
3.1 Classification selon la spécificité de substrat (nomenclature EC) 12
3.2 Classification selon la similarité de séquence 13
3.3 La famille 10 des glycosides hydrolases 14
3.4 Le clan GH-A des glycosides hydrolases 15
3.5 Évolution de la spécificité de substrat des glycosides hydrolases 17

4.0 RÉSIDUS IMPLIQUÉS DANS LA CATALYSE OU LA LIAISON AU SUBSTRAT DES XYLANASES DE LA FAMILLE 10 18
4.1 Généralités 18
4.2 Xylanase 10A de *S. lividans* 18
4.3 Autres xylanases de la famille 10 20

5.0 EXEMPLES DE RÉSIDUS IMPLIQUÉS DANS LA SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT CHEZ LES GLYCOSIDES HYDROLASES 21
5.1 Exemple de différence entre des enzymes de spécificité et de famille distincte 21
5.2 Exemple de différence entre des enzymes de même spécificité et de même famille 22

6.0 OBJECTIFS DE TRAVAIL 26
6.1 Saccharides utilisés dans la présente étude 26

6.1.1 Le xylane 26
6.1.2 Le carboxyméthylcellulose (CMC) 27
6.1.3 Le β-glucan 27
6.1.4 Le lichenane 28
6.1.5 Le laminarin 28
6.1.6 Le glucomannane 28
6.1.7 Le galactomannane 29
6.1.8 Le galactane 29
6.1.9 L'amylose 30
6.1.10 Le *p*-nitrophénylcellobiose 30

APPROCHE EXPÉRIMENTALE 32

1.0 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE 33

2.0 PRODUITS CHIMIQUES 33

3.0 SOUCHES BACTÉRIENNES DE *STREPTOMYCES LIVIDANS* 33

4.0 VECTEUR D'EXPRESSION C209 34

5.0 MILIEUX DE CULTURE 34
5.1 Milieux solides 34
5.2 Milieux liquides 34

6.0 CONSERVATION DES SOUCHES DE *S. LIVIDANS* 35

7.0 ISOLEMENT DE PLASMIDE DE *S. LIVIDANS* 35

8.0 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) 36
8.1 Conditions de la réaction 36
8.2 Mutagenèse dirigée 37

9.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES CHEZ *S. LIVIDANS* 40
9.1 Digestion de l'ADN par des enzymes de restrictions 40
9.2 Isolement de l'ADN à partir d'un gel d'agarose 40
9.3 Ligation des inserts dans le vecteur d'expression 41

10.0 TRANSFORMATION CHEZ *S. LIVIDANS* 41

11.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES 41

12.0 PRODUCTION DES ENZYMES 42
12.1 Conditions de pré-culture 42
12.2 Conditions de culture 42

13.0 PURIFICATION DES ENZYMES 42
13.1 Recouvrement et concentration des protéines 42

13.2 Tamis moléculaire 43

14.0 ANALYSE DES PROTÉINES 44
14.1 Dosage 44
14.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) 44
14.3 Immunobuvardage de type Western 44
14.4 Focalisation isoélectrique 45
14.5 Spectrométrie de masse 46
14.6 Dichroïsme circulaire 46
14.6.1 Spectre UV éloignés 46
14.6.2 Dénaturation thermique 47
14.7 Spectrofluorométrie 48

15.0 CARACTÉRISATION ENZYMOLOGIQUE 48
15.1 Test PAHBAH 48
15.2 Test au *p*-nitrophénylcellobiose (*p*-NPG_2) 49

16.0 ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE 50

RÉSULTATS 52

1.0 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE 53
1.1 Superposition des structures disponibles du clan GH-A avec la xylanase 10A de *Streptomyces lividans* 53
1.2 Identification des résidus potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat des enzymes du clan GH-A 53

2.0 CHOIX DES MUTATIONS ET MUTAGENÈSE DIRIGÉE 73
2.1 Choix des mutations 73
2.2 Mutagenèse dirigée 73

3.0 SOUS CLONAGE DES GÈNES MUTÉS DANS *S. LIVIDANS* 74

4.0 SÉLECTION DES TRANSFORMANTS 74

5.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES MUTÉS 79

6.0 PRODUCTION DES ENZYMES 79

7.0 PURIFICATION DES ENZYMES 79

8.0 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE 83
8.1 Focalisation isoélectrique 83
8.2 Spectrométrie de masse 85
8.3 Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés 90
8.4 Dénaturation thermique 90
8.5 Spectrofluorométrie 93

9.0 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE 93

10.0 ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE 97

DISCUSSION 116

1.0 SUPERPOSITION DES STRUCTURES ET CHOIX DES MUTATIONS 117
1.1 Mutation T42R 117
1.2 Mutations V202F et V202Y 120
1.3 Mutations T235G et D238G 120
1.4 Mutation R275A 121

2.0 GÉNÉRATION ET SÉLECTION DES SOUCHES MUTANTES 121

3.0 PRODUCTION ET PURIFICATION DES ENZYMES 124

4.0 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE 124
4.1 Focalisation isoélectrique 124
4.2 Spectrométrie de masse 125
4.3 Dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés 126
4.4 Dénaturation thermique 127
4.5 Spectrofluorométrie 128

5.0 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ET PRODUITS D'HYDROLYSE 129
5.1 Généralités 130
5.2 Xylane 131
5.3 Carboxyméthylcellulose, *p*-nitrophénylcellobiose et cellopentaose 131
5.4 β-glucan, lichenane, laminarin et laminaripentaose 132
5.5 Glucomannane, galactomannane, galactane et amylose 134

CONCLUSIONS 135
REMERCIEMENTS 139
BIBLIOGRAPHIE 140
ANNEXES 146

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : Particularité des codes PDB associés aux enzymes du clan GH-A

Annexe B : Produits chimiques utilisés au cours de cette études

Annexe C : Milieu de régénérescence R5

Annexe D : Milieu de sporulation Bennett-thio

Annexe E : Milieu de pré-culture TSB

Annexe F : Milieu minimal M14

Annexe G : Profil d'élution des saccharides utilisés pour l'identification des pics lors de l'analyse des produits d'hydrolyse de certains substrats

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cyclisation du D-glucose 6

Figure 2 : Formation d'un lien glycosidique entre deux molécules de glucose pour former une molécule de maltose 7

Figure 3 : Mécanismes d'inversion et de rétention des glycosides hydrolases 10

Figure 4 : Disposition des sous-sites au sein du site actif des glycosides hydrolases 13

Figure 5 : Structure à 1,20 Å de résolution de la xylanase 10A de *S. lividans* vue de deux angles distincts 16

Figure 6 : Interactions faites aux sous-sites -1 et -2 chez la xylanase 10A de *S. lividans* en présence de 2-désoxy-2-fluoroxylobiose 20

Figure 7 : Quelques déterminants qui influencent la spécificité de substrat de trois xylanases de la famille 10 24

Figure 8 : Structure des saccharides utilisés dans la présente étude 31

Figure 9 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR 38

Figure 10 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase de *Acidothermus cellulolyticus* 56

Figure 11 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase 5A de *Bacillus agaradherans* 58

Figure 12 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase A de *Clostridium cellulolyticium* 60

Figure 13 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase C de *Clostridium thermocellum* ... 62

Figure 14 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase Z de *Erwinia chrysanthemi* 64

Figure 15 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de la β-mannanase de *Thermobifida fusca* 66

Figure 16 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-β-1,3-glucanase GII de *Hordeum vulgare* 68

Figure 17 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de la lichenase de *Hordeum vulgare* 70

Figure 18 : Séparation des fragments générés par PCR sur un gel d'agarose 0,7 % (p/v) 75

Figure 19 : Gels d'agarose 0,7 % (p/v) des fragments issus de la digestion par les enzymes de restriction *Sac*I et *Sph*I en vue du sous-clonage dans le vecteur c209 76

Figure 20 : Gels SDS-PAGE et immunobuvardages de type Western des milieux de culture filtrés de quatre clones choisis au hasard et incubés 48 heures en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose..... 77

Figure 21 : Gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western des milieux de culture filtrés et des enzymes purifiées provenant de la souche sauvage IAF932 et des souches mutantes..... 82

Figure 22 : Focalisation isoélectrique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A..... 84

Figure 23 : Masse moléculaire des protéines purifiées à partir des culture des souches IAF932-T42R, IAF932-V202F, IAF932-T235G, IAF932-D238G et IAF932-R275A analysées par spectrométrie de masse..... 86

Figure 24 : Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A 91

Figure 25 : Courbe de dénaturation thermique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A suivie par dichroïsme circulaire 92

Figure 26 : Spectre d'émission de fluorescence de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A 94

Figure 27 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du xylane par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 98

Figure 28 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du β-glucan par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 100

Figure 29 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du lichenane par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 102

Figure 30 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du laminarin par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 104

Figure 31 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du glucomannane, du galactomannane, du galactane et de l'amylose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 106

Figure 32 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du cellopentaose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions..... 108

Figure 33 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du laminaripentaose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions 112

Figure 34 : Disposition des brins-β et des hélices-α au sein de la xylanase 10A de *S. lividans* 118

Figure 35 : Alignement de séquences entre la xylanase 10A de *S. lividans* et les autres enzymes de mode *endo* du clan GH-A au niveau des brins-β_2 et β_7 119

Figure 36 : Réaction de glycation entre un résidu lysine et une molécule de xylose 126

Figure 37 : Hypothèse visant à expliquer l'accumulation de laminaribiose et d'un oligosaccharide non identifié en présence de β-glucan et de lichenane pour le mutant V202F 134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés des clans des glycosides hydrolases 15

Tableau 2 : Paramètres cinétiques de trois xylanases de la famille 10 en présence d'un analogue du xylobiose et d'un analogue du cellobiose 23

Tableau 3 : Oligonucléotides employés comme amorce lors des diverses amplifications par PCR 39

Tableau 4 : Conditions de réaction des différents tests PAHBAH effectués 49

Tableau 5 : Conditions de réaction des tests enzymatiques préalables à l'analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie à échange d'anions 51

Tableau 6 : Programme d'élution des produits d'hydrolyse sur la colonne CarboPak™ PA-1 51

Tableau 7 : Données relatives à l'alignement des séquences et à la superposition des structures disponibles du clan GH-A avec celle de la xylanase 10A de *S. lividans* 54

Tableau 8 : Acides aminés potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat chez la xylanase 10A de *S. lividans* et résidus équivalents chez les autres glycosides hydrolases de mode *endo* du clan GH-A 72

Tableau 9 : Dosage des protéines totales produites par les différentes souches et présentes dans le milieu de culture filtré après 48 heures d'incubation en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose 81

Tableau 10 : Rendement de purification de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A suite aux tamis moléculaires 81

Tableau 11 : Activité spécifique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A en présence de différents substrats 95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
CAZy	Base de données « Carbohydrate-Active Enzymes »
*Cf*Cex	β-1,4-glycosidase Cex de *Cellulomonas fimi*
CMC	Carboxyméthylcellulose
Da	Dalton
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
NTG	*N*-méthyle-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAHBAH	Acide *p*-hydroxybenzoïque hydrazide
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Base de données « Protein Data Bank »
*Pf*Xyl10A	Xylanase 10A de *Pseudomonas fluorescens cellulosa*
pI	Point isoélectrique
p-NPG_2	*p*-Nitrophénylcellobiose
p-NPX_2	*p*-Nitrophénylxylobiose
p/v	Poids sur volume
RMSD	Déviation standard de la racine moyenne carré
rpm	Révolution par minute
SDS	Dodécylsulfate de sodium
*Sl*Xyl10A	Xylanase 10A de *Streptomyces lividans*
TBS	Tampon Tris salin
T_m	Température moyenne de dénaturation
Tris	Tris hydroxyméthyle aminométhane
TSB	Tryptone de soja
UV	Ultraviolet
v/v	Volume sur volume

SOMMAIRE

Les glycosides hydrolases sont des enzymes hydrolysant les liens glycosidiques contenus entre des unités saccharidiques ou entre une unité saccharidique et un groupement aglycone. La classification de ces enzymes se fait en familles et en clans dans lesquels on retrouve des enzymes ayant une structure tertiaire similaire, un même mécanisme d'hydrolyse, mais une spécificité de substrat qui peut être très variée. Le clan GH-A est le plus diversifié des 12 clans existants. En tout, 32 substrats différents sont hydrolysés par les enzymes de ce clan malgré un repliement commun de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$. Afin d'identifier des éléments structuraux gouvernant la spécificité de substrat des enzymes du clan GH-A, la structure tridimensionnelle de la xylanase 10A de *Streptomyces lividans* a été superposée par modélisation moléculaire avec les autres structures disponibles de ce clan. De là, 16 positions ont été identifiées comme potentiellement impliquées dans la spécificité de substrat chez les glycosides hydrolases du clan GH-A. Six mutations ont été introduites par PCR dans le gène de la xylanase 10A et les gènes résultant ont été exprimés chez *S. lividans*. Après purification, les enzymes mutantes ont été comparées à l'enzyme sauvage au niveau du point isoélectrique apparent, du profil de masse moléculaire, du spectre de dichroïsme circulaire, de la dénaturation thermique, du spectre de fluorométrie ainsi que de l'activité spécifique et du profil d'hydrolyse en présence de divers substrats. En présence de laminarin, un polysaccharide constitué de molécules de glucose unies par des liens $\beta(1\rightarrow3)$, la mutation V202F a provoqué une augmentation d'activité spécifique de 1,86 fois relativement à l'enzyme sauvage. De plus, le profil d'hydrolyse a montré qu'en présence de β-glucan et de lichenane, deux polysaccharides composés de molécules de glucose unies par des liens $\beta(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$, la protéine mutante V202F libère des oligosaccharides que l'enzyme sauvage ne libère pas. Pour sa part la double mutation R275A/S276W a fait augmenter l'activité spécifique de 1,66 et 2,07 fois en présence respectivement de β-glucan et de lichenane relativement à l'enzyme sauvage tout en ayant le même profil d'hydrolyse.

Étudiant

Directeur de recherche

INTRODUCTION

Les glycosides hydrolases sont des enzymes cataboliques dont la fonction est l'hydrolyse de liens glycosidiques. Ce sont des enzymes retrouvées chez tous les règnes des vivants puisqu'elles sont impliquées dans une panoplie de fonctions biologiques tel que l'accès à des sources de carbone ou encore la défense contre des organismes pathogènes. Comme il existe une grande variété de saccharides et que ces derniers peuvent se lier les uns aux autres de plusieurs façons, il existe une grande diversité de spécificité de substrat chez les glycosides hydrolases. Cependant, elles ont généralement une prédilection pour un seul substrat avec parfois une spécificité moins prononcée pour un ou quelques autres substrats.

La classification des glycosides hydrolases se fait selon la similarité de séquence en acides aminés. Au sein d'une famille et d'un clan sont répertoriées des enzymes dont le repliement protéique et le mécanisme d'action est le même, et ce, peu importe l'homologie de séquence qui est très faible dans plusieurs cas. Il a été postulé qu'un gène ancestral commun aurait donné naissance à toutes les glycosides hydrolases contenues dans la même famille et le même clan (Henrissat, 1991). Au cours de l'évolution, suite à l'apparition de nouveaux saccharides, les différentes enzymes ont pu diverger quant à leur spécificité de substrat tout en gardant le même repliement protéique.

Le clan GH-A est de loin le plus diversifié tant au niveau du nombre de séquences répertoriées qu'au niveau des différentes spécificités de substrat retrouvées et des organismes d'où proviennent ses membres. Les glycosides hydrolases qui le compose montrent toutes un repliement de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ et un mécanisme d'action de rétention. À ce jour, la structure de 30 enzymes du clan GH-A est disponible représentant 12 spécificités de substrat distinctes. Étant donné que tous les membres du clan GH-A auraient un ancêtre commun, certaines de leurs régions ou certains de leurs acides aminés doivent être impliqués dans le réglage fin de leur spécificité de substrat.

Le but du présent projet de recherche était d'identifier certains déterminants protéiques responsables de la spécificité de substrat des glycosides hydrolases du clan GH-A. La xylanase 10A de *Streptomyces lividans* a été utilisée comme modèle

puisqu'elle fait partie de ce clan et que sa structure est bien connue. Suite à la superposition des structures disponibles du clan GH-A avec celle de la xylanase 10A de *S. lividans*, des acides aminés ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat chez les glycosides hydrolases du clan GH-A. Parmi tous ces résidus, cinq ont été mutés afin de vérifier si le remplacement de ces acides aminés par les résidus équivalents d'enzymes de spécificités différentes provoquerait un changement de spécificité de substrat.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 LES SACCHARIDES

1.1 Généralités

Les saccharides composent un groupe de molécules organiques dont l'unité fondamentale, le monosaccharide, a la formule chimique $(CH_2O)_n$ où n est supérieur à trois (Voet et Voet, 1995). Cependant, les monosaccharides retrouvés dans la nature ont plus fréquemment un nombre n égal à cinq ou six. Un monosaccharide de n atomes de carbone a systématiquement (n-1) groupements hydroxyle et un groupement carbonyle sous forme d'aldéhyde ou de cétone. Par conséquent, il peut y avoir une réaction intramoléculaire d'hémiacétalisation entre l'un des hydroxyles et le carbonyle pour former un cycle dont l'un des membres est un oxygène (Figure 1). Suite à une telle cyclisation, le carbone qui portait le groupement carbonyle porte alors quatre groupements différents ce qui fait de lui un carbone chiral. Ce type de chiralité qui dépend de la forme de la molécule est appelée anoméricité et ce carbone est par conséquent nommé carbone anomérique. Ainsi, chaque forme cyclique peut adopter deux conformations appelées anomères qui sont nommés α ou β selon que le nouveau groupement hydroxyle soit respectivement en position axiale ou équatoriale (Ege, 1994). En solution, la forme linéaire et les formes cycliques sont en équilibre.

1.2 Le lien glycosidique

Par réaction catalytique, deux monosaccharides peuvent s'assembler via l'un de leurs groupements hydroxyle pour ainsi former un lien glycosidique ce qui se résulte en une perte globale d'une molécule d'eau (Figure 2). Un monosaccharide peut aussi former un lien glycosidique avec un groupement organique de nature autre que saccharidique, c'est-à-dire un groupement aglycone, comme par exemple un groupement acétyle. Il n'est pas nécessaire que le lien glycosidique se fasse via l'oxygène, il peut s'agir entre autres de l'azote ou du soufre, mais l'atome le plus souvent impliqué reste l'oxygène. Dans la nature, la formation de liens glycosidiques est catalysée par des enzymes appelées glycosides transférases alors que leur hydrolyse se fait par des glycosides hydrolases.

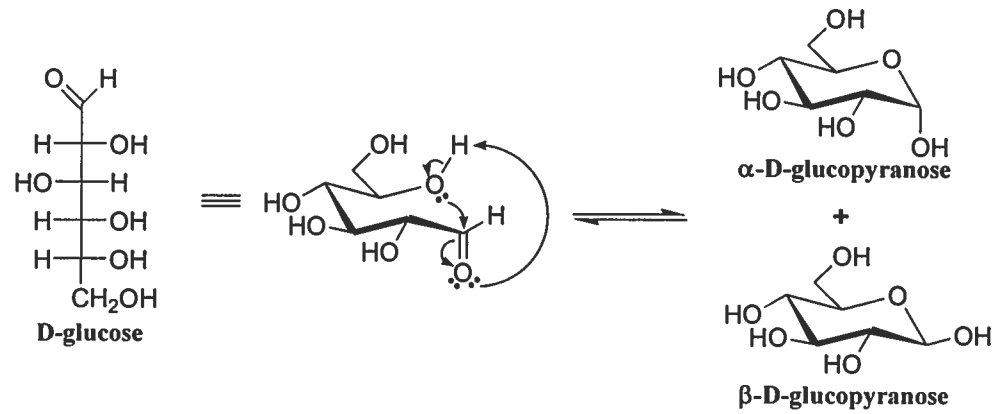


Figure 1 : Cyclisation du D-glucose.

Lorsqu'une molécule est formée de deux, trois, quatre, etc. monosaccharides assemblés par des liens glycosidiques, elle est appelée disaccharide, trisaccharide, tétrasaccharide, etc. Le terme oligosaccharide est employé pour désigner de manière non-spécifique des molécules plus petites que des polysaccharides mais qui contiennent au moins trois monosaccharides reliés par des liens glycosidiques. Les polysaccharides sont des polymères dont l'unité de répétition est un monosaccharide, un disaccharide ou un oligosaccharide qui sont reliés les uns aux autres par des liens glycosidiques. Ils forment une chaîne principale à laquelle peut se greffer des substituants saccharidiques ou aglycones par des liens glycosidiques. Le degré de polymérisation est un terme qui désigne le nombre de monosaccharides contenus dans la chaîne principale d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide (Jenkins *et al.*, 1996).

Par ailleurs, les monosaccharides qui forment un lien glycosidique à partir de leur carbone anomérique ne sont plus en équilibre avec leur forme cyclique. Ils perdent donc la possibilité de réagir avec leur groupement carbonyle. Par conséquent, chez les polysaccharides composés de monosaccharides reliés par leur carbone anomérique, il n'y a qu'un seul monosaccharide potentiellement réductible et il se trouve à l'une des deux extrémités de la chaîne qui s'appelle ainsi l'extrémité réductrice.

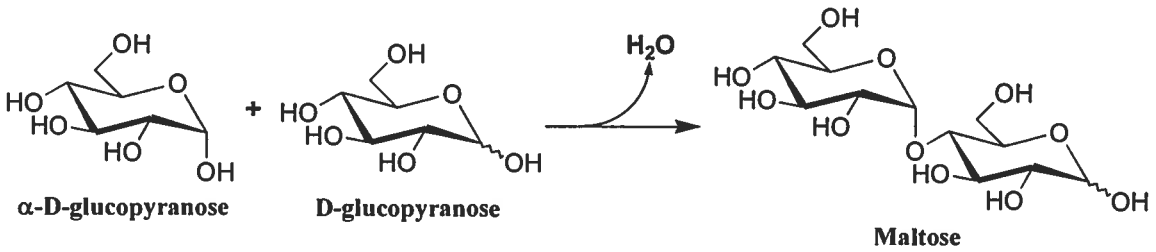


Figure 2 : Formation d'un lien glycosidique entre deux molécules de glucose pour former une molécule de maltose.

2.0 LES GLYCOSIDES HYDROLASES

2.1 Généralités

Les *O*-glycosides hydrolases (EC 3.2.1.X) sont des enzymes cataboliques dont l'action consiste à hydrolyser le lien *O*-glycosidique entre les monomères d'un disaccharide ou d'un polysaccharide, ou entre un saccharide et un groupement aglycone (Coutinho et Henrissat, 1999a). La plupart des glycosides hydrolases ne se lient au substrat que par environ six unités saccharidiques à la fois et le nombre d'isomères linéaires et en branche pour un hexaose donné est évalué à au moins 1,05 X 10^{12} (Laine, 1994). Comme la nature a su utiliser ce potentiel pour produire une variété incommensurable de saccharides, la spécificité des glycosides hydrolases, qui ont évolué autour de ces substrats, est par conséquent très diversifiée. Ces substrats étant impliqués dans une multitudes de fonctions biologiques, le rôle de ces enzymes est lui aussi très diversifié. Entre autres, ces enzymes sont nécessaires aux organismes, autotrophes comme hétérotrophes, pour utiliser les sources de carbone contenues sous forme de sucres qui sont produites à la base par les organismes autotrophes. Ainsi, une très grande variété d'organismes appartenant aux cinq règnes des vivants synthétisent une ou plusieurs glycosides hydrolases. La cellulose et le xylane, composant près de la moitié de la biomasse des plantes, sont les bio-molécules terrestres les plus abondantes (Gilbert et Hazlewood, 1993). Il n'est donc pas étonnant que plusieurs micro-organismes vivant dans le sol dépendent intrinsèquement du carbone contenu dans la paroi cellulaire des végétaux et qu'ils produisent ainsi une ou plusieurs cellulases et/ou xylanases qui

hydrolysent respectivement la cellulose et le xylane. Cependant, l'accès aux sources de carbone n'est pas l'unique rôle des glycosides hydrolases. Elles sont entre autres impliquées, chez la plupart des eucaryotes, dans la maturation des glycoprotéines en vue de leur sécrétion (Kukuruzinska et Lennon, 1998). Les glycosides hydrolases prennent aussi part dans certains mécanismes de défense et d'attaque entre les organismes. Par exemple, le bactériophage T4 produit du lysozyme qui dégrade le peptidoglycan de la paroi cellulaire de son hôte afin d'initier la phase extracellulaire de son cycle lytique (Poteete et Hardy, 1994). Aussi, des β-glucanases servent aux plantes supérieures dans leur lutte contre certaines levures pathogènes en dégradant la paroi cellulaire de ces dernières (Hrmova *et al.*, 1995).

2.2 Modes d'action

Par rapport aux polysaccharides, les glycosides hydrolases peuvent agir selon deux modes d'action soit le mode *endo* ou le mode *exo* (Henrissat et Davies, 1997). Les enzymes de mode *endo* attaquent aléatoirement n'importe quelle région à l'intérieur d'un polysaccharide relâchant ainsi des disaccharides, des oligosaccharides ou des polysaccharides plus courts. Elles peuvent généralement fixer et hydrolyser les oligosaccharides dérivés du polysaccharide attaqué initialement. De leur côté, les enzymes de mode *exo* ne s'attachent qu'à l'une des extrémités du polymère, ne relâchant ainsi que des monosaccharides. Il existe aussi des glycosides hydrolases dites de débranchement qui hydrolysent le lien glycosidique reliant une branche à la chaîne principale, et ce, qu'il s'agisse d'une branche de nature saccharidique ou non.

2.3 Mécanisme d'action

Comme pour n'importe quelle hydrolase, l'action des glycosides hydrolases consiste à ajouter deux atomes d'hydrogène et un atome d'oxygène sur le substrat pour briser l'un de ses liens covalents. Au niveau moléculaire, il n'y a que deux mécanismes par lesquels l'action des glycosides hydrolases peut se faire (Ly et Withers, 1999). Tout dépendant du mécanisme utilisé, il y a inversion ou rétention de la configuration du

carbone anomérique. Par conséquent, ces deux mécanismes d'action sont appelés d'inversion ou de rétention. Peu importe le mécanisme utilisé, l'hydrolyse du lien glycosidique est catalysée par l'action de deux acides carboxyliques présents sur la chaîne latérale de résidus aspartate et/ou glutamate. Au niveau de leur arrangement dans l'espace, ces chaînes latérales se font face au sein de la protéine. Structurellement, la différence majeure entre les deux mécanismes est la distance qui sépare ces acides carboxyliques. Pour un mécanisme d'inversion, la distance est d'environ 9,5 Å alors que pour un mécanisme de rétention, la distance est d'environ 5,5 Å.

Il y a une différence en ce qui a trait au pK_a des deux résidus catalytiques. L'un des deux a un pK_a un peu plus bas que celui des acides carboxyliques moyens ce qui le rend par conséquent plus nucléophile. Il est appelé *résidu basique* ou *résidu nucléophile* selon qu'il s'agisse d'une enzyme d'inversion ou de rétention respectivement. L'autre résidu catalytique a un pK_a plus élevé que la plupart des acides carboxyliques. Il est couramment appelé *résidu acide* ou *résidu acide/base* selon que l'enzyme soit d'inversion ou de rétention respectivement. Il est important de noter que si l'activité enzymatique est évaluée chez des enzymes qui sont mutantes pour un ou pour les deux résidus catalytiques, la réaction peut tout de même survenir si le tampon utilisé contient des carboxylates, comme c'est le cas par exemple dans un tampon bicarbonate de sodium. Ceci est dû au fait que les carboxylates du tampon peuvent jouer le rôle des carboxylates disparus suite à la mutation.

2.3.1 Mécanisme d'inversion

Lors du mécanisme d'inversion, le résidu basique déprotone partiellement une molécule d'eau qui peut alors faire plus aisément une attaque nucléophile sur le carbone visé par l'enzyme (Figure 3a). Le résidu acide, qui lui est protoné, aide au départ du groupe partant en transférant son proton à l'oxygène du lien glycosidique. L'hydrolyse se fait en passant par un seul état de transition où les deux protons échangés sont partagés entre les différents atomes impliqués dans la réaction. Lorsque l'hydrolyse est terminée, le résidu basique a un proton alors que le résidu acide est déprotoné. Par conséquent, il y

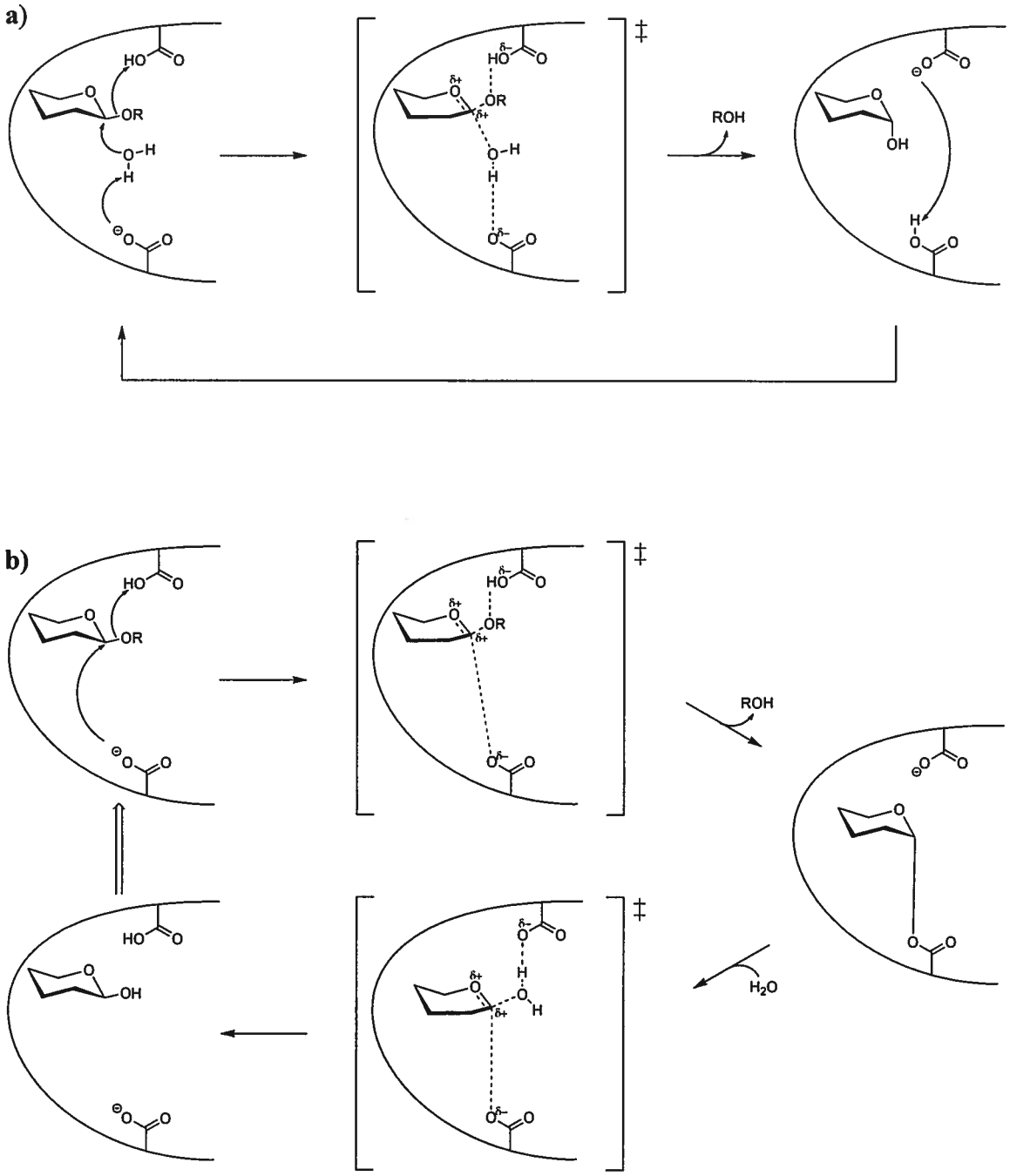


Figure 3 : Mécanismes a) d'inversion et b) de rétention des glycosides hydrolases. (Adapté de Ly et Withers, 1999).

a un transfert naturel d'un proton du résidu au pK_a le plus faible vers celui au pK_a le plus élevé et l'enzyme retourne ainsi à son état initial. Le résultat net est que le groupement hydroxyle ajouté au substrat est de configuration inverse à la configuration du lien glycosidique initial.

2.3.2 Mécanisme de rétention

Pour sa part, le mécanisme de rétention nécessite deux états de transition (Figure 3b). Tout d'abord, le résidu nucléophile fait directement une attaque nucléophile sur le carbone visé par l'enzyme. Lors du premier état de transition, l'oxygène du lien glycosidique porte une charge négative partielle. Par conséquent, le résidu acide/base partage son proton avec cet oxygène ce qui aide à rompre complètement le lien glycosidique. L'enzyme forme alors un lien covalent avec le substrat et elle est ainsi glycosylée. Cet état est relativement stable et peut être prolongé considérablement lorsque l'enzyme est mise en contact avec des substrats portant un fluor au lieu du groupement hydroxyle en position deux (McCarter et Withers, 1994). À ce moment, le résidu acide/base, qui vient de se départir de son proton, agit comme une base et déprotone partiellement une molécule d'eau qui peut alors faire une attaque nucléophile sur le carbone lié à l'enzyme. Il y a alors un deuxième état de transition où la molécule d'eau cause la rupture du lien glycosidique reliant le substrat à l'enzyme. En définitive, les deux résidus catalytiques retournent à leur état initial. Les deux attaques nucléophiles sur le même carbone font en sorte que la configuration est conservée.

Il arrive parfois au cours de la réaction catalytique qu'une molécule contenant un groupement hydroxyle (saccharide, alcool, etc.) soit ajoutée au substrat au lieu d'une molécule d'eau (Nakatani, 2001). Cette réaction, appelé transglycosylation, est observable lorsque l'enzyme est incubée en présence d'oligosaccharides puisque l'apparition de saccharides ayant un degré de polymérisation plus élevé peut être suivie et il s'agit là d'un indicateur de la transglycosylation (Moreau *et al.*, 1994).

2.4 Disposition du site actif

Le site actif des glycosides hydrolases se divise en deux régions séparées par le site de clivage. Ces régions sont appelées glycone et aglycone selon qu'elles se situent respectivement du côté de l'extrémité non réductrice ou de l'extrémité réductrice du substrat (Figure 4) (Charnock *et al.*, 1998). Comme la plupart des enzymes qui hydrolysent des bio-polymères, l'arrangement du site actif des glycosides hydrolases se fait en sous-sites qui se lient fortement ou faiblement à un résidu du substrat polymère (Kumagai *et al.*, 1993). À partir du site de clivage, les sous-sites de la région glycone sont numérotés -1, -2, -3, etc. et les sous-sites de la région aglycone sont numérotés +1, +2, +3, etc. (Figure 4). Le nombre de sous-sites de part et d'autre du site de clivage varie selon chaque enzyme.

3.0 CLASSIFICATION DES GLYCOSIDES HYDROLASES

3.1 Classification selon la spécificité de substrat (nomenclature EC)

La nomenclature EC du « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology » (NC-IUBMB) distingue les enzymes selon leur spécificité de substrat (Moss, 2002). Les glycosides hydrolases sont classifiées sous le numéro EC 3.2.1.X ou *3* représente toutes les hydrolases, *2* les glycosides hydrolases en général, *1* les glycosides hydrolases s'attaquant aux liens *O*- ou *S*-glycosidiques et *X* représente la spécificité de substrat. Par exemple, les endo-β-1,4-glucanases, communément appelées cellulases, sont trouvées sous le numéro EC 3.2.1.4. Le principal avantage de ce système est sa simplicité qui en fait la référence pour donner un nom aux enzymes. L'inconvénient est que cette façon de faire n'est pas appropriée pour les enzymes qui sont spécifiques pour plus d'un substrat, ce qui est fréquent chez les glycosides hydrolases (Coutinho et Henrissat, 1999b). De plus, ce type de classification n'apporte aucune information sur la structure.

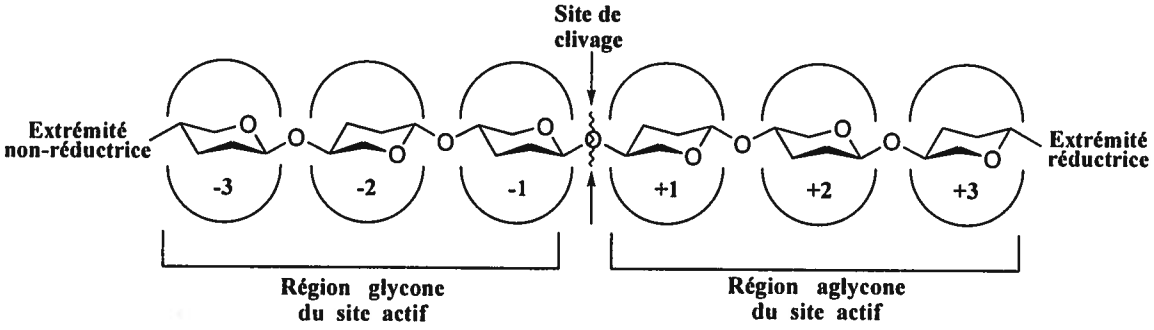


Figure 4 : Disposition des sous-sites au sein du site actif des glycosides hydrolases.

3.2 Classification selon la similarité de séquence

Il arrive souvent que des protéines ayant des séquences très peu similaires se replient en des structures qui se superposent presque parfaitement. À l'aide d'outils informatiques comme l'analyse des amas hydrophobes, il est possibles de comparer différentes séquences primaires de protéines et de prédire lesquelles ont la même structure en trois dimensions sans pour autant que leur structure soit connue (Gaboriaud *et al.*, 1987).

Henrissat, (1991) a classifié les glycosides hydrolases selon la similarité de séquence en acides aminés. Les glycosides hydrolases montrant une similarité supérieure à un certain seuil sont regroupées dans une même famille. Actuellement, 88 familles se répartissent les 6 922 séquences recensées dans la base de données « Carbohydrate-Active Enzymes » (CAZy) qui est la référence mondiale pour la classification des glycosides hydrolases selon leur similarité de séquence (Coutinho et Henrissat, 1999a).

D'autre part, lorsqu'au moins deux familles montrent des similarités structurelles, elles sont réunies sous la bannière d'un clan. Pour cela, il n'est pas nécessaire que des structures protéiques soient connues. En effet, l'analyse des amas hydrophobes est un outil bio-informatique fiable qui permet de prédire quelles protéines sont structurellement rapprochées, et ce, même si leur homologie de séquence est faible (Gaboriaud *et al.*, 1987). Par conséquent, dès que la structure d'une enzyme est connue, l'information

relative au type de repliement peut être extrapolée pour toutes les autres enzymes de sa famille et, s'il y a lieu, de son clan. Présentement, douze clans ont été déterminés et ils englobent 4 793 séquences dans 40 familles (Tableau 1). De ces douze clans, neuf ont au moins une enzyme dont la structure en trois dimensions est connue.

D'autre part, la classification selon la similarité de séquence apporte des informations au niveau mécanistique. Ceci est dû au fait que le mécanisme d'action dépend de la disposition dans l'espace des résidus catalytiques et par conséquent de la structure en trois dimensions de l'enzyme. Comme par définition les glycosides hydrolases se superposent très bien au sein des familles et des clans, les caractéristiques relatives au mécanisme d'action peuvent être attribuées aux membres nouvellement classifiés.

3.3 La famille 10 des glycosides hydrolases

Bien que la famille 10 des glycosides hydrolases englobe 169 séquences, la spécificité de substrat y est plutôt homogène puisqu'elle contient presque uniquement des endo-β-1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) (Coutinho et Henrissat, 1999a). Toutefois, certaines enzymes ont, en plus de cette activité de base, une activité secondaire endo-β-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), β-1,4-xylosidase (EC 3.2.1.37), α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ou feruloyle estérase (EC 3.1.1.-). Les enzymes avec une activité autre que endo-β-1,4-xylanase ont une activité endo-β-1,4-glucanase (3.2.1.4), endo-β-1,3-xylanase (3.2.1.32) ou β-1,4-cellobiohydrolase (3.2.1.91). La structure en trois dimensions est de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ comme l'ont montré les huit enzymes qui ont été cristallographiées à ce jours. En tout, 41 cristaux protéiques différents ont été analysés puisque certaines des enzymes ont été cristallographiées à différentes résolutions ou avec différentes molécules hétérogènes comme des substrats ou des analogues de substrats. La xylanase 10A de *Streptomyces lividans* (*Sl*Xyl10A) est la première enzyme de la famille 10 dont la structure en trois dimensions à été déterminée (Derewenda *et al.*, 1994). La figure 5 montre la structure de la *Sl*Xyl10A, telle que rapportée par Ducros *et al*, (2000) vue de deux angles distincts où le tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ est clairement exposé.

Tableau 1 : Propriétés des clans des glycosides hydrolases tel que proposé par Coutinho et Henrissat, (1999a)

Clan	Type de repliement	Famille
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	1 2 5 10 17 26 30 35 39 42 51 53 59 72 79 86
GH-B	β-jelly roll	7 16
GH-C	β-jelly roll	11 12
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27 36
GH-E	β-propeller	33 34 83
GH-F	N.D.	43 62
GH-G	N.D.	37 63
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13 70 77
GH-I	α+β	24 46
GH-J	N.D.	32 68
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18 20
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15 65

N.D. : Indéterminé
Mise à jour : 27 juin 2002

L'activité des enzymes de la famille 10 se fait par un mécanisme de rétention avec deux acides glutamiques comme résidus catalytiques. De plus, les résidus acide/base et nucléophile se retrouvent systématiquement sur les brins-β_4 et β_7 respectivement. Aussi, chez les xylanases de la famille 10, le motif ITELDI sur le brin-β_7 est conservé et il contient entre autres le résidu nucléophile (Roberge *et al.*, 1997b).

3.4 Le clan GH-A des glycosides hydrolases

Parmi tous les clans des glycosides hydrolases, le clan GH-A est de loin le plus diversifié (Tableau 1). Présentement, ce clan englobe 1 433 séquences et les enzymes qui en font partie sont spécifiques pour 32 substrats différents (Coutinho et Henrissat, 1999a). Les familles 1 et 5 contribuent pour beaucoup à la diversité du clan avec

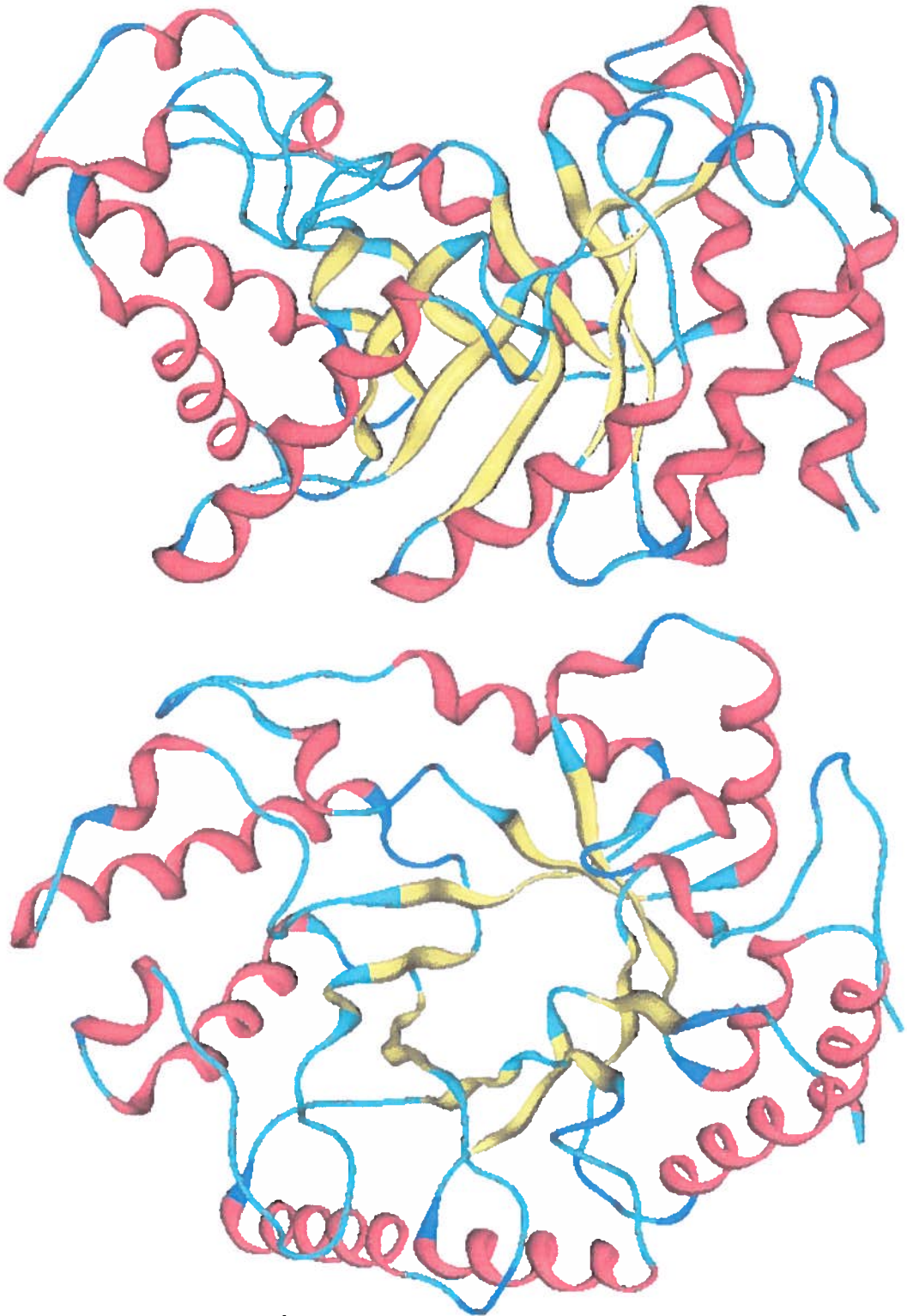


Figure 5 : Structure à 1,20 Å de résolution de la xylanase 10A de *S. lividans* telle que rapportée par Ducros *et al.*, (2000) vue de deux angles distincts. Image générée à l'aide du logiciel Molecular Operating Environment (MOE) avec les brins-β en jaune, les hélices-α en rouge, les boucles en turquoise et les coudes-β en bleu.

307 séquences et 11 numéros EC pour la famille 1 ainsi que 326 séquences et 9 numéros EC pour la famille 5. Comme la famille 10, le clan GH-A est composé d'enzymes ayant toutes un repliement de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$, un mécanisme de rétention et deux acides glutamiques à titre de résidus catalytiques qui se retrouvent automatiquement sur les brins-β_4 et β_7. Outre les deux résidus catalytiques, il n'y a qu'un seul autre résidu qui est strictement conservé au sein du clan GH-A. Il s'agit de l'acide aminé qui précède le résidu acide/base et qui est invariablement une asparagine (Roberge *et al.*, 1997a). Par ailleurs, il y a actuellement 30 protéines qui ont au moins un cristal d'analysé pour un total de 139 entrées dans la « Protein Data Bank » (PDB) (Berman *et al.*, 2000). L'annexe A rapporte la particularité des codes PDB associés aux enzymes du clan GH-A. Le nom des enzymes, les organismes d'où elles proviennent ainsi que le nom des codes PDB sont tirés de la base de données CAZy alors que les caractéristiques associées aux codes PDB sont prises directement de la PDB.

3.5 Évolution de la spécificité de substrat des glycosides hydrolases

Bien que la classification selon la similarité de séquence permette d'extrapoler des informations tant au niveau de la structure en trois dimensions que sur le plan du mécanisme d'action, elle ne permet pas de prédire le comportement des enzymes relativement à leur spécificité de substrat. Ceci est dû au fait que le réglage de la spécificité n'est pas influencé par le type de repliement qu'adopte l'enzyme, mais plutôt par certaines régions ou certains acides aminés précis au sein de la protéine. Ainsi, des enzymes ayant la même spécificité peuvent avoir un type de repliement complètement différent ce qui fait référence à la notion de convergence (Henrissat, 1991). Par conséquent, plusieurs gènes, codant pour des protéines dont la structure et la spécificité diffèrent, peuvent avoir évolués pour aboutir à des gènes codant pour des protéines qui cette fois ont la même spécificité de substrat sans pour autant avoir la même structure. Par exemple, les xylanases de la famille 10 ont un repliement de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ alors que celles de la famille 11 ont une structure de type β-jellyroll (Coutinho et Henrissat, 1999a). À l'opposé, un même gène peut évoluer pour donner naissance à des gènes codant pour des protéines dont la spécificité de substrat est disparate, comme en

fait foi le clan GH-A. Cette divergence est probablement le résultat de l'apparition de nouveaux substrats, stéréochimiquement semblables à ceux déjà existant, et par rapport auxquels les glycosides hydrolases ont dû évoluer (Henrissat, 1991).

4.0 RÉSIDUS IMPLIQUÉS DANS LA CATALYSE OU LA LIAISON AU SUBSTRAT DES XYLANASES DE LA FAMILLE 10

4.1 Généralités

Les xylanases sont des glycosides hydrolases de mode *endo* dont le xylane est le substrat principal. Selon leurs similarités de séquence, elles sont classifiées dans les familles 10 ou 11 des glycosides hydrolases et ainsi dans les clans GH-A ou GH-C respectivement (Coutinho et Henrissat, 1999a). Faisant partie du clan GH-A, les xylanases de la famille 10 ont un repliement de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ et deux acides glutamiques pour résidus catalytiques qui se retrouvent sur les brins-β_4 et β_7. Cinq xylanases de la famille 10 font présentement l'objet d'études structure/fonction approfondies. Il s'agit de la xylanase 10A de *S. lividans*, de la β-1,4-glycosidase Cex de *Cellulomonas fimi*, de la xylanase Z de *Clostridium thermocellum*, de la xylanase de *Penicillium simplicissimum* et de la xylanase 10A de *Pseudomonas fluorescens cellulosa*. Ces études ont permis de cibler des résidus impliqués dans la catalyse, la stabilisation de l'état de transition ou la liaison au substrat. La prochaine section résumera l'état des connaissances actuelles au sujet des acides aminés impliqués dans le site actif de la xylanase 10A de *S. lividans*, enzyme qui a servi de modèle lors de la présente étude. Par la suite, des résidus du site actif identifiés chez d'autres xylanases de la famille 10 seront énumérés afin de compléter la vision globale du site actif de ces enzymes.

4.2 Xylanase 10A de *S. lividans*

Afin de faciliter la compréhension du texte, la plupart des interactions enzyme-substrat qui ont lieu aux sous-sites -1 et -2 de la xylanase 10A de *S. lividans* sont résumées à la figure 6. Le résidu acide/base de cette enzyme se trouve à la position E128

et son pK_a élevé est maintenu grâce à un réseau de ponts hydrogène impliquant entre autres le résidu H86 (Roberge *et al.*, 1998). Le résidu nucléophile est situé en position E236 et sa position dans le site actif est stabilisée grâce à trois réseaux de ponts hydrogène. Tout d'abord, le résidu D124 fait un pont hydrogène avec le H81 qui interagit à son tour avec une molécule d'eau qui fait elle-même un pont hydrogène avec le résidu nucléophile (Roberge *et al.*, 1997b). Par ailleurs, le résidu N170 fait un pont hydrogène avec le résidu nucléophile, mais aussi avec les résidus N127, Q205 et T235 (Roberge *et al.*, 1997a). Ce réseau de ponts hydrogène, en plus d'aider au bon positionnement du résidu nucléophile, aurait un rôle dans la stabilisation de l'état de transition. Le résidu nucléophile fait aussi un lien hydrogène avec le résidu H207 qui interagit à son tour avec l'acide aminé D238 (Roberge *et al.*, 1997b). Cette triade est hautement conservée dans la famille 10 et elle serait impliquée dans le positionnement ainsi que dans l'état ionisé du résidu nucléophile (White *et al.*, 1994).

Dans la région aglycone du site actif, deux résidus ont été identifiés comme étant impliqués dans la liaison au substrat. L'asparagine en position 173 se situe au niveau du sous-site +3 (Moreau *et al.*, 1994) alors que le résidu Y172 effectue une interaction hydrophobe avec le substrat au sous-site +1 (Roberge *et al.*, 1999).

Les résidus qui interagissent avec le substrat au sous-site -1 sont les résidus K48, H81, N127, E236 et W274 (Ducros *et al.*, 2000). Le résidu K48 fait un pont hydrogène avec le groupement hydroxyle du carbone trois. Pour sa part, le résidu H81 fait un pont hydrogène avec les groupements hydroxyle des atomes de carbone deux et trois et son bon positionnement est rendu possible grâce au lien *cis*-peptidique contenu entre les résidus H81 et T82. Quant à eux, les résidus N127 et E236 font un pont hydrogène avec le groupement hydroxyle du carbone deux. Par ailleurs, le résidu aromatique W274 interagit de façon hydrophobe avec l'ensemble du substrat situé au sous-site -1 en formant un couvercle au-dessus du site actif.

Les acides aminés réputés pour interagir avec le substrat au sous-site -2 sont les résidus E44, N45, K48 et W266, et ce, toujours à l'aide de ponts hydrogène (Ducros *et al.*, 2000). Les résidus E44 et W266 interagissent avec le groupement hydroxyle du

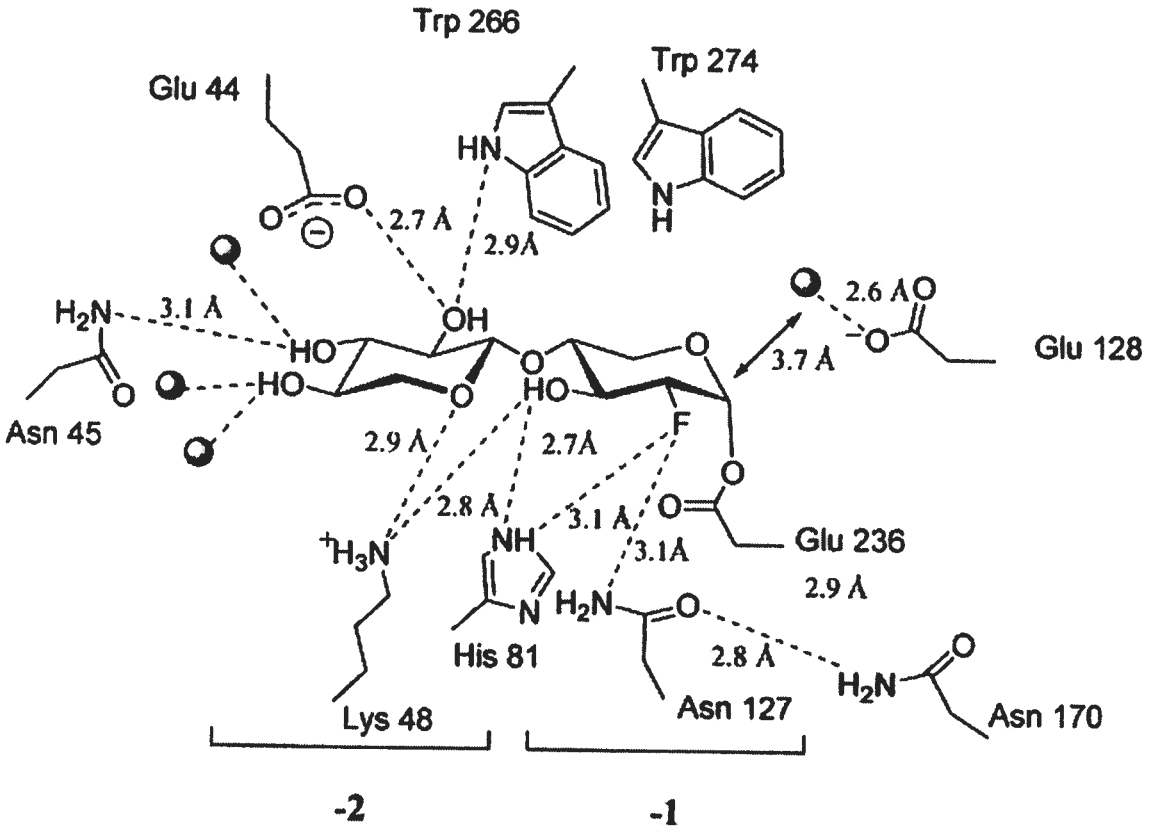


Figure 6 : Interactions faites aux sous-sites -1 et -2 chez la xylanase 10A de *S. lividans* en présence de 2-désoxy-2-fluoroxylobiose tel que rapporté par Ducros *et al.*, (2000). Les lignes pointillées et les sphères représentent respectivement des ponts hydrogène et des molécules d'eau.

carbone deux alors que le résidu N45 interagit avec le groupement hydroxyle du carbone trois. De son côté, le résidu K48 fait un pont hydrogène avec l'oxygène du cycle xylopyranose.

4.3 Autres xylanases de la famille 10

Chez la xylanase 10A de *P. fluorescens cellulosa*, le résidu N182 interagit avec le substrat au niveau du sous-site +2, tout près de la jonction entre les sous-sites +3 et +2 (Charnock *et al.*, 1998). Il pourrait donc faire un pont hydrogène avec l'oxygène du lien glycosidique ou encore avec l'oxygène du cycle xylopyranose. Le résidu équivalent chez la xylanase 10A de *S. lividans* est le N173 et bien qu'il soit reconnu comme étant

impliqué dans la liaison au substrat au sous-site +3, la nature de cette interaction n'est pas connue.

Au sous-site -2 de la β-1,4-glycosidase Cex de *C. fimi* et de la xylanase de *P. simplicissimum*, la glutamine équivalente au résidu Q88 de la xylanase 10A de *S. lividans* forme un pont hydrogène avec l'oxygène du cycle xylopyranose (Notenboom *et al.*, 1998).

D'autre part, deux résidus sont reconnus comme faisant partie du sous-site -3 de la xylanase de *P. simplicissimum* soit le résidu N48, qui forme un pont hydrogène avec le groupement hydroxyle du carbone deux, ainsi que le résidu K51 qui interagit avec l'oxygène du cycle xylopyranose (Schmidt *et al.*, 1999). Ces acides aminés correspondent aux résidus N45 et K48 de la xylanase 10A de *S. lividans*. Toutefois, la longueur des ponts hydrogène qu'ils effectuent est respectivement de 3,11 et 4,99 Å, ce qui suggère que la liaison au sous-site -3 est plus faible qu'aux sous-sites -1 et -2, là où les liens entre les acides aminés et le substrat sont plus nombreux et plus courts.

5.0 EXEMPLES DE RÉSIDUS IMPLIQUÉS DANS LA SPÉCIFICITÉ DE SUBSTRAT CHEZ LES GLYCOSIDES HYDROLASES

5.1 Exemple de différence entre des enzymes de spécificité et de famille distincte

Dans le clan GH-A, Dominguez *et al.*, (1995) ont observé une différence notoire entre les cellulases de la famille 5 et les xylanases de la famille 10. En effet, en comparant les différentes structures disponibles, ils ont remarqué que chez les cellulases de la famille 5, le résidu équivalent à l'arginine en position 46 de la cellulase C de *C. thermocellum* est conservé et, à tout le moins dans le cas de la cellulase C, ce résidu interagit avec plusieurs groupements acides ou polaires du site actif. Or, chez les xylanases de la famille 10, l'équivalent de cette position est occupée systématiquement par une valine ou une thréonine (résidu T42 dans le cas de la xylanase 10A de *S. lividans*). Le fait qu'il s'agisse d'un plus petit résidu induirait la formation d'une cavité

remplie de molécules d'eau pour accommoder les substituants du xylane mais cette hypothèse n'a pas encore été confirmée.

5.2 Exemple de différence entre des enzymes de même spécificité et de même famille

Chacune des xylanases de la famille 10 a sa propre spécificité vis-à-vis le xylane ou vis-à-vis d'autres substrats. C'est la présence ou l'absence de certains résidus qui explique ces différences fines entre des enzymes qui sont très similaires au niveau structurel. La spécificité de substrat de la β-1,4-glycosidase Cex de *C. fimi* (*Cf*Cex), de la xylanase 10A de *P. fluorescens* (*Pf*Xyl10A) ainsi que de la xylanase 10A de *S. lividans* (*Sl*Xyl10A) a été comparée (Andrews *et al.*, 2000; Ducros *et al.*, 2000). Tout d'abord, en présence de *p*-nitrophénylxylobiose (*p*-NPX_2), un analogue du xylobiose, la *Cf*Cex est de loin la plus efficace, puisque sa constante k_{cat}/K_M est la plus élevée, suivie dans l'ordre par la *Pf*Xyl10A et la *Sl*Xyl10A (Tableau 2). En présence de *p*-nitrophénylcellobiose (*p*-NPG_2), un analogue du cellobiose, la *Cf*Cex est encore la plus efficace suivie cette fois de la *Sl*Xyl10A et de la *Pf*Xyl10A. Cependant, lorsque le ratio (k_{cat}/K_M *p*-NPX_2) sur (k_{cat}/K_M *p*-NPG_2) est calculé, c'est la *Pf*Xyl10A qui a la valeur la plus élevée, suivie par la *Sl*Xyl10A et la *Cf*Cex respectivement. Ce que révèle ce dernier paramètre est que, globalement, la *Pf*Xyl10A préfère de loin le *p*-NPX_2 par rapport au *p*-NPG_2 alors que la *Cf*Cex ne montre pas une préférence démesurée pour le *p*-NPX_2. D'ailleurs, à l'origine, la *Cf*Cex a été identifiée comme étant une enzyme hydrolysant la cellulose avant de subir des tests envers le *p*-NPX_2 et être catégorisée comme une xylanase ayant une assez bonne spécificité contre la cellulose ou ses analogues (White *et al.*, 1994).

La différence de spécificité entre ces trois xylanases s'explique en partie par deux régions de ces enzymes (Figure 7). Tout d'abord, au sous-site -1, le tryptophane en position 274 de la *Sl*Xyl10A est conservé et il interagit de manière hydrophobe avec l'unité xylopyranose de ce sous-site. Cependant, lorsqu'une unité glucopyranose prend place à cet endroit, le positionnement de son groupement hydroxyméthyle en position cinq est gêné par la présence et la largeur de cet acide aminé. Or, chez la *Cf*Cex, le résidu situé immédiatement après ce tryptophane est une valine qui, par sa petitesse, permet au

Tableau 2 : Paramètres cinétiques de trois xylanases de la famille 10 en présence d'un analogue du xylobiose et d'un analogue du cellobiose. (Adapté de Ducros *et al.*, (2000).

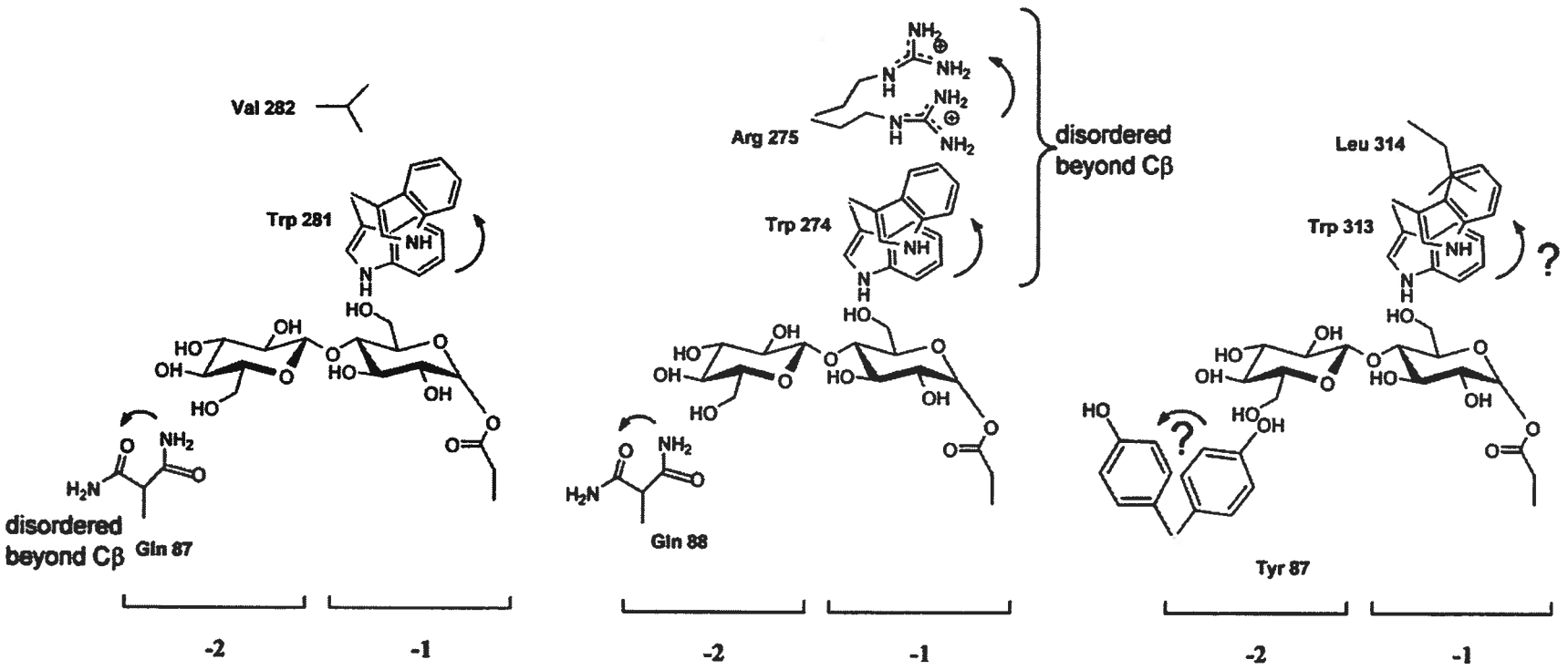
Substrat	Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}mM^{-1}$)	(k_{cat}/K_M *p*-NPX$_2$) / (k_{cat}/K_M *p*-NPG$_2$)
p-NPX$_2$	*Cf*Cex	37,1	0,019	1952	141,5
	*Pf*Xyl10A	86,4	0,57	151.6	2915,9
	*Sl*Xyl10A	29,4	0,58	50,7	714,1
p-NPG$_2$	*Cf*Cex	14,5	1,05	13,8	———
	*Pf*Xyl10A	2,6	50	0,052	
	*Sl*Xyl10A	3,6	50,5	0,071	

*Cf*Cex : β-1,4-glycosidase Cex de *C. fimi*
*Pf*Xyl10A : Xylanase 10A de *P. fluorescens*
*Sl*Xyl10A : Xylanase 10A de *S. lividans*
p-NPX$_2$: *p*-nitrophénylxylobiose
p-NPG$_2$: *p*-nitrophénylcellobiose

résidu aromatique de pivoter pour ainsi mieux accommoder l'unité glucopyranose. Dans le cas de la *Pf*Xyl10A et de la *Sl*Xyl10A, les résidus adjacents à ce tryptophane sont respectivement une leucine et une arginine qui, de par leur grosseur, ne permettent pas une aussi bonne rotation. D'autre part, au sous-site -2 de la *Sl*Xyl10A se trouve une glutamine en position 88. La position équivalente de la *Cf*Cex est aussi occupée par une glutamine mais chez la *Pf*Xyl10A, il s'agit d'une tyrosine. Lorsque prend place une unité glucopyranose, la glutamine chez la *Sl*Xyl10A et la *Cf*Cex peut pivoter pour ainsi accommoder le groupement hydroxyméthyle en position cinq. Par contre, la tyrosine de la *Pf*Xyl10A étant moins flexible, elle ne peut pas subir une telle rotation.

Dans les deux sous-sites, la *Cf*Cex est capable de changer sa conformation pour ainsi accepter une unité glucopyranose. Chez la *Sl*Xyl10A, ce n'est que l'un des deux sous-sites qui permet ce type de réorganisation alors que chez la *Pf*Xyl10A, aucun des deux sous-sites n'est permissif au glucose. Ceci explique pourquoi la *Cf*Cex est la plus active contre le *p*-NPG$_2$ suivie dans l'ordre de la *Sl*Xyl10A et de la *Pf*Xyl10A.

Figure 7 : Quelques déterminants qui influencent la spécificité de substrat de trois xylanases de la famille 10 tel que proposé par Andrews *et al.*, (2000).


Val 282
Trp 281
disordered
beyond Cβ
Gln 87
-2
-1
Cellumonas fimi Cex
Arg 275
Trp 274
disordered
beyond Cβ
Gln 88
-2
-1
Streptomyces lividans Xyl10A
Leu 314
Trp 313
?
?
Tyr 87
-2
-1
Pseudomonas cellulosa Xyl10A

6.0 OBJECTIFS DE TRAVAIL

Le but du projet consistait à identifier par modélisation moléculaire des déterminants protéiques potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat chez les glycosides hydrolases du clan GH-A. Pour vérifier les hypothèses émises, des mutations ont été introduites dans le gène de la xylanase 10A de *S. lividans* et les gènes résultant ont été clonés et exprimés chez *S. lividans*. Suite à la purification des protéines, l'objectif était tout d'abord de comparer l'enzyme sauvage aux protéines mutantes relativement à leur point isoélectrique apparent, à leur profil de masse moléculaire, à leur spectre de dichroïsme circulaire, à leur dénaturation thermique ainsi qu'à leur spectre de fluorométrie puisque ces caractéristiques peuvent permettre de mieux établir les conditions dans lesquelles se déroulent les tests enzymatiques (e.g. température) ou aider l'interprétation des résultats. Le but ultime du projet était de comparer les protéines mutantes à l'enzyme sauvage en ce qui a trait à leur activité spécifique ainsi qu'à leur profil d'hydrolyse en présence de différents substrats. Ces analyses permettent de vérifier si les mutations effectuées ont bel et bien induit les changements de spécificité escomptés.

6.1 Saccharides utilisés dans la présente étude

Plusieurs saccharides ont servi de substrats au cours du travail de laboratoire subséquemment décrit. Les prochaines sections visent à bien les définir afin que le lecteur puisse mieux comprendre le contexte de chaque expérience.

6.1.1 Le xylane

Le xylane est composé d'une chaîne principale de xyloses reliés par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glycosidique (Figure 8a) (Clarke, 1997). Il est essentiellement retrouvé dans la paroi cellulaire des végétaux où il joue un rôle structural. Il est substitué avec une panoplie de groupements saccharidiques et aglycones dont la nature et le nombre varie d'une espèce à l'autre. Le xylane de bois dur a un degré de polymérisation d'environ 200

et il est principalement substitué par des groupements acétyles en position deux et/ou trois et par des groupements 4-*O*-méthylglucurosyles de manière $\alpha(1\rightarrow2)$. Pour sa part, le xylane de bois mou est principalement substitué par des groupements 4-*O*-méthylglucurosyles de manière $\alpha(1\rightarrow2)$ ainsi que par des groupements L-arabinofuranosyles de manière $\alpha(1\rightarrow3)$. La chaîne principale de xylose tend à adopter une conformation en brin hélicoïdal. Cette disposition spatiale n'est pas perturbée par la grosseur des substituants mais plutôt par la charge des acides uroniques lorsqu'ils sont présents.

6.1.2 Le carboxyméthylcellulose (CMC)

Étant donné l'insolubilité de la cellulose en solution aqueuse, des analogues solubles de la cellulose sont disponibles commercialement. Produit à partir de la cellulose, le carboxyméthylcellulose se compose d'une chaîne principale de $\beta(1\rightarrow4)$ glucose dont les groupements hydroxyle libres sont substitués par des groupements carboxyméthyle (Figure 8b). Le degré de substitution par des groupements carboxyméthyle est en moyenne de 70 % pour le carboxyméthylcellulose de haute viscosité, de 62 % pour celui de moyenne viscosité et de 58 % pour celui de faible viscosité (Zeller *et al.*, 1991). Il y a huit formes possibles de glucopyranose qui ne sont pas retrouvées dans des proportions égales. La forme la plus fréquente est le glucose non-substitué suivie dans l'ordre des glucoses 2-, 6- et 3-mono-substitués, des glucoses 2,6-, 2,3- et 3,6-di-substitués et finalement de la forme tri-substituée du glucose.

6.1.3 Le β-glucan

Le β-glucan est un polymère d'unités de glucose unies par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ et $\beta(1\rightarrow3)$ dans une proportion qui varie selon l'espèce qui le produit (Figure 8c) (Roubroeks *et al.*, 2000). Pour le β-glucan d'avoine, il y a en moyenne sept liens $\beta(1\rightarrow4)$ pour trois liens $\beta(1\rightarrow3)$. Comme les liens $\beta(1\rightarrow3)$ ne sont jamais consécutifs, le β-glucan peut être considéré comme un amalgame de cellotrioses et de cellotétraoses disposés

aléatoirement les uns après les autres et reliés par des liens $\beta(1\rightarrow3)$ avec un ratio de 2,0 à 2,4 cellotrioses pour chaque cellotétraose.

6.1.4 Le lichenane

À l'instar du β-glucan, le lichenane est un polymère d'unités de glucose liées par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ et $\beta(1\rightarrow3)$. Cependant, la proportion de liens $\beta(1\rightarrow3)$ y est plus importante avec environ deux liens $\beta(1\rightarrow4)$ pour chaque lien $\beta(1\rightarrow3)$ (Figure 8d) (Kramer *et al.*, 1995). Aussi, il s'agit d'un petit polysaccharide avec une masse moléculaire entre 5 400 et 7 200 Da et donc un degré de polymérisation entre 33 et 44.

6.1.5 Le laminarin

Composé de molécules de glucose liées uniquement par des liens $\beta(1\rightarrow3)$, le laminarin n'est pas un polysaccharide très long. Il est formé en moyenne de 20 à 30 unités glucopyranose par molécule avec une prédominance pour les molécules dont le degré de polymérisation est de 23 à 27 (Figure 8e) (Read *et al.*, 1996). La plupart des laminarins provenant de différentes espèces de *Laminaria* ne sont pas substitués et sont par conséquent insolubles dans l'eau. Par contre, le laminarin de *Laminaria digitata* est quelque peu substitué, et ce, principalement par des molécules de glucose liées à la chaîne principale par des liens $\beta(1\rightarrow6)$. Il peut y avoir entre zéro et quatre substituants par molécule de laminarin avec un moyenne de 1,2.

6.1.6 Le glucomannane

Le glucomannane est retrouvé dans l'hémicellulose de plusieurs bois mous ainsi que dans les bulbes et l'endosperme de plusieurs plantes (Yui *et al.*, 1992). C'est un polysaccharide linéaire composé essentiellement de molécules de mannose mais aussi de glucose toutes unies par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ (Figure 8f). Il peut donc être considéré comme une chaîne de mannose dans laquelle des molécules de glucose sont insérées aléatoirement. Le degré de polymérisation et la proportion de glucose varie d'une espèce

à l'autre. Le glucomannane de konjac est l'un des plus longs avec un degré de polymérisation d'environ 6 000 et il contient en moyenne 1,6 molécules de mannose par molécule de glucose.

6.1.7 Le galactomannane

Le galactomannane est un polysaccharide dont la chaîne principale est constituée de molécules de mannose liées par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ avec pour substituant des groupements galactosides reliés de manière $\alpha(1\rightarrow6)$ à la chaîne principale (Figure 8g) (McCleary *et al.*, 1985). La proportion de galactose au sein du galactomannane varie selon l'espèce. Pour le glucomannane de caroubier, cette proportion diffère très peu selon la variété de l'arbre avec une moyenne de 22 %. La distribution des groupements α-D-galactopyranose est aléatoire mais se fait de manière non-régulière, donc sans patron défini. Suite à l'hydrolyse partielle du galactomannane, les substituants sont présents sur des unités mannose isolées ou sur deux molécules de mannose une à la suite de l'autre. Rares sont les groupes de trois molécules de mannose consécutives substituées et les groupes de quatre molécules de mannose ou plus consécutivement substituées sont absents.

6.1.8 Le galactane

Formé d'une chaîne principale d'unités de galactose unies par des liens $\beta(1\rightarrow4)$, le degré de polymérisation du galactane varie d'une espèce à l'autre et peut même différer selon sa localisation au sein d'une même espèce (Figure 8h) (Farr et Horisberger, 1978). Par exemple, la moisissure de limon *Physarum polycephalum* produit deux galactanes soit un extracellulaire et un autre nucléaire. Dans le premier cas, le degré de polymérisation est d'environ 160 et contient 91 % de galactose, 4,2 % de phosphate et 2,8 % de sulfate. Pour sa part, le galactane nucléaire contient 88,5 % de galactose, 2,5 % de phosphate ainsi que 9,6 % de sulfate et son degré de polymérisation est d'environ 560.

6.1.9 L'amylose

L'amylose est un polysaccharide non-substitué composé de molécules de glucose liées de façon $\alpha(1\rightarrow4)$ dont le degré de polymérisation est de l'ordre de 1 000 (Figure 8i) (Imberty *et al.*, 1988; Jane *et al.*, 1985). En trois dimensions, l'amylose se présente sous la forme d'une double hélice gauche dont la cohésion entre les deux brins est rendue possible grâce à des ponts hydrogène en plus des interactions de van der Waals. L'amylose sert principalement de réserve d'énergie chez les plantes vertes.

6.1.10 Le *p*-nitrophénylcellobiose

Le *p*-nitrophénylcellobiose (*p*-NPG_2) est un dérivé synthétique du cellobiose où un groupement *p*-nitrophényle est lié au carbone anomérique via un lien glycosidique (Figure 8j) (Day et Withers, 1985). Bien que cette molécule ne soit pas retrouvée dans la nature, les enzymes qui lient le cellotriose peuvent reconnaître le *p*-NPG_2 et cliver le lien glycosidique artificiel relâchant ainsi du cellobiose et du *p*-nitrophénol. Ce dernier absorbe la lumière à une longueur d'onde de 405 nm et l'activité enzymatique peut par conséquent être quantifiée à l'aide d'une courbe standard de *p*-nitrophénol.

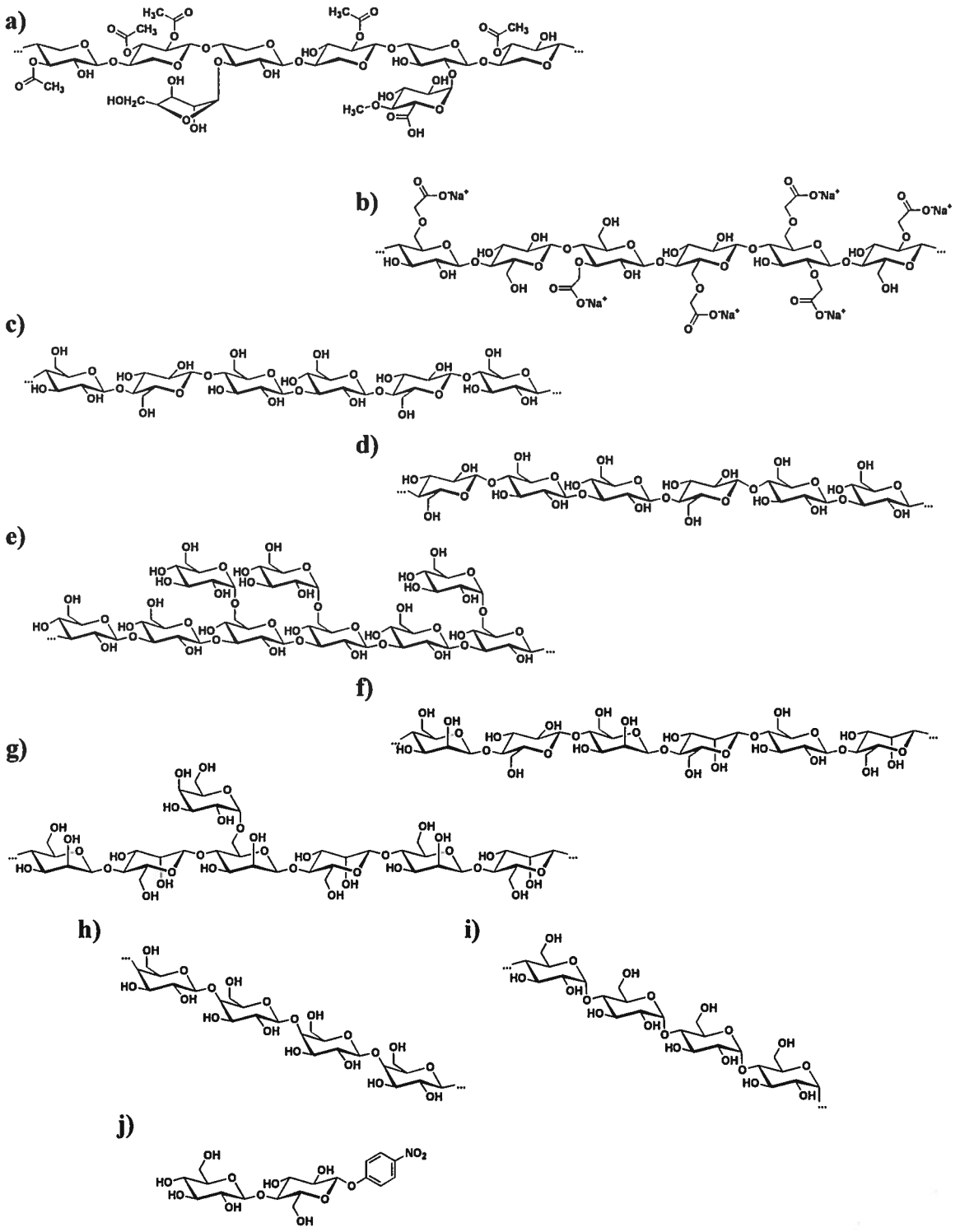


Figure 8 : Structure des saccharides utilisés dans la présente étude. a) Le xylane, b) le carboxymétylcellulose, c) le β-glucan, d) le lichenane, e) le laminarin, f) le glucomannane, g) le galactomannane, h) le galactane, i) l'amylose et j) le *p*-nitrophénylcellobiose.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1.0 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

Les protéines sont modélisées à l'aide du logiciel Molecular Operating Environment (MOE) version 2001.01 (Chemical Computing Group) installé sur un ordinateur de type PC. Pour instaurer un pont hydrogène ou une interaction hydrophobe, la distance maximale entre deux atomes est fixée à 4,5 Å. Les résidus histidine sont considérés basiques et les résidus méthionine hydrophobes. La superposition des structures se fait automatiquement en alignant les séquences en acides aminés. Pour ce faire, la fonction *Align* est utilisée avec l'option des structures secondaires réelles sélectionnée. De plus, seuls les trois résidus strictement conservés chez les enzymes du clan GH-A sont contraints à être alignés et superposés ensemble (section 3.4 du chapitre Revue bibliographique).

2.0 PRODUITS CHIMIQUES

La liste exhaustive de tous les produits utilisés au cours de ce travail est présentée à l'annexe B. Ces produits sont tous de grade égal ou supérieur aux normes de « l'American Chemical Society ».

3.0 SOUCHES BACTÉRIENNES DE *STREPTOMYCES LIVIDANS*

La souche hôte mutante 10-164 est utilisée lors de la transformation des gènes mutants de la xylanase 10A. Cette souche ne présente aucune activité xylanolytique ou cellulolytique (Mondou *et al.*, 1986). Elle est le fruit d'une mutagenèse au *N*-méthyle-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) de la souche sauvage *S. lividans* 1326. Le NTG a induit une mutation sur le gène *msi*K dans la région codant pour les acides aminés du site de liaison à l'ATP rendant ainsi la protéine MsiK incapable d'hydrolyser l'ATP (Hurtubise *et al.*, 1995). Cette énergie chimique générée normalement par MsiK est nécessaire au système de transport du xylobiose et du cellobiose vers l'intérieur de la cellule et ces disaccharides seraient responsables de l'induction des gènes codant pour les xylanases et les cellulases.

La souche IAF932 est utilisée pour la surproduction de la xylanase 10A de type sauvage. Cette souche est le résultat de la transformation du plasmide pIAF932, qui contient le gène de la xylanase 10A, dans la souche hôte 10-164 (Jodoin, 1999).

4.0 VECTEUR D'EXPRESSION C209

Le plasmide pIJ702 est un vecteur de *Streptomyces* qui est présent en copies multiples (Gusek et Kinsella, 1992). Il contient une région essentielle à sa réplication chez *S. lividans*, le gène *mel* codant pour une tyrosinase nécessaire à la production de pigments de mélanine ainsi qu'un gène de résistance à l'antibiotique thiostrepton ce qui permet la sélection des transformants. Le vecteur c209 est un dérivé du vecteur pIJ702 duquel le promoteur a été changé pour le promoteur fort c109 créé par mutagenèse au NTG et qui n'est pas réprimé par le glucose. De plus, une région nécessaire à la réplication de l'ADN chez *Escherichia coli* a été introduite ce qui permet une production du vecteur chez *E. coli* dont l'isolement de plasmide est beaucoup plus efficace que chez *S. lividans*.

5.0 MILIEUX DE CULTURE

5.1 Milieux solides

Le milieu solide R5 (Annexe C) est utilisé pour la régénération des cellules suite à la transformation. Pour la production des spores servant à l'inoculation de milieux liquides ou à la conservation des souches, la culture se fait sur le milieu Bennett-thio (Annexe D).

5.2 Milieux liquides

Le milieu riche tryptone de soja (TSB) (Annexe E) est utilisé pour produire des cellules de *S. lividans* en grande quantité. Le mycélium ainsi obtenu sert à inoculer le

milieu minimal M14 (Annexe F) contenant 67 mM de xylose qui est utilisé pour la surproduction des enzymes.

6.0 CONSERVATION DES SOUCHES DE *S. LIVIDANS*

La conservation des souches de *S. lividans* à court terme se fait sur milieu solide Bennett-thio (Annexe D) préalablement incubé sept jours à 34°C. Cette culture peut servir à inoculer tant un milieu liquide TSB qu'un autre milieu solide Bennett-thio qui est alors incubé sept jours à 34°C.

Pour conserver les souches d'intérêt à long terme, leurs spores sont lyophilisés. Pour ce faire, quatre plats de Pétri contenant du milieu solide Bennett-thio (Annexe D) sont inoculés et incubés à 34°C durant sept jours. Les spores des quatre plats de Pétri sont alors récoltés dans une solution de lait écrémé 10 % (v/v) qui est répartie dans huit ampoules de verre à lyophilisation (Wheaton). Une fois leur contenu lyophilisé, ces ampoules sont scellées à la flamme sous vide et entreposées à 4°C.

7.0 ISOLEMENT DE PLASMIDE DE *S. LIVIDANS*

La méthodologie suivie est dérivée de celle décrite par Hopwood *et al.*, (1985). Un culot de 100 µL de mycélium, obtenu d'une culture de 100 mL en milieu M14 (Annexe F), est lavé avec 500 µL d'une solution qui contient 300 mM de saccharose, 25 mM de Tris et 25 mM d'EDTA à pH 8,0. Après une centrifugation à la température de la pièce de 30 s à 13 000 g, le surnageant est retiré, le mycélium est suspendu dans 400 µL de la même solution qui contient 0,14 mM de lysozyme (Pharmacia LKB) et 3,65 µM d'ARNase (Sigma) et le tout est incubé 30 min à 37°C. Puis, 250 µL d'une solution contenant 300 mM de NaOH et 70 mM de SDS est ajouté et ce mélange est agité immédiatement au vortex pendant 10 s pour ensuite être incubé dans un bain d'eau à 70°C jusqu'à ce que la température de l'eau se situe sous les 40°C. Par après, 200 µL d'une solution faite à base de chloroforme contenant 10,63 M de phénol et 6,8 mM de 8-hydroxyquinoline est ajouté et ce mélange est agité au vortex 10 s avant d'être

centrifugé à la température de la pièce 5 min à 13 000 g. De la phase aqueuse, 400 µL est transféré dans un tube neuf contenant 1,2 mL de tampon QX1 de la trousse QIAEX II (Qiagen) et 20 µL de HCl 1,5 M. Ce tampon contient des sels chaotropes servant à dénaturer et à dissoudre les protéines du milieu. À ce mélange est ajouté 20 µL de la solution QIAEX II dont la résine de silice, aidée par la forte teneur en sels et le faible pH, se lie à l'ADN. Ce dernier est alors purifié selon la procédure prescrite par le fabriquant et l'élution de l'ADN se fait à l'aide de deux fois 25 µL d'eau Milli-Q autoclavée.

8.0 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

8.1 Conditions de la réaction

Les réactions de PCR sont effectuées avec un appareil de type Genius de Techne et elles ont lieu dans des tubes à parois minces de 200 µL (Sarstedt). Le volume final du mélange réactionnel est de 100 µL et il contient 10 % (v/v) de tampon pour la polymérase de l'ADN *Pwo* (100 mM de Tris-HCl (pH 8,85), 250 mM de chlorure de potassium, 50 mM de sulfate d'ammonium et 20 mM de sulfate de magnésium), 1 mM de sulfate de magnésium, 4 % (p/v) de propionamide, 0,05 % (v/v) de Tween 20, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide, 60 µM de chaque amorce, environ 1 ng d'ADN matrice et 5 unités de polymérase de l'ADN *Pwo* (Roche). Pour éviter l'activité 3'→5' exonucléase de la *Pwo* en absence des désoxyribonucléotides, ce qui aurait pour effet de dégrader les amorces et la matrice, deux solutions de 50 µL sont préparées séparément et mises en contact à une température supérieure à 55°C. Pour se faire, une première solution contenant tout sauf la polymérase de l'ADN, est placée dans le tube avec environ 20 mg de paraffine et le tout est chauffé 5 min à 72°C puis maintenue 10 s à 20°C. Puisque la paraffine a un point de fusion de 55°C et qu'elle n'est pas soluble dans l'eau, durant ce traitement elle fond et se solidifie à nouveau pour former une couche solide au-dessus de la première solution. Alors, une deuxième solution contenant tout sauf les désoxyribonucléotides, les amorces et l'ADN matrice, est ajoutée et la température est élevée à 95°C durant trois minutes. Puis, 30 cycles sont effectués en commençant par une dénaturation des brins d'ADN de 30 s à 94°C suivi d'un appariement des amorces de 30 s

à 55°C et d'une élongation des nouveaux brins d'ADN de 1 min à 72°C. Après le dernier cycle, l'élongation à 72°C est maintenue durant 7 min puis la température redescend jusqu'à 5°C.

8.2 Mutagenèse dirigée

La figure 9 illustre la stratégie de mutagenèse dirigée par PCR décrite par Higuchi, (1990). Tout d'abord, deux réactions de PCR sont effectuées afin d'amplifier séparément les portions du gène codant pour les régions N-terminale et C-terminale de la protéine tout en introduisant la mutation désirée. Pour ce faire, en plus des amorces externes en amont ou en aval du gène, un oligonucléotide contenant la mutation est utilisé pour amplifier la première partie du gène et l'oligonucléotide complémentaire inverse est utilisé pour amplifier la deuxième partie. Dans un deuxième temps, les deux produits de PCR résultants sont utilisés ensemble comme ADN matrice pour une nouvelle réaction de PCR. À ce moment, les quatre brins d'ADN différents peuvent s'apparier de quatre façons mais une seule de ces possibilités peut mener à une élongation par la polymérase de l'ADN. Il s'agit du cas où la mutation est du côté 3' des brins puisque la polymérase ajoute des nucléotides uniquement du côte 3' de l'ADN. Pour permettre un bonne élongation de ces deux brins complémentaires, les 5 premiers cycles ont lieu sans amorces. Puis, les deux amorces externes, utilisées séparément lors de la première étape, sont introduites et les 25 cycles restant sont effectués pour permettre au gène mutant complet d'être amplifié.

Le tableau 3 montre la séquence en acides nucléiques des amorces utilisées pour produire les différentes mutations sur le gène de la xylanase 10A. Pour des fins de clonage, l'amorce externe en amont du gène contient le site de restriction *Sph*I, qui renferme le codon de départ ATG, et l'amorce externe en aval du gène possède le site de restriction *Sac*I placé immédiatement après le codon de terminaison TGA. Toutes les amorces oligonucléotidiques sont synthétisées à l'aide d'un appareil de type Gene Assembler 4 Primers de Pharmacia.

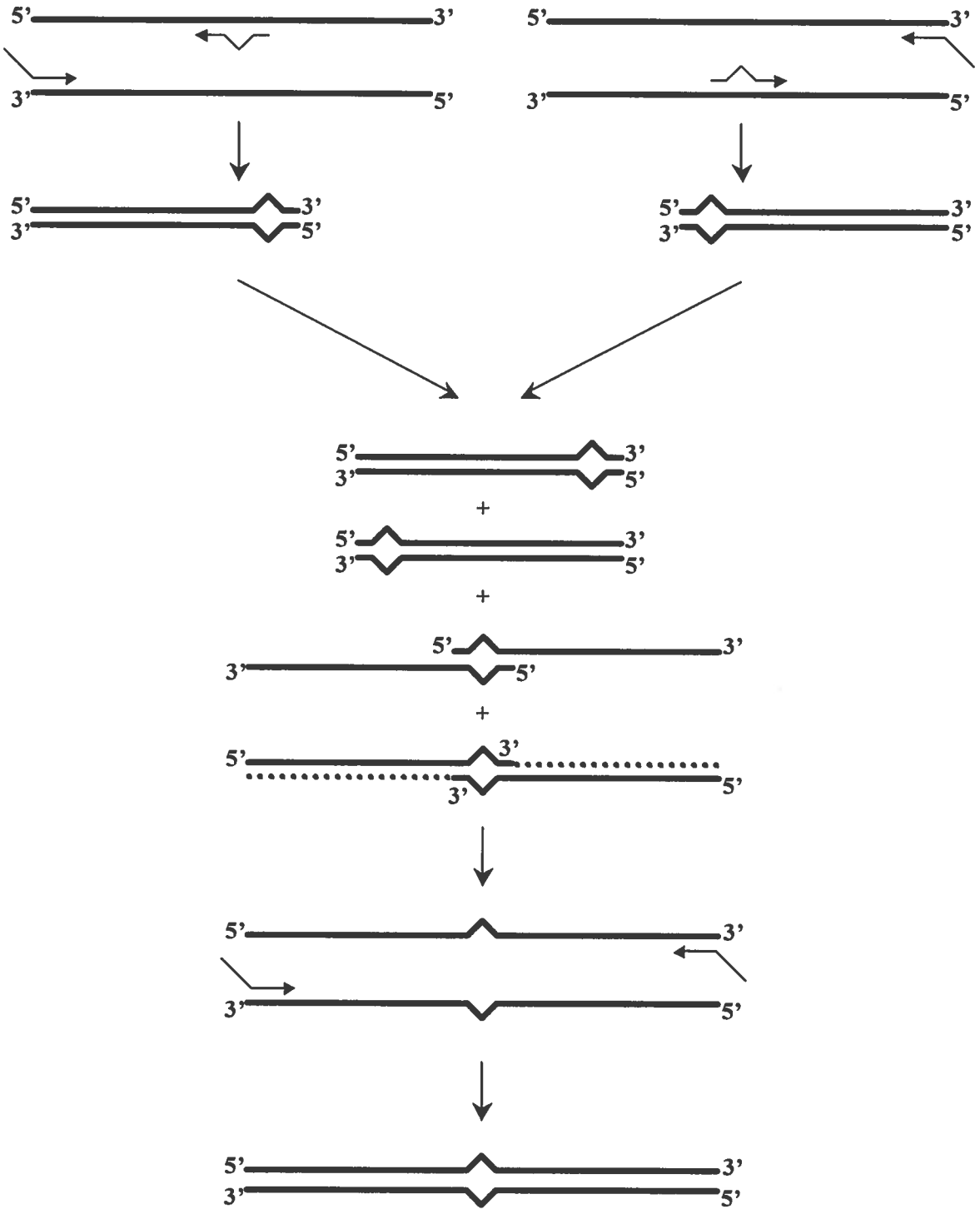


Figure 9 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR. (Adapté de Higuchi, 1990).

Tableau 3 : Oligonucléotides employés comme amorce lors des diverses amplifications par PCR. Les lettres en caractère gras représentent, le cas échéant, les nucléotides qui induisent une mutation.

Nom de l'amorce	Type d'amorce	Séquence nucléotidique (5'→3')	Mutation apportée
CD 100	Amont	GG GGC ATG CGC TCC TAC GCC CTT CCC AGA TCA GG *Sph*I	-
CD 101	Aval	AT ATA GAG CTC TCA GCC GTT GAG TGC *Sac*I	-
CD 1220	Interne	TTC AAC ATG GTG **CG**G GCC GAG AAC GAG AT	T42R
CD 1221	Interne	AT CTC GTT CTC GGC C**CG** CAC CAT GTT GAA	T42R
CD 1222	Interne	ATC GAC TGC **T**TC GGC TTC CAG TCG CAC TT	V202F
CD 1223	Interne	AA GTG CGA CTG GAA GCC GA**A** GCA GTC GAT	V202F
CD 1224	Interne	ATC GAC TGC **TA**C GGC TTC CAG TCG CAC TT	V202Y
CD 1225	Interne	AA GTG CGA CTG GAA GCC G**TA** GCA GTC GAT	V202Y
CD 1226	Interne	AC GTG GCC ATC **GG**C GAG CTG GAC AT	T235G
CD 1227	Interne	AT GTC CAG CTC G**CC** GAT GGC CAC GT	T235G
CD 1228	Interne	ATC ACC GAG CTG G**G**C ATC CAG GGC GCC CCG GCC T	D238G
CD 1229	Interne	A GGC CGG GGC GCC CTG GAT G**C**C CAG CTC GGT GAT	D238G
CD 1230	Interne	AC AGC GAC TCC TGG **GC**G TCG GAG CAG ACG CCG TT	R275A
CD 1231	Interne	AA CGG CGT CTG CTC CGA C**GC** CCA GGA GTC GCT GT	R275A
C209F	Séquençage	ACCAGCCTTCATCAGGAGAA	-
C209R	Séquençage	AGAAGGTCAGTTGGAGGGGAA	-

9.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES CHEZ *S. LIVIDANS*

9.1 Digestion de l'ADN par des enzymes de restrictions

Qu'il s'agisse d'un produit de PCR ou d'un vecteur, la digestion par des enzymes de restriction est faite dans une solution contenant environ 1 µg d'ADN, 10 unités d'enzyme de restriction *Sac*I (Pharmacia LKB), 10 unités d'enzyme de restriction *Sph*I (Pharmacia LKB) et 10 % (v/v) de tampon One-Phor-All PLUS 10X (OPA+ 10X) (Pharmacia LKB) composé de 100 mM de Tris-acétate (pH 7,5), 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium. Après 1 heure d'incubation à 37°C, du tampon OPA+ 10X est ajouté pour obtenir une concentration finale de 20 % (v/v) car, selon le fabricant, l'activité de l'enzyme de restriction *Sph*I est optimale dans ces conditions. Après une autre heure d'incubation à 37°C, la solution est chauffée 20 min à 65°C afin d'inactiver les enzymes puis 10 min à la température de la pièce.

9.2 Isolement de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

La solution d'ADN digéré par les enzymes de restriction est ensuite diluée à 83 % (v/v) dans du tampon de chargement 6X contenant 3,7 mM de bleu de bromophénol, 4,6 mM de xylène cyanol et 15 % (p/v) de ficoll. Le tout est chargé sur un gel d'agarose 0,7 % (p/v) dissout dans du tampon d'électrophorèse TBE (89 mM de Tris, 89 mM d'acide borique et 2 mM d'EDTA à pH 8,0) contenant 1,3 µM de bromure d'éthidium. L'ADN digéré est séparé en appliquant sur le gel un courrant électrique de 120 V durant 1 heure. Le marqueur de paires de bases 1 Kb Plus (Gibco BRL) sert de référence et l'agarose contenant le fragment d'ADN désiré est ensuite excisé avec un scalpel et l'ADN est purifié à l'aide de la trousse QIAEX II (Qiagen) selon la procédure prescrite par le fabricant. Lors de la dernière étape, l'ADN purifié est élué avec deux fois 25 µL d'eau Milli-Q autoclavée.

9.3 Ligation des inserts dans le vecteur d'expression

Environ 200 à 400 ng de vecteur c209 et 500 ng d'insert, préalablement digérés avec les enzymes de restriction *Sac*I et *Sph*I, sont incubés ensemble dans une solution contenant 10 % (v/v) de tampon OPA+ 10X (section 8.1), 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP) et 5 unités d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia LKB). Le mélange est incubé 16 heures à la température de la pièce.

10.0 TRANSFORMATION CHEZ *S. LIVIDANS*

Dans un tube Eppendorf stérile, 20 µL de produit de ligation sont mélangés doucement à 50 µL de protoplastes de la souche 10-164 préparés à l'aide de la méthode développée par Hopwood *et al.*, (1985). Puis sont ajoutés 200 µL d'une solution 25 % (v/v) de polyéthylène glycol 1 000. Le mélange est incubé 1,5 min à la température de la pièce puis 200 µL sont utilisés pour inoculer un plat de Pétri contenant du milieu R5 (Annexe C) à l'aide de billes de verre (Worthington *et al.*, 2001). Suite à une incubation de 16 heures à 34°C, la sélection des clones se fait en ajoutant 0,3 µmol de thiostrepton, dilué dans de l'eau Milli-Q stérile, réparti uniformément sur le milieu solide. Lorsque la solution d'antibiotique est complètement absorbée, une incubation à 34°C est faite jusqu'à l'apparition de colonies (2 à 3 jours).

11.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES

Afin d'obtenir la séquence en ADN des gènes mutés, le plasmide de chaque souche est initialement isolé et incubé 1 heure à 37°C avec 5 unités d'enzyme de restriction *Bam*H I (Pharmacia LKB) pour linéariser le vecteur puis 15 min à 65°C afin d'arrêter la réaction. Ce mélange est utilisé comme source d'ADN matrice lors d'une amplification par PCR (section 8.1 du présent chapitre) avec les amorces C209F et C209R (Tableau 3). Le contenu de l'amplification est chargé et séparé sur un gel d'agarose et la bande correspondant à un fragment d'environ 1 000 paires de bases est excisé et purifié (section 9.2 du présent chapitre). Les deux brins de cet ADN sont ensuite

séquencés avec la méthode décrite par Sanger *et al.*, (1977) à l'aide des amorces C209F et C209R qui ont servi initialement à amplifier les gènes mutés (Tableau 3).

12.0 PRODUCTION DES ENZYMES

12.1 Conditions de pré-culture

Les spores provenant d'un plat de Pétri de milieu solide Bennett-thio, préalablement incubé durant 7 jours, sont utilisés pour ensemencer 12,5 mL de milieu TSB (Annexe E) contenant 3 µM de thiostrepton dans une fiole Erlenmeyer de 125 mL avec cinq billes de verre afin d'éviter l'agrégation des bactéries. Suite à une incubation de 24 heures à 34°C avec une agitation de 240 rpm, le milieu de pré-culture est centrifugé à la température de la pièce 5 min à 1 750 g et le mycélium obtenu sert à inoculer jusqu'à 200 mL de milieu M14.

12.2 Conditions de culture

La production d'enzyme se fait en fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant 5 billes de verre dans 100 mL de milieu liquide M14 (Annexe F) avec 67 mM de xylose comme source de carbone. Deux fioles Erlenmeyer sont utilisées pour chaque souche sauf pour la souche IAF932-V202F qui en requiert huit. L'incubation dure 48 heures à 34°C avec une agitation de 240 rpm.

13.0 PURIFICATION DES ENZYMES

13.1 Recouvrement et concentration des protéines

La xylanase 10A et les enzymes mutantes générées sont des protéines sécrétées et par conséquent, seul le milieu de culture est récupéré lors de leur production. Toutes les cultures d'une même souche sont mises ensemble et filtrées simultanément sur une membrane de pré-filtration AP20 (Millipore) et sur une membrane de filtration de nylon

d'une porosité de 0,2 µm (Whatman). Le filtrat est alors concentré à l'aide d'un appareil d'ultrafiltration de la compagnie Amicon avec une membrane d'une porosité de 3 kDa (Pall Filtron) jusqu'à environ 5 à 10 mg/mL de protéines totales.

13.2 Tamis moléculaire

Les enzymes des milieux de culture concentrés sont purifiées à l'aide de deux systèmes en parallèle qui diffèrent par la dimension des colonnes, la nature du gel utilisé ainsi que par le débit de l'éluant. La première colonne a un diamètre interne de 3,5 cm, une hauteur de 60 cm et elle contient du gel Superdex 75-HR (Pharmacia Biotech). La seconde colonne a un diamètre interne de 2,6 cm, une hauteur de 60 cm et elle contient du gel Sephacryl® S-100 (Pharmacia Biotech). Les colonnes sont équilibrées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 avec un débit linéaire de 5,5 à 6 cm/h pour la colonne de Superdex 75-HR et de 11 à 12 cm/h pour la colonne de Sephacryl® S-100. Le débit est maintenu à l'aide de pompes péristaltiques Pump P-1 (Pharmacia LKB). L'échantillon concentré est filtré à l'aide d'un dispositif Milliex®-GP de 0,2 µm de porosité (Millipore) puis 15 à 25 mg de protéines totales sont introduites dans chaque système à l'aide d'injecteurs automatiques V-7 (Pharmacia Biotech). Les fractions contenant des protéines sont identifiées par un détecteur Optical Unit UV-1 (Pharmacia LKB) dont la longueur d'onde est fixe à 280 nm. Le profil d'élution est tracé par un enregistreur réglé à 1 mm/min. La collecte des fractions débute 90 min après l'injection et elle se fait à l'aide de collecteurs de fraction FRAC-100 (Pharmacia LKB) à raison de 4 min par fraction. Selon le profil d'élution, les fractions contenant des protéines sont analysées par SDS-PAGE (section 13.2) et les fractions provenant des deux systèmes qui contiennent de l'enzyme pure sont mises en commun. Ce mélange de fractions est alors concentré à l'aide d'un appareil d'ultrafiltration de la compagnie Amicon avec une membrane d'une porosité de 3 kDa (Pall Filtron) jusqu'à une concentration d'environ 1 mg/mL.

14.0 ANALYSE DES PROTÉINES

14.1 Dosage

Le dosage des protéines totales est fait selon la méthode développée par Lowry *et al.*, (1951). Des échantillons allant de 0 à 115,2 µg/mL de la fraction II de l'albumine de sérum bovin (Bio-Rad) ont servi à établir une courbe standard de concentration.

14.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La technique du SDS-PAGE développée par Laemmli, (1970) est utilisée pour séparer les protéines. Pour ce faire, l'appareillage Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) est utilisé avec un gel de séparation de 12,5 % (p/v) d'acrylamide et un gel d'entassement de 4 % (p/v) d'acrylamide. Le standard protéique de masse moléculaire employé est le Low Molecular Weight (Bio-Rad) contenant de la phosphorylase b du muscle de lapin (97,4 kDa), de l'albumine de sérum bovin (66,2 kDa), de l'ovalbumine du blanc d'œuf de poule (45,0 kDa), de l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa), de l'inhibiteur de trypsine de soja (21,5 kDa) et du lysozyme du blanc d'œuf de poule (14,4 kDa). La coloration du gel se fait en l'incubant 20 min à température de la pièce avec agitation dans une solution contenant 10 % (v/v) d'acide acétique, 40 % (v/v) de méthanol et 1,2 mM de bleu brillant de Coomassie. La décoloration du contenu non-protéique du gel se fait en l'incubant 16 heures à 4°C dans la même solution exempte de bleu brillant de Coomassie.

14.3 Immunobuvardage de type Western

Les protéines sont tout d'abord séparées par SDS-PAGE avec comme standard protéique le marqueur de masse moléculaire pré-coloré Rainbow RPN 755 (Pharmacia Biotech) qui contient de l'ovalbumine (45,0 kDa), de l'anhydrase carbonique (30,0 kDa), de l'inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), du lysozyme (14,3 kDa), de l'aprotinine (6,5 kDa) ainsi que les chaînes b et a de l'insuline (3,5 et 2,5 kDa respectivement). Puis, à l'aide de

l'appareillage Mini Trans-Blot® (Bio-Rad), le contenu du gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose Protran® (Schleicher & Schuell) dans un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 20 % (v/v) de méthanol avec un courant électrique de 30 V pendant 16 heures. Afin de saturer les sites spécifiques aux protéines restés libres, la membrane est tout d'abord incubée 30 min avec 30 mL d'une solution de blocage contenant 3 % (p/v) de gélatine dissoute dans un tampon salin (TBS) composé de 20 mM de Tris et de 500 mM de NaCl à pH 7,5. Puis, elle est lavée trois fois 5 min avec 30 mL de solution de lavage qui est composée du tampon TBS contenant 0,05 % (v/v) de Tween 80. Elle est par la suite incubée 2,5 heures avec une solution d'anticorps primaire, un mélange composé de 20 µL d'anticorps polyclonaux anti-Xyl10A produit chez le lapin, 1 mL de solution de blocage et 29 mL de solution de lavage. Puis, la membrane est lavée trois fois 5 min avec la solution de lavage avant d'être incubée 1 heure avec une solution d'anticorps secondaire qui contient 0,12 µg/mL d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (Jackson) dans 10 mL de solution de blocage et 20 mL de solution de lavage. La membrane est ensuite incubée trois fois 5 min avec la solution de lavage et 5 min avec du tampon TSB. Le développement se fait alors en incubant la membrane dans une solution de développement qui contient 15 µL d'une solution mère de *Nitro Blue Tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl Phosphate toluidine salt* (NBT/BCIP) diluée dans 10 mL d'une solution de coloration composée de 50 mM de $MgCl_2$, 100 mM de Tris et 100 mM de NaCl à pH 9,5. Lorsque le développement est satisfaisant, la membrane est lavée deux fois 5 min avec de l'eau distillée.

14.4 Focalisation isoélectrique

Pour déterminer le point isoélectrique apparent des enzymes purifiées, l'appareil *PhastSystem*™ (Pharmacia Biotech) est utilisé avec un gel PhastGel® IEF 3-9 (Pharmacia Biotech) qui contient des ampholytes de pH 3 à 9. Les échantillons sont appliqués au centre du gel à raison de 1 µg de protéine par puits. La migration des protéines est effectuée jusqu'à leur point isoélectrique selon la fiche n° 100 des techniques de séparation du *PhastSystem*™ (Pharmacia Biotech). La coloration est faite au nitrate d'argent selon la fiche n° 210 des techniques de développement du *PhastSystem*™

(Pharmacia Biotech). Le standard utilisé est le Broad pI Calibration Kit (Pharmacia Biotech) dont le point isoélectrique des composantes varie de pH 3,5 à 9,3.

14.5 Spectrométrie de masse

Les échantillons analysés par spectrométrie de masse ne doivent contenir que de faibles concentrations de sels. Par conséquent, chaque solution d'enzyme d'environ 1 mg/mL dans du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 est dialysée 60 heures dans 18 L d'eau Milli-Q à l'aide d'une cassette à dialyse d'une porosité de 3 kDa et d'une capacité de 0,5 à 3 mL (Pierce). Puis, l'échantillon est filtré à l'aide d'un dispositif Acrodisc d'une porosité de 0,45 µm (Gelman).

L'analyse est faite en mode d'ionisation *electrospray* positif à l'aide d'un spectromètre de masse Quatro II (Micromass) avec un voltage de 39 V appliqué au cône, un voltage de 5 V appliqué à l'extracteur, une température de la source à 100°C et une température de 130°C pour l'azote responsable de la désolvatation. Toutes les analyses ont été faites à l'INRS-Institut Armand-Frappier sous la guidance de Dr François Lépine.

14.6 Dichroïsme circulaire

Les différentes expériences sont effectuées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco 710 (Jasco Corp.) avec une cuvette cylindrique gainée ayant 0,05 cm de longueur de faisceau et avec un débit d'azote dans le compartiment d'analyse de 95 L/min. Tous les échantillons sont préalablement filtrés à l'aide de dispositifs Acrodisc de 0,45 µm de porosité (Gelman). Les spectres obtenus sont analysés à l'aide du logiciel Standard Analysis version 1.10 (Jasco Corp.) et le bruit de fond est systématiquement réduit en utilisant les paramètres proposés par défaut.

14.6.1 Spectre UV éloignés

L'expérience en UV éloignés est effectuée à la température de la pièce à partir d'une solution d'enzyme de l'ordre de 10 µM présente dans un tampon phosphate de

sodium 10 mM à pH 6,0 contenant 1 mM d'azoture de sodium. Le contrôle est composé uniquement du tampon. Le spectre brut est la moyenne de 10 acquisitions de données obtenues suite à l'émission de lumière polarisée de longueur d'onde variant de 178 à 250 nm avec une vitesse de balayage de 100 nm/min et une prise de données à chaque 0,2 nm. Pour le contrôle, les paramètres sont les mêmes sauf que le spectre est la moyenne de trois acquisitions de données. Pour chaque point du spectre, le point équivalent du contrôle est soustrait puis le traitement mathématique suivant est effectué pour convertir les millidegrés obtenus en élipticité molaire :

$$[\theta] = \text{mdeg} \cdot \frac{\text{deg}}{1000\ \text{mdeg}} \cdot \frac{1}{L} \cdot M_M \cdot \frac{1}{C}$$

$[\theta]$: élipticité molaire ($deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}$)
mdeg : millidegré
deg : degré
L : longueur parcourue par le faisceau (cm)
M_M : Masse moléculaire de l'enzyme (Da ou g/mol)
C : Concentration de l'enzyme (g/L ou mg/mL)

14.6.2 Dénaturation thermique

La température moyenne de dénaturation (T_m) est déterminée à partir d'une solution d'enzyme d'environ 10 µM présente dans un tampon phosphate de sodium 45 mM à pH 6,0 contenant 1 mM d'azoture de sodium. Cette solution est chauffée à l'aide d'un bain d'eau Neslab RTE-111 de 45 à 85°C à raison de 1°C/min. La longueur d'onde de la lumière polarisée émise est fixée à 215 nm et les données sont enregistrées à chaque 0,2°C. Pour chaque spectre, la fonction sigmoïde du cinquième degré est obtenue à l'aide du logiciel Sigma Plot 5.00 (SPSS Inc.) et les points de la courbe résultante sont convertis en fraction dénaturée en considérant que le point à 45°C a une fraction dénaturée de 0 et que le point à 85°C a une fraction dénaturée de 1. Par conséquent, la valeur du signal à 45°C est soustraite à chaque point du spectre et le résultat est divisé par la valeur du signal à 85°C. Le T_m est la température pour laquelle la fraction dénaturée est égale à 0,5.

14.7 Spectrofluorométrie

Les spectres de fluorescence sont obtenus à partir d'une solution d'enzyme d'environ 2 µM présente dans du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 et cette solution est préalablement filtrée à l'aide d'un dispositif Milliex®-GP de 0,2 µm de porosité (Millipore). Les analyses sont effectuées dans une cuvette de quartz de 700 µL (Spectrocell) avec un spectrofluoromètre Cary Eclipse (Varian) et la température de la cuvette est maintenue à 25°C à l'aide de l'accessoire « Cary single cell peltier » (Varian) relié au support de la cuvette. Le contrôle de l'appareil ainsi que l'acquisition des données est faite par un ordinateur possédant le logiciel Scan 1.0 (Varian). La longueur d'onde d'excitation de 285 nm et le spectre d'émission est pris entre 300 et 400 nm à chaque nanomètre avec une vitesse de balayage de 600 nm/min. Le spectre brut est la moyenne de 5 acquisitions de données et la fonction polynomiale cubique apparentée à chaque spectre est obtenue à l'aide du logiciel Sigma Plot 5.00 (SPSS Inc.).

15.0 CARACTÉRISATION ENZYMOLOGIQUE

15.1 Test PAHBAH

Le test de sucres réducteurs développé par Lever *et al.*, (1984) est utilisé pour déterminer l'activité spécifique des enzymes en présence des différents polysaccharides. En présence de chaleur et en milieu alcalin, l'acide *p*-hydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) réagit avec les sucres réducteurs pour former un chromophore jaune qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 405 nm.

Les réactions enzymatiques sont toutes effectuées à 40°C en quadruplicata dans un tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 et le substrat est incubé 10 min avant d'ajouter l'enzyme. Pour le contrôle, seul du tampon est ajouté au substrat. La concentration de substrat et d'enzyme ainsi que la durée du test varient selon le substrat testé (Tableau 4). La réaction enzymatique prend fin en prélevant 100 µL de milieu réactionnel et en le mélangeant à 300 µL d'une solution de 16,4 mM de PAHBAH

Tableau 4 : Conditions de réaction des différents tests PAHBAH effectués

Substrat	Concentration de substrat (% (p/v))	Concentration d'enzyme (µg/ml)	Durée de la réaction (min)
Xylane	0,9	0,4	9
Carboxyméthylcellulose	0,9	4	7
β-glucan	0,45	75-98	90
Lichenane	0,45	75-98	240
Laminarin	0,9	75-98	60
Glucomannane	0,9	75-98	45
Galactomannane	0,45	75-98	240
Galactane	0,45	75-98	180

dissout dans du NaOH 0,5 M et préalablement disposée dans des tubes Titertek de 1 mL (Bio-Rad). Les tubes sont par la suite bouchés et chauffés 5 min dans un bain d'eau à 95°C puis refroidit 5 min dans un bain d'eau glacée. De ce mélange, 200 µL est transféré dans une plaque de 96 puits (Falcon). Si la couleur est trop intense, le mélange est dilué dans du NaOH 0,5 M toujours avec un volume final de 200 µL. La densité optique à 405 nm de chaque puits est ensuite évaluée à l'aide du lecteur de plaque Microplate Autoreader EL 309 (Bio-Tek Instrument). Une courbe standard de monosaccharide de 0 à 10 mM est traitée exactement de la même manière que la réaction enzymatique.

15.2 Test au *p*-nitrophénylcellobiose (*p*-NPG_2)

Le test d'activité enzymatique en présence de *p*-NPG_2 est effectué à 40°C en triplicata dans un tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 et le substrat est incubé 10 min avant d'ajouter l'enzyme. Le mélange réactionnel contient 13,5 mM de *p*-NPG_2 et environ 0,1 µM d'enzyme. Le contrôle ne contient que 13,5 mM de *p*-NPG_2. Après 15 min, la réaction est arrêtée en diluant 100 µL du mélange dans 100 µL de Na_2CO_3 1 M directement dans une plaque de 96 puits (Falcon). Les points d'une courbe standard de

p-nitrophénol allant de 0 à 0,30 mM sont dilués de la même manière. La densité optique du *p*-nitrophénol des différents puits est évaluée à une longueur d'onde de 405 nm à l'aide du lecteur de plaque Microplate Autoreader EL 309 (Bio-Tek Instrument).

16.0 ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Les produits issus de l'hydrolyse de différents saccharides sont analysés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anion. Tous les tests enzymatiques préalables à l'analyse sont faits à une température de 40°C dans un tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,0 et le substrat est incubé 10 min avant d'ajouter l'enzyme. Pour le contrôle, seul du tampon est ajouté au substrat. Après différents temps d'incubation, une partie du mélange réactionnel est prélevé et dilué dans de l'eau Milli-Q pour une concentration de 16,7 % (v/v) pour les tests faits avec le xylane, le cellopentaose et le laminaripentaose et une concentration de 25 % (v/v) pour tous les tests faits avec les polysaccharides autres que le xylane. Dans tous les cas, le volume final est de 360 µl et ce mélange est chauffé 10 min à 110°C pour ainsi mettre fin à la réaction. La concentration de substrat, la concentration d'enzyme ainsi que le temps des différents prélèvements sont des paramètres qui varient selon le substrat testé (Tableau 5).

Suite à la dénaturation thermique, l'échantillon est centrifugé à la température de la pièce 5 min à 13 000 g et le surnageant injecté, à l'aide d'un auto-échantillonneur AS3500 (Thermo Separation Products), sur une colonne CarboPak™ PA-1 (Dionex) de 4 mm de diamètre par 250 mm de hauteur qui est reliée au système HPLC DX-500 (Dionex) muni d'un détecteur à ampérométrie pulsée. La gestion de ces périphériques et l'acquisition des données se fait par un ordinateur possédant le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex). Le débit linéaire est fixé à 477,5 cm/h et les produits d'hydrolyse sont séparés en utilisant le programme d'élution décrit au tableau 6. Les standards saccharidiques de 0,167 mM de concentration sont chauffés, centrifugés, injectés et élués exactement comme les échantillons provenant d'une réaction enzymatique.

Tableau 5 : Conditions de réaction des tests enzymatiques préalables à l'analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie à échange d'anions

Substrat	Concentration de substrat	Concentration d'enzyme (µg/ml)
Xylane	0,9 % (p/v)	0,4
β-glucan	0,25 % (p/v)	375-480
Lichenane	0,25 % (p/v)	375-480
Laminarin	0,5 % (p/v)	375-480
Glucomannane	0,5 % (p/v)	375-480
Galactomannane	0,25 % (p/v)	375-480
Galactane	0,25 % (p/v)	375-480
Amylose	0,5 % (p/v)	375-480
Cellopentaose	1 mM	375-480
Laminaripentaose	1 mM	375-480

Le temps des différents prélèvements est précisé sur les chromatogrammes appropriés dans le chapitre Résultats

Tableau 6 : Programme d'élution des produits d'hydrolyse sur la colonne CarboPak™ PA-1

Temps (min)	A (%)	B (%)
Initial	100	0
2	100	0
	Gradient linéaire	
40	0	100
	Gradient linéaire	
40,5	100	0
60	100	0

A : NaOH 200 mM
B : Acétate de sodium 500 mM dans NaOH 200 mM

RÉSULTATS

1.0 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

1.1 Superposition des structures disponibles du clan GH-A avec la xylanase 10A de *Streptomyces lividans*

Les différentes structures disponibles du clan GH-A ont été superposées individuellement avec la xylanase 10A de *S. lividans* en ne forçant l'alignement et la superposition que des trois résidus strictement conservés chez les enzymes du clan GH-A (section 3.4 du chapitre Revue bibliographique). Le tableau 7 montre les paramètres des structures utilisées ainsi que la déviation standard (RMSD) des différente superpositions et l'homologie de séquence des alignements résultants. Selon les RMSD, les enzymes de mode *endo* se supperposent mieux à la xylanase 10A que les enzymes de mode *exo*. Il est à noter qu'au moment où ont été entrepris les travaux de modélisation moléculaire, seules les structures décrites au tableau 7 étaient disponibles. Par la suite, les structures de six enzymes sont devenues disponibles dans la « Protein Data Bank » soit une β-glucosidase de la famille 1, une endo-1,4-glucanase et une β-mannanase de la famille 5, deux xylanases de la famille 10 ainsi qu'une β-mannanase de la famille 26 (Annexe A).

1.2 Identification des résidus potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat des enzymes du clan GH-A

Les structures des enzymes de mode *endo* du clan GH-A ont été superposées individuellement avec la structure de la xylanase 10A de *S. lividans*. Ces enzymes sont les cinq cellulases et la β-mannanase de la famille 5 ainsi que l'endo-β-1,3-glucanase et la lichenase de la famille 17. De là, les brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 ont été analysés un à un pour y déceler les différences structurelles par rapport à la xylanase 10A de *S. lividans* (Figures 10 à 17). Lorsque ces acides aminés sont redondants d'une enzyme à l'autre dans la même famille, ils sont considérés comme étant potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat. La position de ces résidus chez la xylanase 10A de *S. lividans* ainsi que la nature des résidus équivalents chez les autres enzymes de mode *endo* du clan sont répertoriées au tableau 8.

Tableau 7 : Données relatives à l'alignement des séquences et à la superposition des structures disponibles du clan GH-A avec celle de la xylanase 10A de *S. lividans*

Famille	Organisme	Enzyme	Code PDB	Résolution (Å)	Nombre de résidus	RMSD* (Å)	Homologie* (% d'identité)
10	*Streptomyces lividans*	Xylanase 10A	1E0W	1,20	302	-	-
	Cellulomonas fimi	Xylanase (CEX)	2EXO	1,80	312	1,2633	52,0
	Clostridium thermocellum	Xylanase Z	1XYZ	1,40	347	1,6170	45,3
	Penicillium simplicissimum	Xylanase A	1BG4	1,75	302	1,8886	43,4
	Pseudomonas fluorescens (cellulosa)	Xylanase 10A	1CLX	1,80	347	1,8490	41,2
	Thermoascus aurantiacus	Xylanase	1TAX	1,14	302	1,8256	46,7
1	*Bacillus circulans (alkalophilus)*	β-glucosidase	1QOX	2,70	449	6,7056	7,0
	Bacillus polymyxa	β-glucosidase A	1BGA	2,40	447	7,1099	9,6
	Lactococcus lactis	6-P-β-galactosidase	1PBG	2,30	468	10,3098	21,2
	Sinapis alba	Myrosinase	1DWA	2,00	499	9,6321	19,5
	Sulfolobus solfataricus	β-galactosidase S	1GOW	2,60	489	7,5549	9,2
	Thermosphaera aggregans	β-glycosidase	1QVB	2,40	481	11,0824	19,3
	Trifolium repens	β-glucosidase 2	1CBG	2,15	490	9,4137	21,6
2	*E. coli*	β-galactosidase Z	1BGL	2,50	1023	7,1582	9,6
	Homo sapiens	β-glucuronidase	1BHG	2,60	613	5,8781	7,6
5	*Acidothermus cellulolyticus*	Endo-1,4-glucanase	1C0D	2,40	358	6,7680	10,3
	Bacillus agaradherans	Endo-1,4-glucanase 5A	1A3H	1,57	300	7,2338	9,9
	Candida albicans	Exo-1,3-glucanase	1CZ1	1,85	394	10,0243	6,0
	Clostridium cellulolyticium	Endo-1,4-glucanase A	1EDG	1,60	380	7,3298	9,3
	Clostridium thermocellum	Endo-1,4-glucanase C	1CEC	2,15	343	4,2681	5,0
	Erwinia chrysanthemi	Endo-1,4-glucanase Z	1EGZ	2,30	291	6,8253	14,9
	Thermobifida fusca	β-mannanase	1BQC	1,50	302	6,5610	11,6
17	*Hordeum vulgare*	Endo-β-1,3-glucanase GII	1GHS	2,30	306	5,0021	8,3
	Hordeum vulgare	Lichenase	1GHR	2,20	306	4,9237	5,3

* Relativement à la xylanase 10A de *S. lividans*

Figure 10 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase de *Acidothermus cellulolyticus*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-1,4-glucanase respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	A. cellulolyticus	60 TIRLP 64
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	A. cellulolyticus	110 RIILD 114
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	A. cellulolyticus	156 GFDLHNE 162
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	A. cellulolyticus	234 VYSAHDY 240
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	A. cellulolyticus	277 PVWLGEFGT 285
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	A. cellulolyticus	315 QWTFW 319

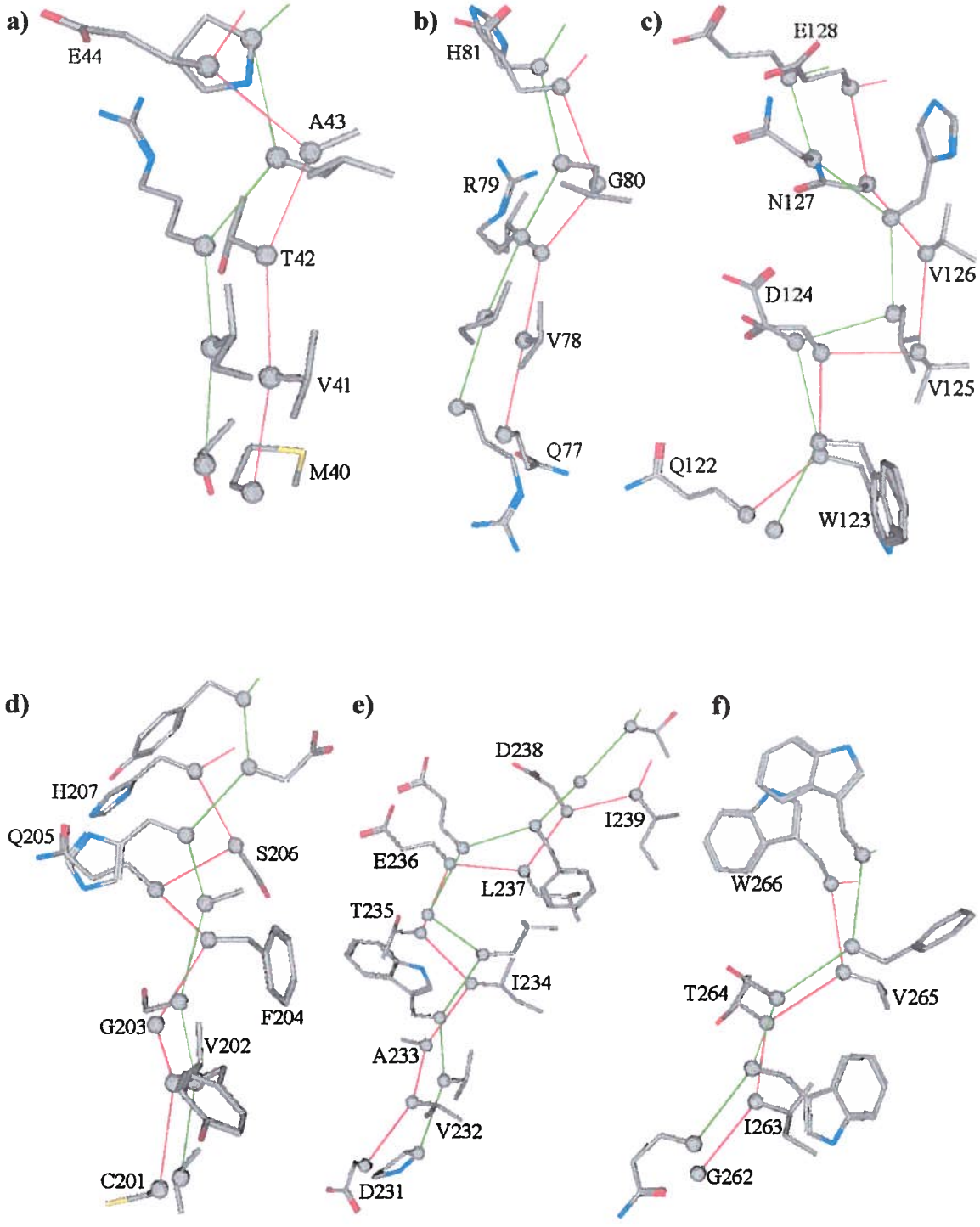

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
D238
I239
E236
L237
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
T264
V265
I263
G262

Figure 11 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase 5A de *Bacillus agaradherans*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-1,4-glucanase 5A respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	B. agaradherans	57 VFRAA 61
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	B. agaradherans	92 YVIID 96
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	B. agaradherans	130 IYEIANE 136
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	B. agaradherans	193 MYAFHFY 199
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	B. agaradherans	220 AIFVSEWGT 228
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	B. agaradherans	255 SWANW 259

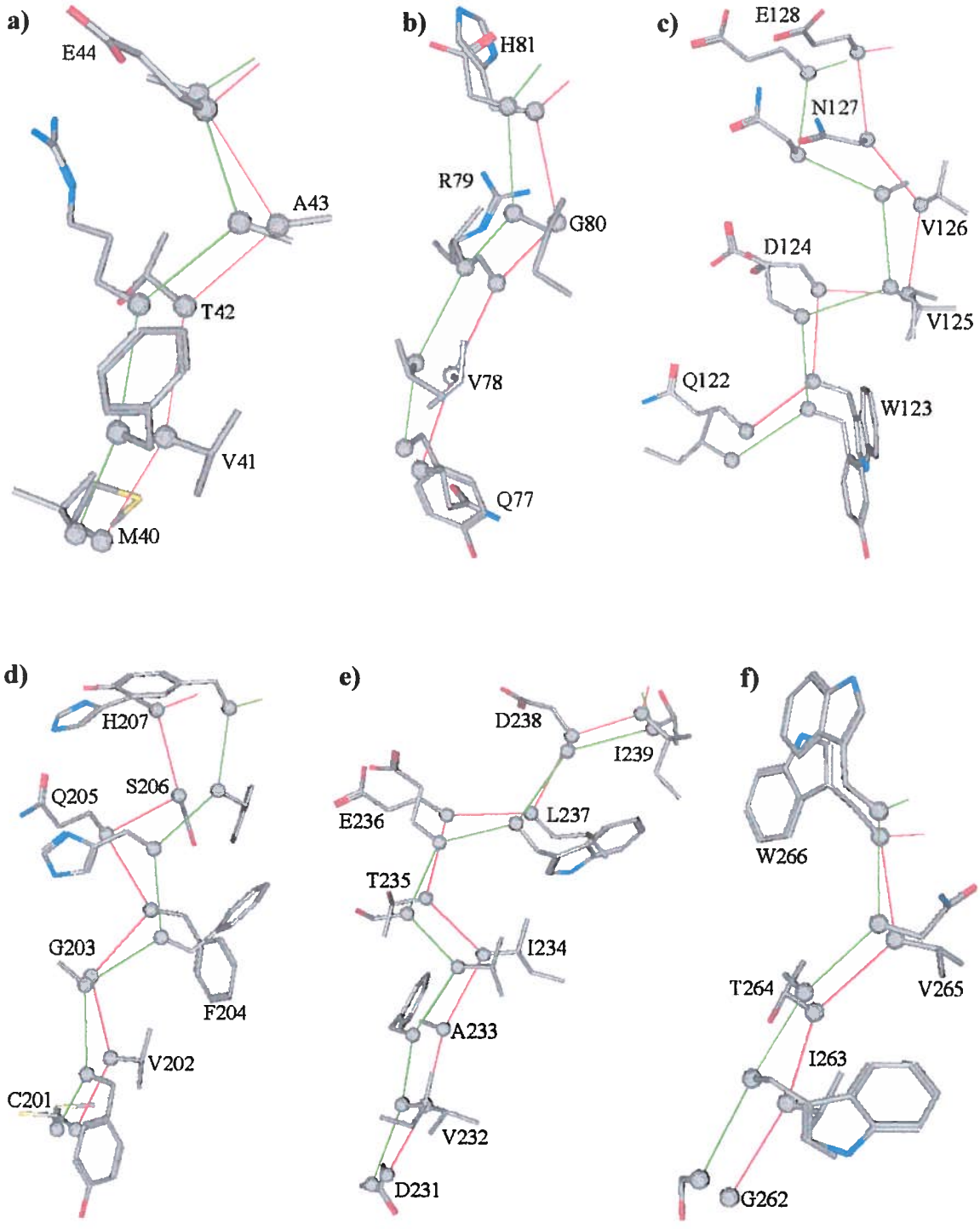

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
G203
F204
V202
C201
e)
D238
I239
E236
L237
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
T264
V265
I263
G262

Figure 12 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase A de *Clostridium cellulolyticium*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-1,4-glucanase A respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	C. cellulolyticium	78 VRIP 81
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	C. cellulolyticium	116 YVILN 120
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	C. cellulolyticium	164 IFEGMNE 170
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	C. cellulolyticium	250 IVSVHAY 256
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	C. cellulolyticium	302 PVIIGECGA 310
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	C. cellulolyticium	336 LCILW 340

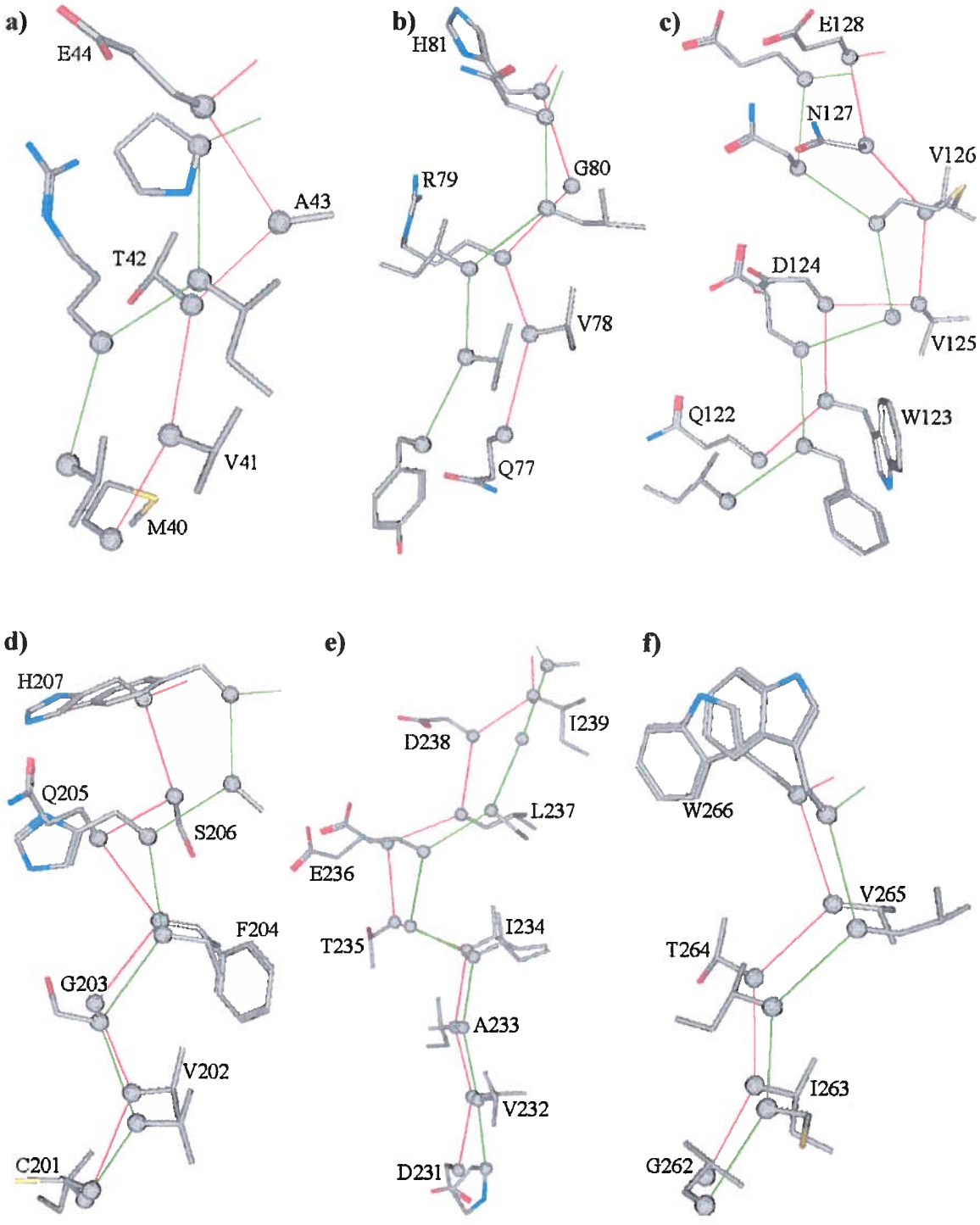

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
G80
R79
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
I239
D238
L237
E236
I234
T235
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Figure 13 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase C de *Clostridium thermocellum*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-1,4-glucanase C respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	C. thermocellum	44 VRLP 47
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	C. thermocellum	83 GLVLD 87
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	C. thermocellum	125 AFELLNE 131
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	C. thermocellum	185 VYNFHFY 191
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	C. thermocellum	266 KLYCGEFGV 274
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	C. thermocellum	300 GGAVW 304

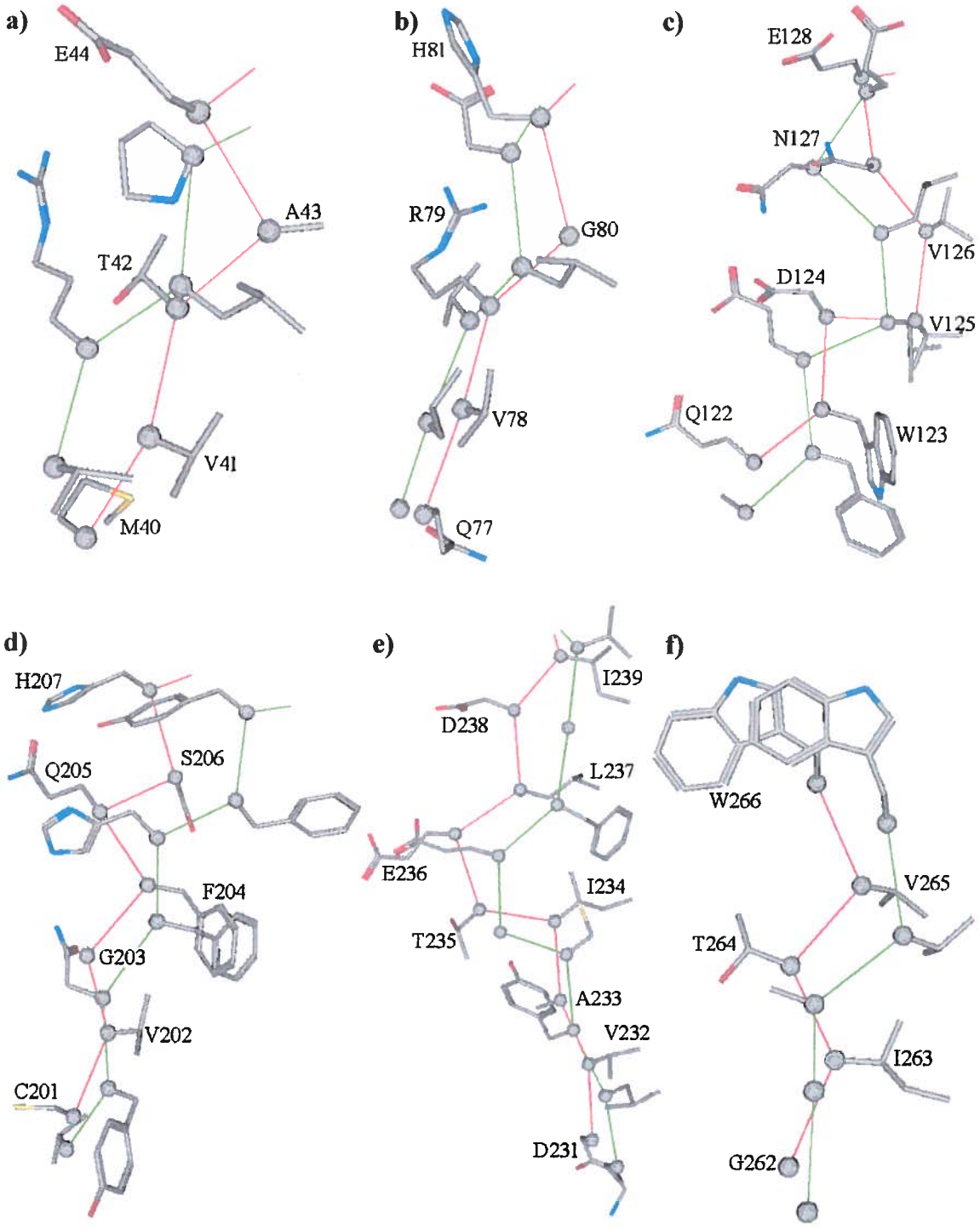

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
I239
D238
L237
E236
I234
T235
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Figure 14 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-1,4-glucanase Z de *Erwinia chrysanthemi*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-1,4-glucanase Z respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	E. chrysanthemi	55 IVRAA 59
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	E. chrysanthemi	92 YAIIG 96
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	E. chrysanthemi	127 IYEIYNE 133
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	E. chrysanthemi	188 AYTLHFY 194
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	E. chrysanthemi	215 ALFVTEWGT 223
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	E. chrysanthemi	250 SNANW 254

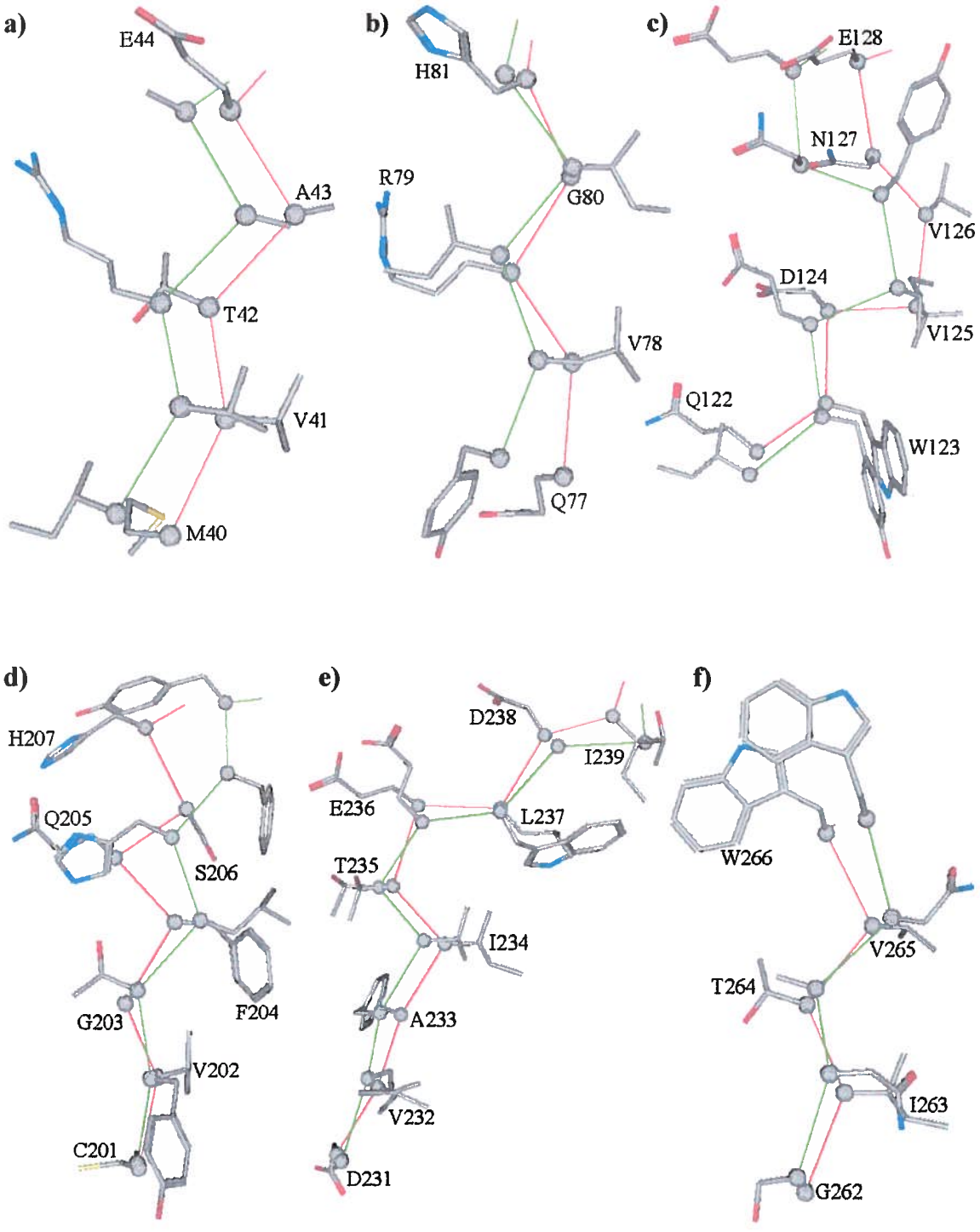

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
G203
F204
V202
C201
e)
D238
I239
E236
L237
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Figure 15 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de la β-mannanase de *Thermobifida fusca*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de la β-mannanase respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	T. fusca	48 TVRVV 52
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	T. fusca	80 ICMLE 84
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	T. fusca	122 LINIGNE 128
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	T. fusca	192 VFSIHMY 198
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	T. fusca	220 PLIIGEFGH 228
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	T. fusca	250 GYIGW 254

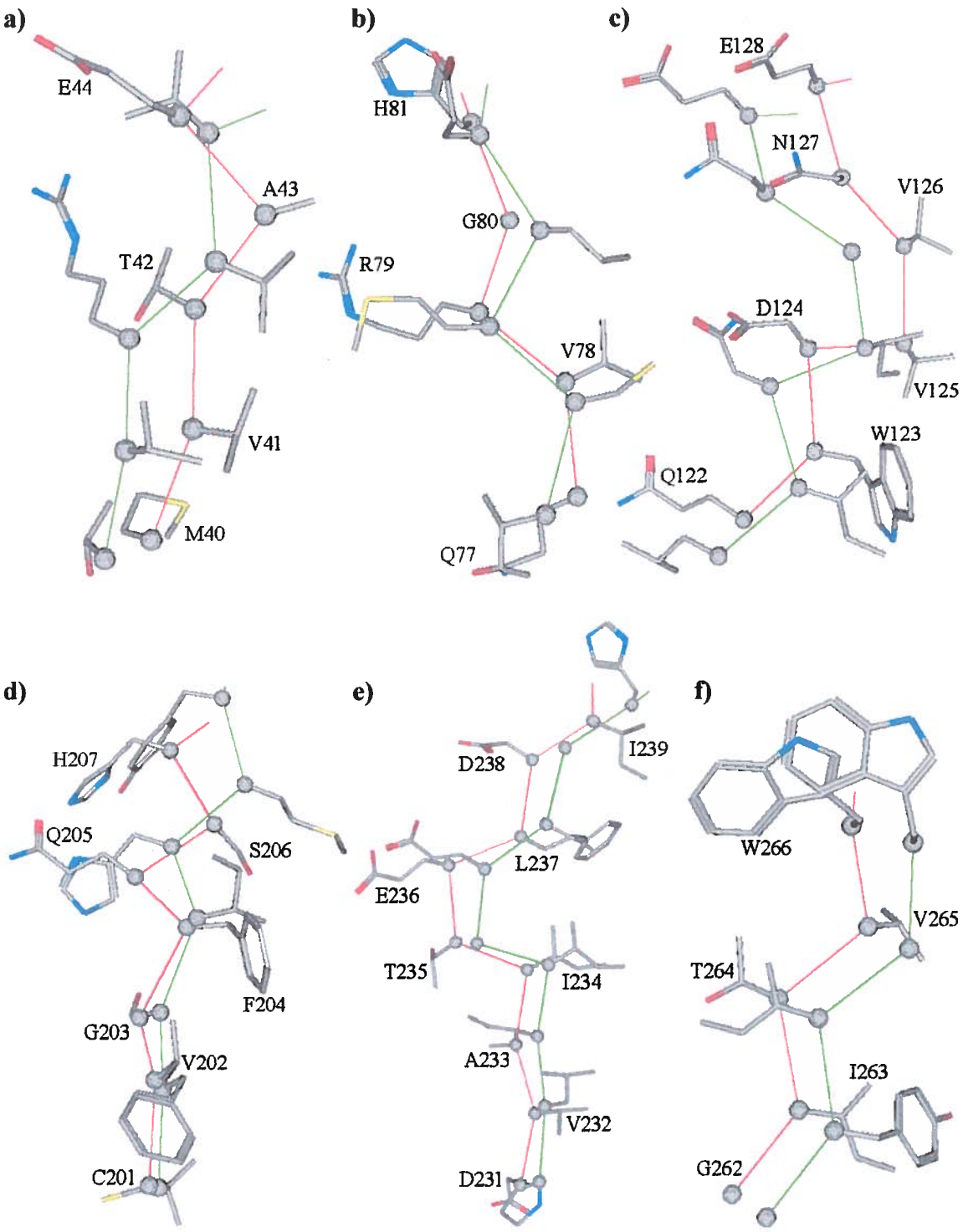

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
G80
R79
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
W123
Q122
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
D238
I239
L237
E236
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Figure 16 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de l'endo-β-1,3-glucanase GII de *Hordeum vulgare*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de l'endo-β-1,3-glucanase GII respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	H. vulgare	29 GMRIY 33
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	H. vulgare	49 GLILD 53
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	H. vulgare	88 YIAAGNE 94
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	H. vulgare	162 PLLANVY 168
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	H. vulgare	226 KVVVSESGW 234
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	H. vulgare	270 ETYIF 274

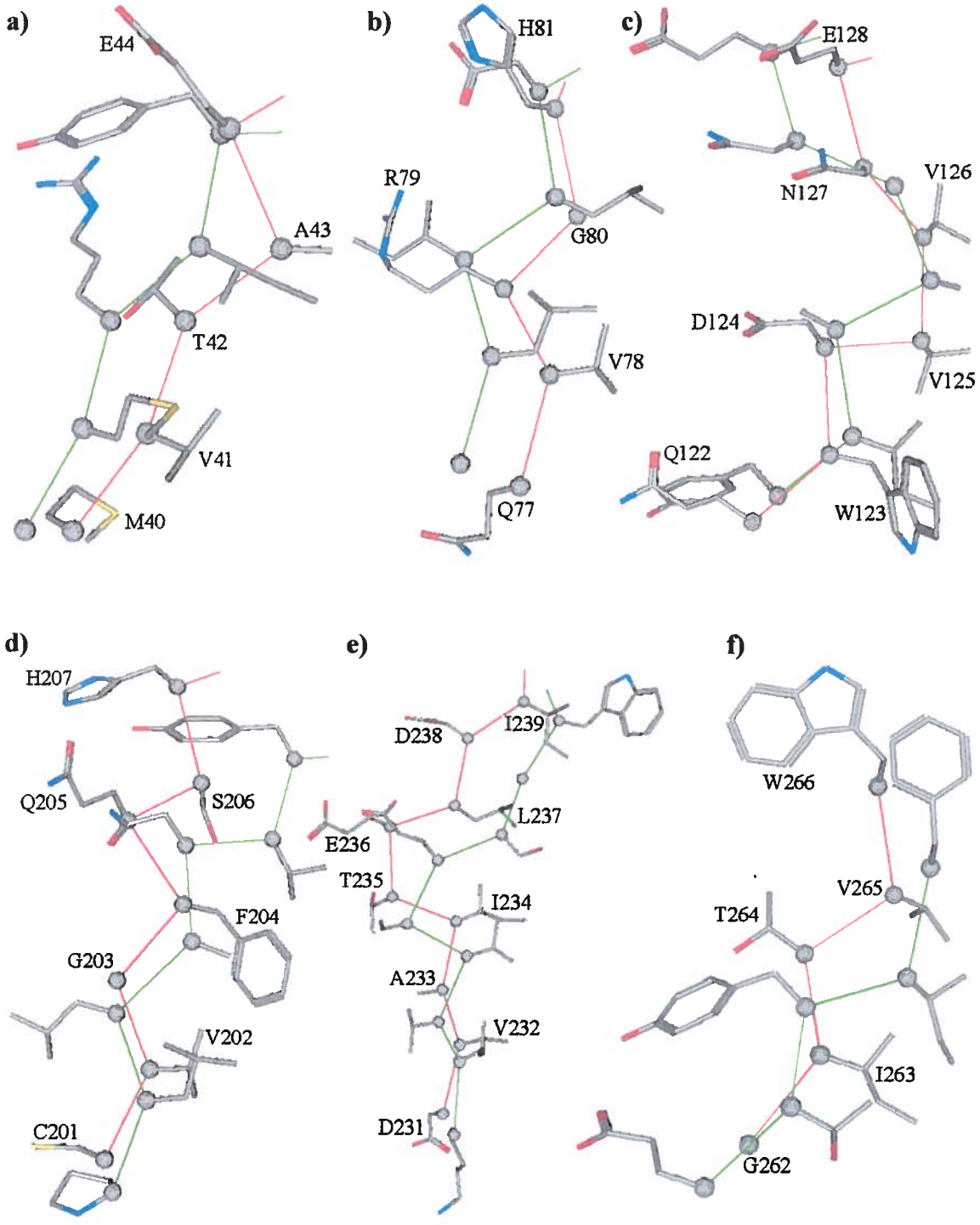

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
V126
N127
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
D238
I239
L237
E236
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Figure 17 : Superposition des brins-β_2, β_3, β_4, β_6, β_7 et β_8 de la xylanase 10A de *S. lividans* et de la lichenase de *Hordeum vulgare*. Les lignes rouge et verte représentent le tracé entre les atomes de carbone α de la xylanase 10A et de la lichenase respectivement. Le carbone est en gris, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

a) brins-β_2 :	*S. lividans*	40 MVTAE 44
	H. vulgare	29 SMRLY 33
b) brins-β_3 :	*S. lividans*	77 QVRGH 81
	H. vulgare	49 NVVVG 53
c) brins-β_4 :	*S. lividans*	122 QWDVVNE 128
	H. vulgare	87 YVCVGNE 93
d) brins-β_6 :	*S. lividans*	201 CVGFQSH 207
	H. vulgare	164 PLMANIY 170
e) brins-β_7 :	*S. lividans*	231 DVAITELDI 239
	H. vulgare	227 KLVVSESGW 235
f) brins-β_8 :	*S. lividans*	262 GITVW 266
	H. vulgare	271 ETYIF 275

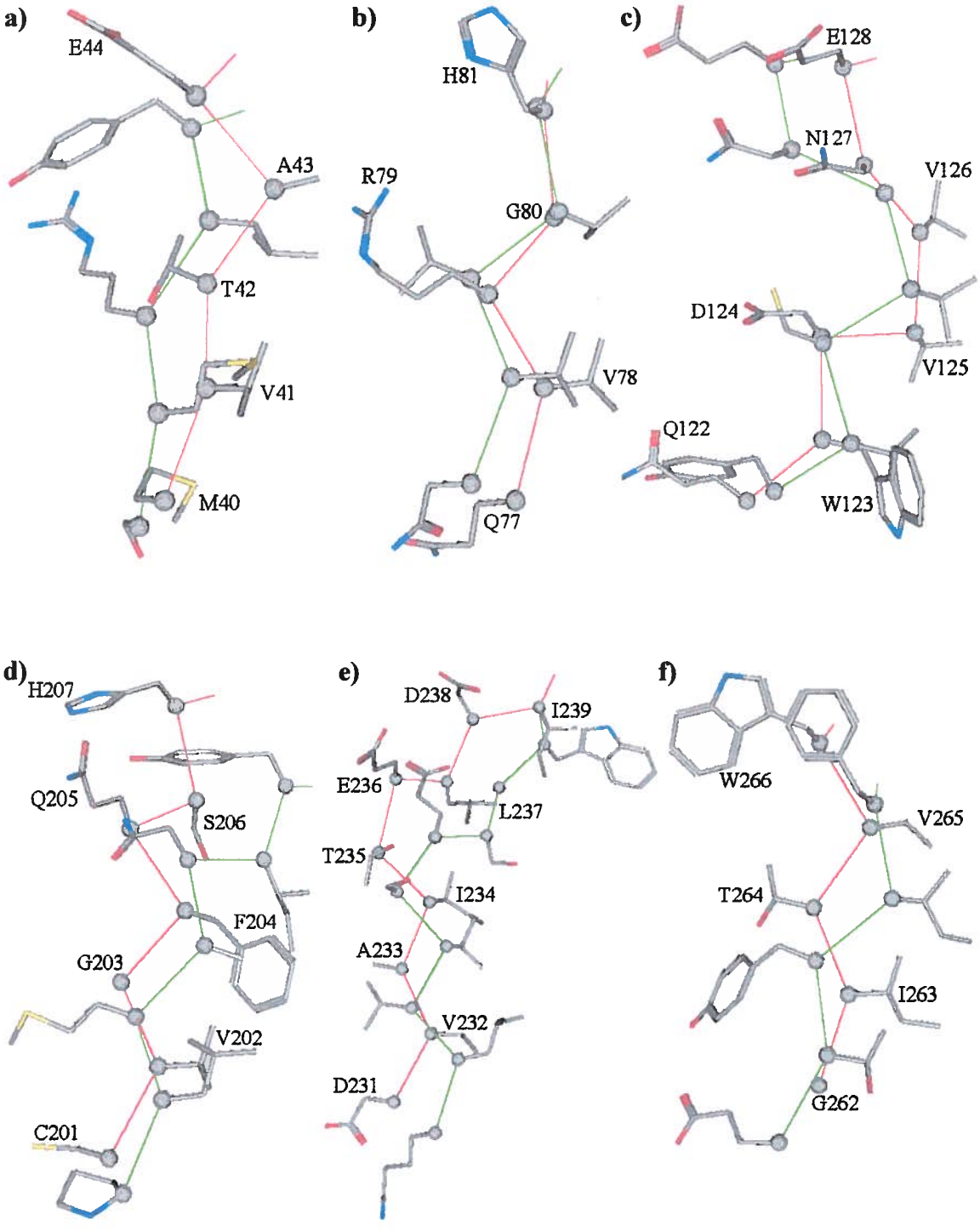

a)
E44
A43
T42
V41
M40
b)
H81
R79
G80
V78
Q77
c)
E128
N127
V126
D124
V125
Q122
W123
d)
H207
Q205
S206
F204
G203
V202
C201
e)
D238
I239
E236
L237
T235
I234
A233
V232
D231
f)
W266
V265
T264
I263
G262

Tableau 8 : Acides aminés potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat chez la xylanase 10A de *S. lividans* et résidus équivalents chez les autres glycosides hydrolases de mode *endo* du clan GH-A

Brin	*Sl*Xyl10A Famille 10	Cellulases Famille 5	Mannanase Famille 5	Endo-β-1,3-Glucanase Famille 17	Lichenase Famille 17
β_2	T42	R	R	R	R
	E44	A-**P**	V	Y	Y
β_3	R79	**I**-V	M	I	V
	G80	I-**L**	L	L	V
	H81	**D**-G-N	E	D	G
β_4	Q122	A-G-**I**	L	Y	Y
	W123	F-Y	I	I	V
β_6	V202	V-**Y**	F	L	L
	Q205	H	H	N	N
	H207	Y	Y	Y	Y
β_7	A233	I-**F**-W-Y	I	V	V
	T235	**G**-S-T	G	S	S
	L237	C-**F**-**W**	F	S	S
	D238	G	G	G	G
β_8	T264	**A**-I-T	I	Y	Y
	W266	W	W	F	F

*Sl*Xyl10A : xylanase 10A de *S. lividans*

Note : Pour les cellulases de la famille 5, les résidus en caractère gras sont ceux qui sont retrouvés le plus fréquemment

2.0 CHOIX DES MUTATIONS ET MUTAGENÈSE DIRIGÉE

2.1 Choix des mutations

Parmi les 50 mutations qui pourraient potentiellement avoirs un effet sur la spécificité de substrat (Tableau 8), six mutations ont été choisies. La position T42 se situe tout près du sous-site -2 et l'étude de modélisation moléculaire ici décrite supporte l'hypothèse de Dominguez *et al.*, (1995) à l'effet que le remplacement de ce résidu par une arginine pourrait modifier la spécificité de substrat de l'enzyme. La position V202 est située au début du brin-β_6, relativement loin du site actif. De plus, comme les mutations pour une phénylalanine ou une tyrosine mèneraient potentiellement à deux spécificités distinctes (Tableau 8), il y avait possibilité d'étudier l'effet de ces deux résidus aromatiques en position 202 sur la spécificité de substrat. Par ailleurs, la comparaison des brins-β a révélée qu'une glycine est retrouvée chez plusieurs enzymes de spécificité distincte aux positions équivalentes aux résidus T235 et D238. Ainsi, les mutations T235G et D238G étaient de bons choix pour étudier l'implication de résidus du site actif dans la spécificité de substrat. Finalement, la mutation R275A a été choisie en raison de résultats obtenus par Andrews *et al.*, (2000) qui ont observé que la mutation de la leucine en position équivalente chez la xylanase 10A de *Pseudomonas fluorescens cellulosa* pour une alanine faisait augmenter la spécificité de l'enzyme pour le *p*-nitrophénylcellobiose.

2.2 Mutagenèse dirigée

Les mutations T42R, V202F, V202Y, T235G, D238G et R275A ont été introduites par PCR sur le gène de la xylanase 10A de *S. lividans* contenu sur le plasmide pIAF932. Lors d'une première étape de PCR, il y a eu introduction de la mutation et amplification des sections du gène codant pour les portions N- et C-terminales de la protéine, et ce, de manière distincte. La longueur des amplicons ainsi générés varie selon la position de la mutation sur le gène (Figure 18). Les deux fragments correspondant à la même mutation ont par la suite été rassemblés lors d'une deuxième réaction de PCR pour former le gène muté complet. La longueur théorique de tous les gènes mutés ainsi

générés est de 1048 paires de bases, longueur du gène de la xylanase 10A lorsqu'amplifié à l'aide des mêmes amorces externes utilisées lors de la deuxième étape de PCR. La figure 18 montre les fragments générés lors des deux étapes de mutagenèse dirigée.

3.0 SOUS CLONAGE DES GÈNES MUTÉS DANS *S. LIVIDANS*

Les différents fragments générés lors de la mutagenèse dirigée par PCR ainsi que le vecteur c209 ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction *Sac*I et *Sph*I pour être ensuite chargés et séparés sur un gel d'agarose (Figure 19). Les bandes correspondant aux gènes mutés et au vecteur vide ont été découpées et l'ADN qu'elles contenaient a été purifié. Les gènes mutés ont ensuite été ligués au vecteur et la souche hôte *S. lividans* 10-164 a été transformée par les différentes constructions résultantes et étalée sur un milieu de régénérescence des parois cellulaires.

4.0 SÉLECTION DES TRANSFORMANTS

Tout d'abord, une première sélection de la résistance au thiostrepton a été effectuée 16 heures après l'étalement des transformants sur le milieu de régénérescence. Puis, huit colonies choisies au hasard ont été repiquées sur un milieu de sporulation contenant du thiostrepton afin de confirmer la résistance à cet antibiotique. Par la suite, les quatre clones ayant le plus sporulé pour chaque souche ont été incubés 48 heures en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose comme source de carbone. Après filtration des milieux de culture, les protéines produites par chacun des clones ont été analysées par gel SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western (Figure 20). Pour chaque souche, le clone montrant la plus grosse bande aux environs de 32,5 kDa, masse moléculaire apparente de la xylanase 10A, a été lyophilisé pour des fins de conservation et utilisé lors de la production des enzymes. Pour la souche transformée par le gène contenant la mutation V202Y, tous les clones mis en culture n'ont produit que des traces de protéines aux environs de 32,5 kDa et cette souche a par conséquent été abandonnée. Les cinq souches utilisées sont nommées selon la mutation désirée soit IAF932-T42R, IAF932-V202F, IAF932-T235G, IAF932-D238G et IAF932-R275A.

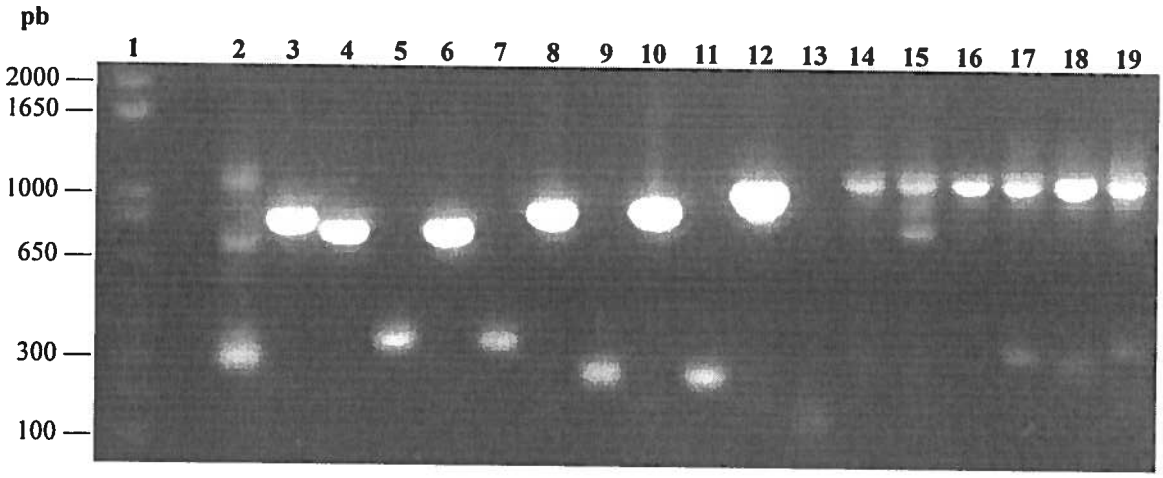


Figure 18 : Séparation des fragments générés par PCR sur un gel d'agarose 0,7 % (p/v).

Légende :

Puits	Description	Longueur attendue (pb)
1	Marqueur de paires de bases « 1 Kb Plus »	-
2	Mutation T42R portion N-terminale	268
3	Mutation T42R portion C-terminale	809
4	Mutation V202F portion N-terminale	751
5	Mutation V202F portion C-terminale	326
6	Mutation V202Y portion N-terminale	751
7	Mutation V202Y portion C-terminale	326
8	Mutation T235G portion N-terminale	844
9	Mutation T235G portion C-terminale	229
10	Mutation D238G portion N-terminale	861
11	Mutation D238G portion C-terminale	221
12	Mutation R275A portion N-terminale	970
13	Mutation R275A portion C-terminale	112
14	Mutation T42R gène complet	1048
15	Mutation V202F gène complet	1048
16	Mutation V202Y gène complet	1048
17	Mutation T235G gène complet	1048
18	Mutation D238G gène complet	1048
19	Mutation R275A gène complet	1048

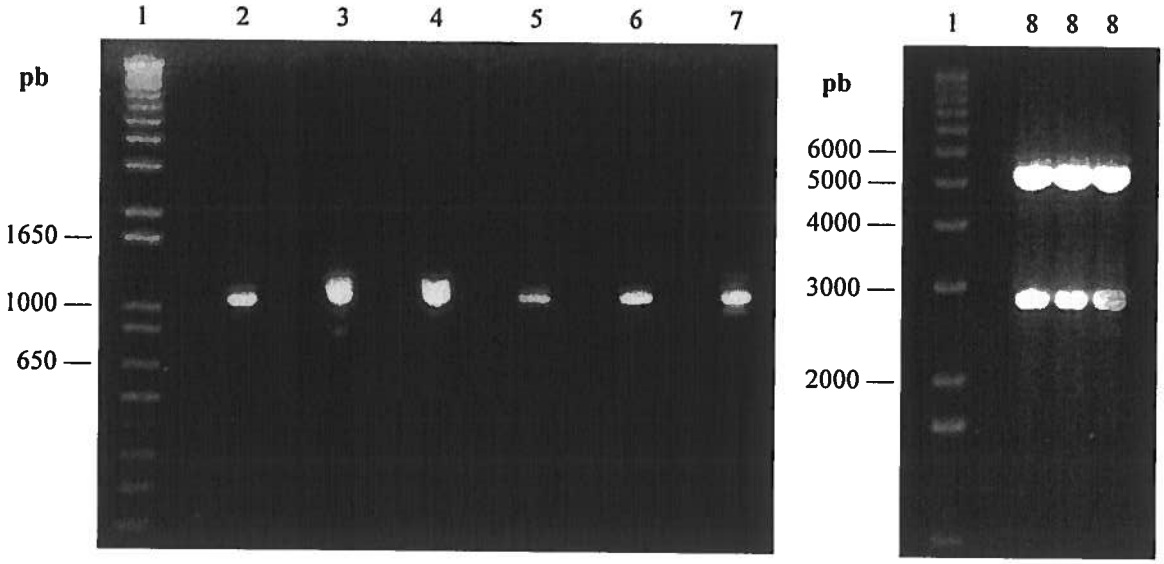


Figure 19 : Gels d'agarose 0,7 % (p/v) des fragments issus de la digestion par les enzymes de restriction *Sac*I et *Sph*I en vue du sous-clonage dans le vecteur c209.

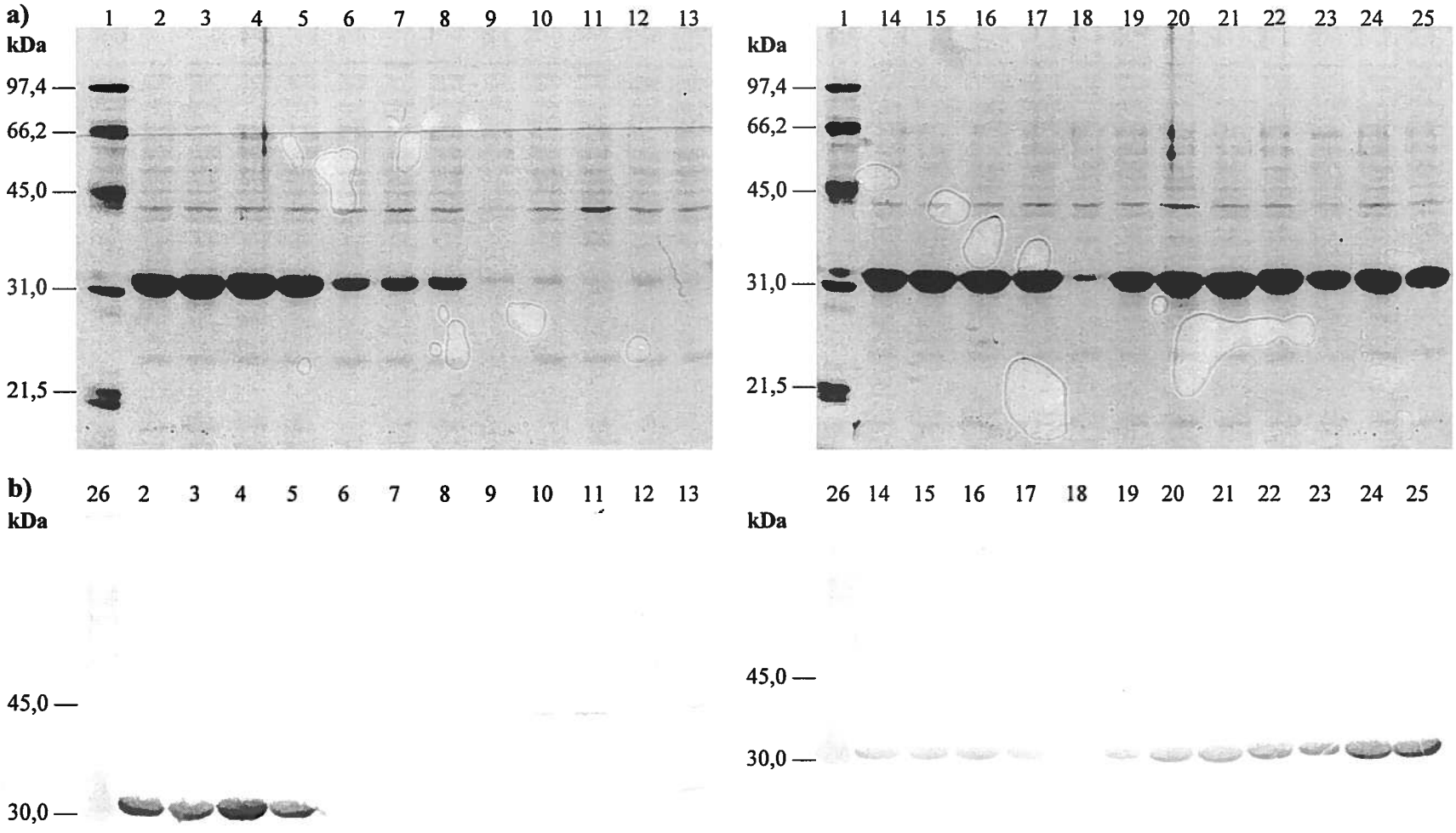
Légende :

Puits	Description
1	Marqueur de paires de bases « 1 Kb Plus »
2	Gène muté T42R
3	Gène muté V202F
4	Gène muté V202Y
5	Gène muté T235G
6	Gène muté D238G
7	Gène muté R275A
8	Vecteur c209 (bande du haut)

Figure 20 : a) Gels SDS-PAGE et b) immunobuvardages de type Western des milieux de culture filtrés de quatre clones choisis au hasard et incubés 48 heures en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose.

Légende :

Puits	Description
1	Marqueur de masses moléculaires « Low Molecular Weight »
2 à 5	Souche IAF932-T42R clones 1, 5, 7 et 8
6 à 9	Souche IAF932-V202F clones 2, 5, 6 et 8
10 à 13	Souche IAF932-V202Y clones 1, 2, 6 et 8
14 à 17	Souche IAF932-T235G clones 1, 2, 4 et 5
18 à 21	Souche IAF932-D238G clones 1, 2, 3 et 5
22 à 25	Souche IAF932-R275A clones 1, 2, 4 et 5
26	Marqueur de masses moléculaires pré-coloré « Rainbow »


a)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
kDa
97,4
66,2
45,0
31,0
21,5
1 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
kDa
97,4
66,2
45,0
31,0
21,5
b)
26 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
kDa
45,0
30,0
26 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
kDa
45,0
30,0

5.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES MUTÉS

Le plasmide des cinq souches sélectionnées a été isolé, l'insert qu'il contient a été amplifié et les deux brins d'ADN ont été séquencés. Les souches IAF932-V202F, IAF932-T235G et IAF932-D238G n'ont montré aucune mutation autre que celles désirées. Dans le cas de la souche IAF932-T42R, la mutation escomptée T42R n'a pas été observée. Pour la souche IAF932-R275A, la mutation R275A a bel et bien été observée mais le gène montrait aussi la mutation S276W. Puisque des erreurs de séquençage sont possibles, la purification des protéines provenant des souches IAF932-T42R et IAF932-R275A a aussi été entreprise afin d'effectuer une caractérisation biochimique de ces protéines et ainsi supporter ou contredire les observations relatives au séquençage des gènes.

6.0 PRODUCTION DES ENZYMES

Afin de produire en grande quantité les protéines d'intérêt, la souche IAF932, produisant la xylanase 10A de type sauvage, ainsi que les cinq souches mutantes ont été incubées 48 heures en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose comme source de carbone. Les milieux de culture ont par la suite été filtrés pour retirer le mycélium et un dosage des protéines totales a montré que la concentration en protéines varie de 0,27 à 0,63 mg/ml selon la souche (Tableau 9).

7.0 PURIFICATION DES ENZYMES

La xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A ont été purifiés par tamis moléculaire à l'aide de deux systèmes en parallèle. Ceci a permis d'augmenter la quantité d'enzyme purifiée sans doubler la duré de la procédure comme cela aurait été le cas s'il n'y avait eu qu'un seul système disponible. Les milieux de culture obtenus ont été préalablement concentrés afin d'injecter entre 11,5 et 26,5 mg de protéines totales par tamis. Selon les chromatogrammes enregistrés, les fractions contenant des protéines ont été chargées et séparées sur un gel SDS-PAGE et les fractions des deux systèmes qui

montraient uniquement une bande à 32,5 kDa de masse moléculaire ont été mises en commun. La quantité de protéines totales de ces fractions mises en commun varie de 10,2 à 19,7 mg/ml pour un rendement de purification qui varie de 28 à 54 % (Tableau 10). Une fois les fractions mises en commun, il y a eu concentration des enzymes purifiées jusqu'à environ 1 mg/ml pour des fins d'utilisation et de conservation à long terme. La figure 21 expose l'état de la pureté des échantillons recueillis après la filtration des milieux de culture comparativement aux échantillons obtenus suite à la purification des enzymes. Ce n'est qu'avec cet immunobuvardage de type Western qu'il y a confirmation que les protéines purifiées sont celle désirées puisqu'elles ont très bien été détectées par des anticorps spécifiques à la xylanase 10A à l'exeption de la protéine provenant de la souche IAF932-V202F. Dans ce dernier cas, la détection est faible mais tout de même observée ce qui suggère qu'une protéine apparentée à la xylanase 10A est présente. Il demeure obscur pourquoi la bande qui est aussi intense que celle des autres souches lors de la coloration au bleu de Coomassie soit plus faiblement détectée par les anticorps spécifique à la xylanase 10A. Une hypothèse serait que cette bande contienne plus d'une espèce protéique, mais cela serait étonnant compte tenu du fait que le système d'expression utilisé était le même pour toutes les souches et que les protéines exprimées autres que celles désirées sont sensiblement les mêmes d'une souche à l'autre (Figure 20).

Tableau 9 : Dosage des protéines totales produites par les différentes souches et présentes dans le milieu de culture filtré après 48 heures d'incubation en milieu minimal M14 avec 1 % (p/v) de xylose

Souche	Volume recueilli (ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)
IAF932	134	0,27	36,8
IAF932-T42R	190	0,64	121,6
IAF932-V202F	770	0,49	377,3
IAF932-T235G	195	0,60	117,0
IAF932-D238G	195	0,63	122,9
IAF932-R275A	198	0,60	118,8

Tableau 10 : Rendement de purification de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A suite aux tamis moléculaires

Souche	Échantillon	Volume (ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Rendement (%)
IAF932	Injecté	7	3,28	23,0	100
	Après tamis	46,5	0,22	10,2	44
IAF932-T42R	Injecté	5	7.65	38,3	100
	Après tamis	118	0,15	17,7	46
IAF932-V202F	Injecté	6	8,84	53,0	100
	Après tamis	116	0,13	15,1	28
IAF932-T235G	Injecté	5	6,14	30,7	100
	Après tamis	113	0,13	14,7	48
IAF932-D238G	Injecté	5	7,24	36,2	100
	Après tamis	123	0,16	19,7	54
IAF932-R275A	Injecté	5	7,63	38,2	100
	Après tamis	127	0,15	19,1	50

Note : Le volume injecté est le total des volumes injectés dans les deux systèmes. De même, le volume recueilli après tamis est le volume total des fractions contenant l'enzyme pure provenant de chaque système et qui ont été mises en commun.

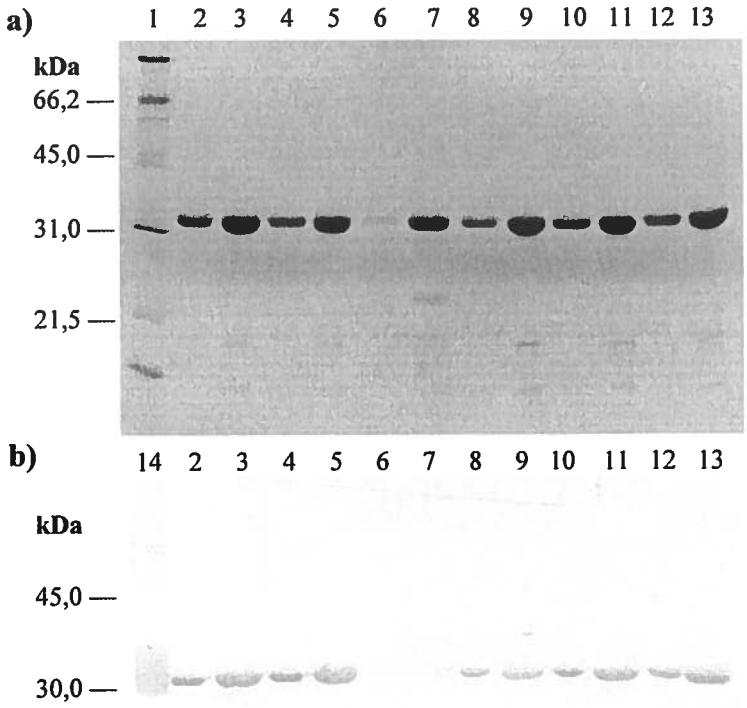


Figure 21 : a) Gel SDS-PAGE et b) immunobuvardage de type Western des milieux de culture filtrés et des enzymes purifiées provenant de la souche sauvage IAF932 et des souches mutantes. La quantité de protéines totales chargées dans chaque puits est de 2,6 µg pour le gel coloré au bleu de Coomassie et de 1 µg pour le gel immunobuvardé.

Légende :

Puits	Description
1	Marqueur de masses moléculaires « Low Molecular Weight »
2	Souche IAF932 milieu de culture filtré
3	Souche IAF932 protéine purifiée
4	Souche IAF932-T42R milieu de culture filtré
5	Souche IAF932-T42R protéine purifiée
6	Souche IAF932-V202F milieu de culture filtré
7	Souche IAF932-V202F protéine purifiée
8	Souche IAF932-T235G milieu de culture filtré
9	Souche IAF932-T235G protéine purifiée
10	Souche IAF932-D238G milieu de culture filtré
11	Souche IAF932-D238G protéine purifiée
12	Souche IAF932-R275A milieu de culture filtré
13	Souche IAF932-R275A protéine purifiée
14	Marqueur de masses moléculaires pré-coloré « Rainbow »

8.0 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

8.1 Focalisation isoélectrique

Le point isoélectrique des protéines est un paramètre qui reflète leur composition en acides aminés. Un changement dans le point isoélectrique qui survient suite à une mutation peut être ainsi observé. Cependant, la technique ne permet pas de dire quel changement est survenu mais plutôt s'il y a eu modification ou non. Pour évaluer leur point isoélectrique, les enzymes purifiées ont été chargées au centre d'un gel contenant des ampholytes de pH 3 à 9 et soumises à un courant électrique jusqu'à ce qu'elles s'immobilisent à un pH égal à leur point isoélectrique apparent. Le point isoélectrique observé est de 7,6 pour l'enzyme de type sauvage ainsi que pour les enzymes des souches mutantes IAF932-T42R, V202F et T235G alors qu'il est de 8,2 et 6,6 pour les souches IAF932-D238G et R275A respectivement (Figure 22). Dans tous les cas, le point isoélectrique apparent est supérieur au point isoélectrique théorique et cette différence varie de 0,6 à 1,6 unités de pH.

Le point isoélectrique apparent de la protéine provenant de la souche IAF932-T42R est identique à celui de la xylanase 10A de type sauvege alors qu'il aurait dû être plus élevé. Ceci permet de conclure que la mutation désirée n'a pas eu lieu mais ne permet pas de dire si la protéine est identique à l'enzyme de type sauvage. Dans le même ordre d'idées, la protéine provenant de la souche IAF932-R275A a subit un changement de point isoélectrique cohérent avec la mutation R275A mais si la deuxième mutation S276W était présente, le point isoélectrique serait identique.

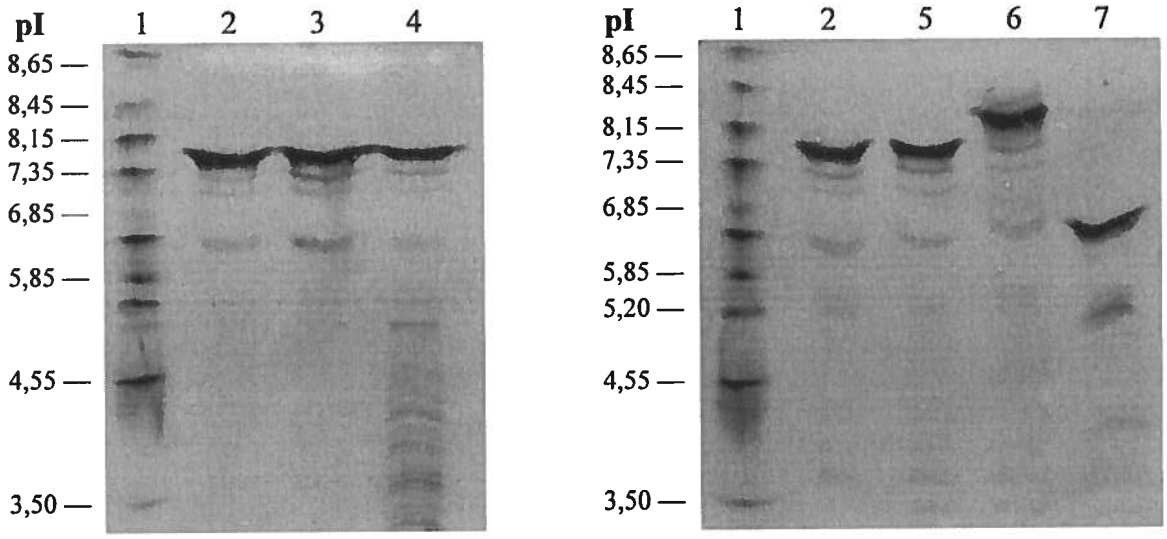


Figure 22 : Focalisation isoélectrique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A. Le chargement des échantillons a été fait au centre du gel avec 1 µg de protéines totales par puits.

Légende :

Puits	Description	pI théorique	pI observé
1	Marqueur de points isoélectriques	-	-
2	Souche IAF932	6,2	7,6
3	Souche IAF932-T42R	6,6	7,6
4	Souche IAF932-V202F	6,2	7,6
5	Souche IAF932-T235G	6,2	7,6
6	Souche IAF932-D238G	6,6	8,2
7	Souche IAF932-R275A	6,0	6,6

8.2 Spectrométrie de masse

Afin de vérifier si les cinq protéines purifiées ont les mutations désirées, leur profil de masse moléculaire a été déterminé. Pour ce, les protéines ont été dialysées contre de l'eau Milli-Q, pour retirer le plus de sels du milieu, puis elles ont été injectées dans un spectromètre de masse en mode d'ionisation *electrospray* positif. La figure 23 montre les profils de masse moléculaire obtenus suite à la déconvolution des spectres de masse. Les pics correspondant à la masse moléculaire attendue sont observés mais aussi plusieurs autres pics. Tout d'abord, un pic avec une masse d'environ 96 Da de plus que celui attendu est observé. Ce phénomène est attribuable à une molécule de phosphate qui est restée liée à une certaine population des protéines analysées (Chowdhury *et al.*, 1990). Par ailleurs, d'autres pics avec des masses incrémentes d'environ 131 Da à partir des deux premiers pics sont observés. Cette augmentation constante de masse est due à une glycosylation non enzymatique des protéines (Ulrich et Cerami, 2001). Il s'agit d'une réaction chimique entre l'amine libre d'un résidu lysine et un sucre réducteur. Dans le cas présent, le sucre en question est le xylose et la réaction a probablement eu lieu durant la production des protéines. Par ailleurs, selon les spectres de masse obtenus, la pureté des différentes protéines est estimée à 95 % ou plus. Ceci vient contredire l'hypothèse à l'effet que la mauvaise détection du mutant V202F lors des immunobuvardages de type Western serait due à une hétérogénéité de la bande à 32,5 kDa (Figures 20 et 21).

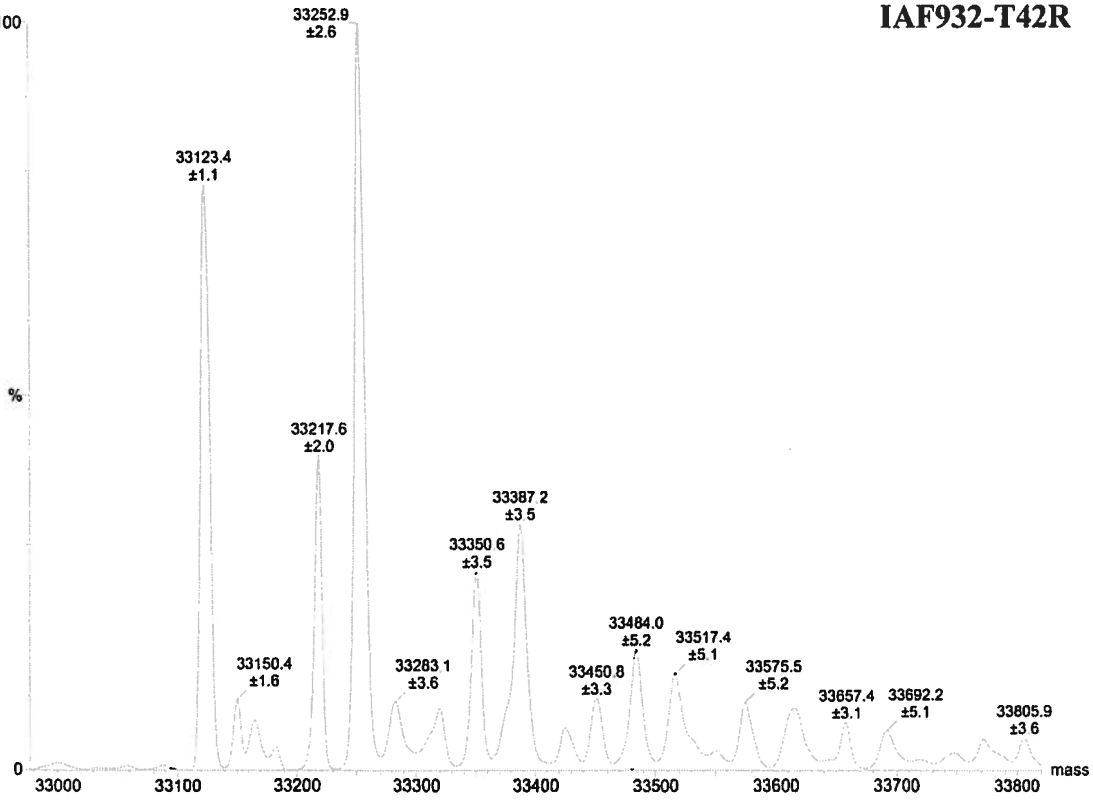
Pour la souche IAF932-T42R, la masse obtenue est celle de la xylanase 10A de type sauvage ce qui confirme hors de tout doute que l'enzyme provenant de cette souche n'est pas une protéine mutante. Dans le cas des mutations V202F et T235G, le pic se rapprochant le plus de leur masse attandue a 2 Da de plus ce qui entre dans la limite de détection de l'appareil pour ce type d'expérience (F. Lépine, communication personnelle). Pour les mutations D238G et R275A/S276W, les pics attendus n'ont pas été observés mais le pic le plus près avait dans les deux cas une masse moléculaire de 7 Da de moins que celui attendu. Malgré cette différence de masse, ces résultats en parallèle de ceux obtenus lors du séquençage des gènes et de la focalisation isoélectrique mènent à confirmer ces mutations.

Figure 23 : Masse moléculaire des protéines purifiées à partir des culture des souches a) IAF932-T42R, b) IAF932-V202F, c) IAF932-T235G, d) IAF932-D238G et e) IAF932-R275A analysées par spectrométrie de masse.

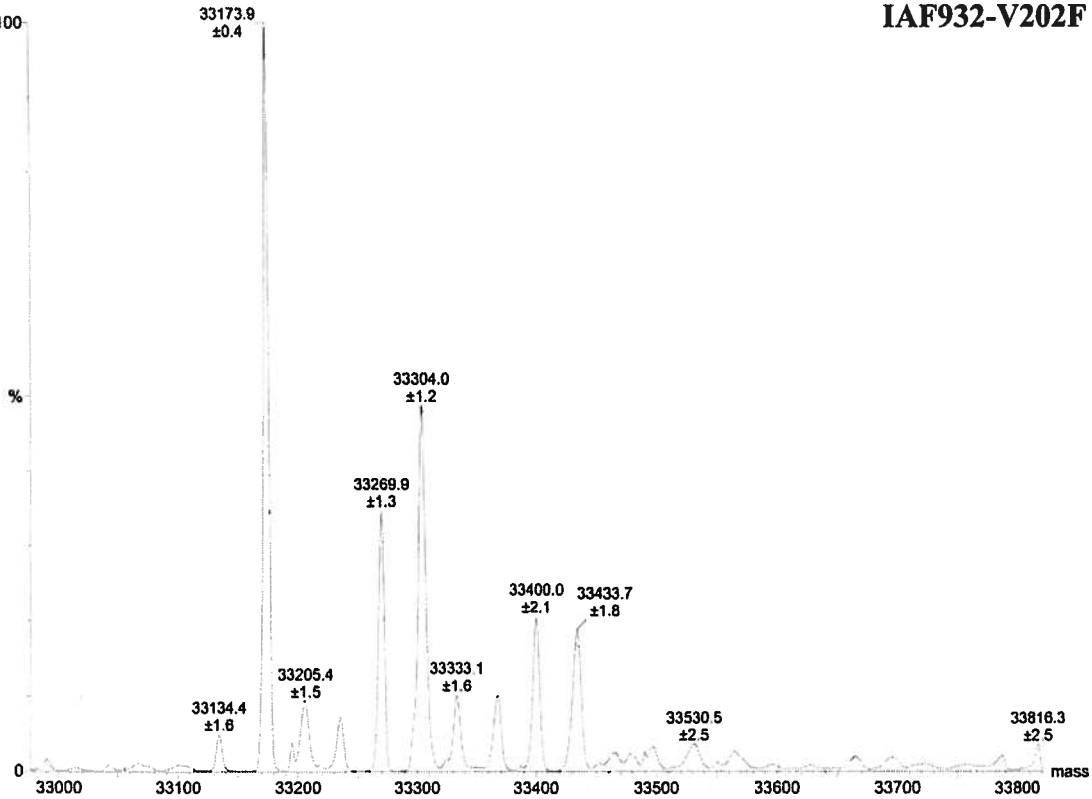
Protéine	**Masse moléculaire attendue (Da)**
Xylanase 10A	33 123,6
Xylanase 10A-T42R	33 178,6
Xylanase 10A-V202F	33 171,6
Xylanase 10A-T235G	33 079,5
Xylanase 10A-D238G	33 065,5
Xylanase 10A-R275A	33 038,4
Xylanase 10A-R275A/S276W	33 137,6

Note : les masses moléculaires attendues tiennent compte des deux ponts cystéine contenus chez la xylanase 10A de type sauvage.

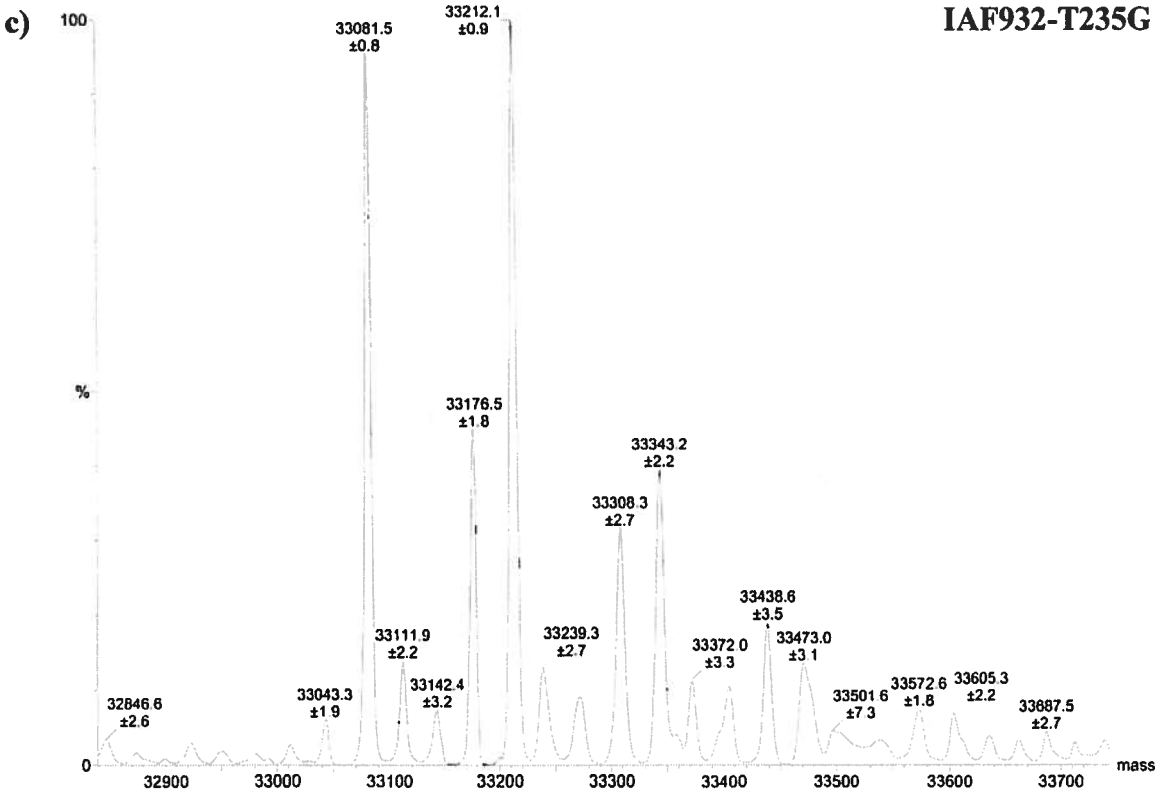
a) IAF932-T42R



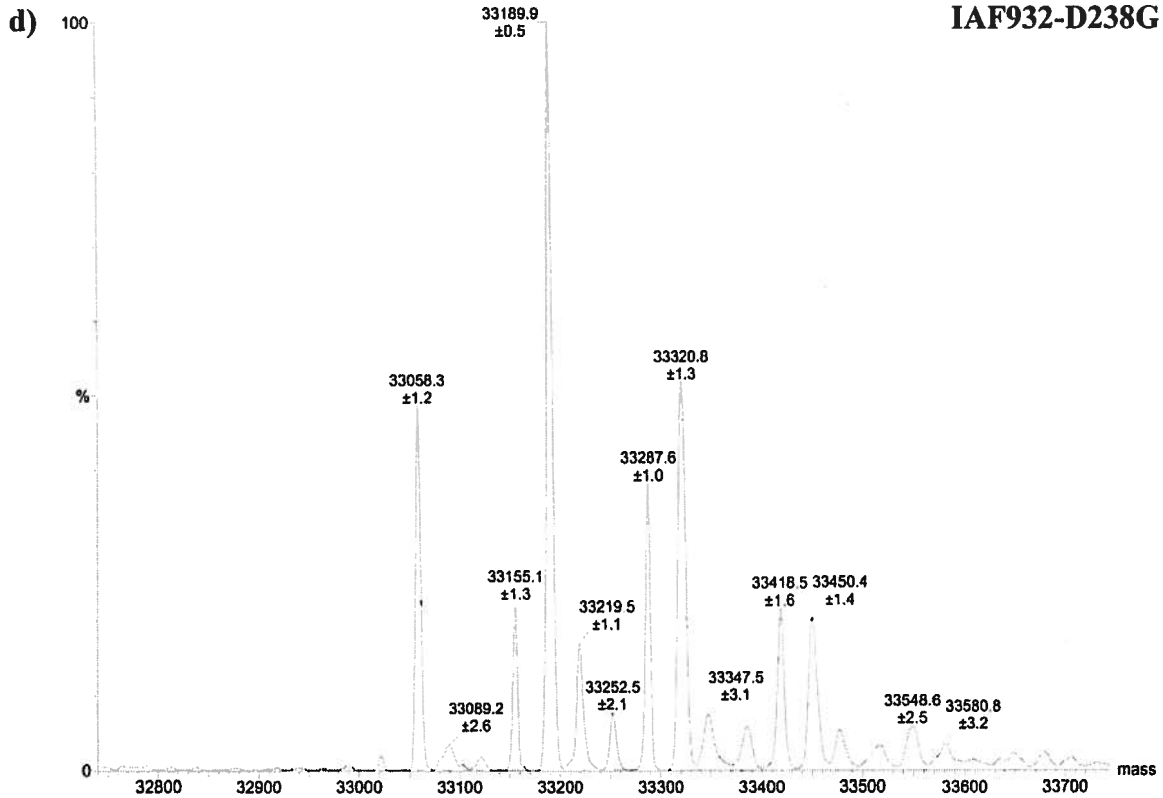
b) IAF932-V202F



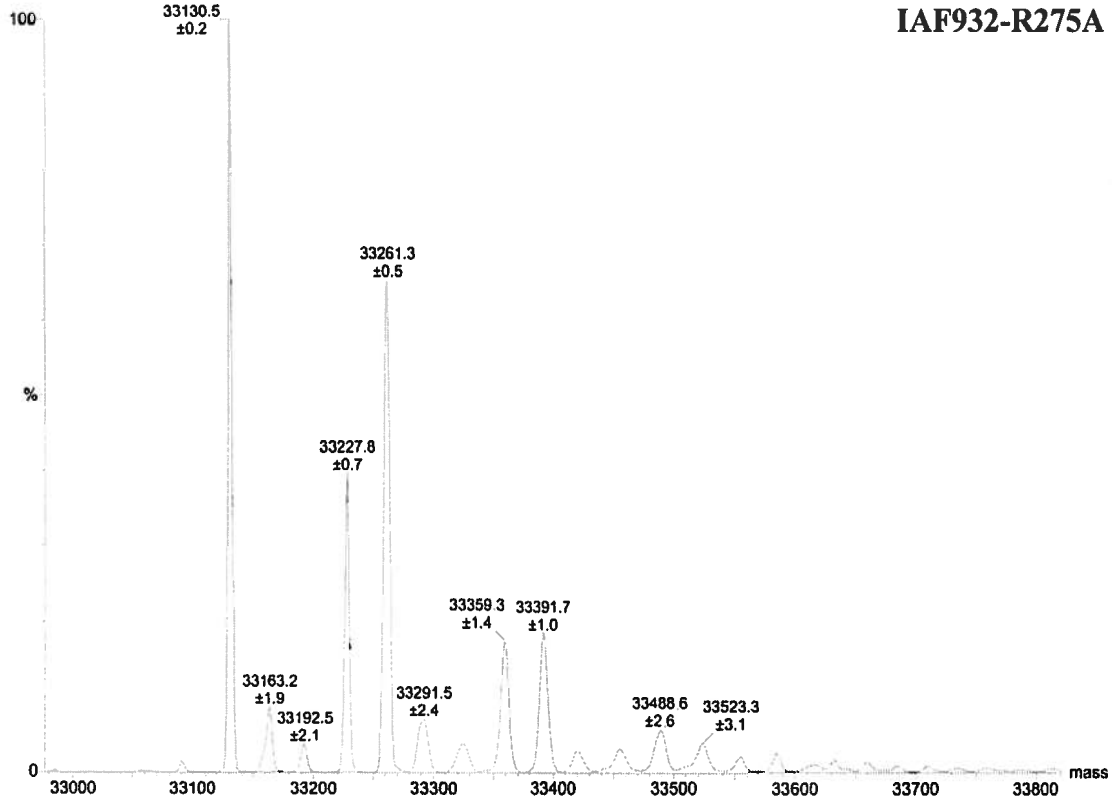
c)


IAF932-T235G
100
%
0
32846.6 ±2.6
33043.3 ±1.9
33081.5 ±0.8
33111.9 ±2.2
33142.4 ±3.2
33176.5 ±1.8
33212.1 ±0.9
33239.3 ±2.7
33308.3 ±2.7
33343.2 ±2.2
33372.0 ±3.3
33438.6 ±3.5
33473.0 ±3.1
33501.6 ±7.3
33572.6 ±1.8
33605.3 ±2.2
33687.5 ±2.7
32900
33000
33100
33200
33300
33400
33500
33600
33700
mass

d)


IAF932-D238G
100
%
0
33058.3 ±1.2
33089.2 ±2.6
33155.1 ±1.3
33189.9 ±0.5
33219.5 ±1.1
33252.5 ±2.1
33287.6 ±1.0
33320.8 ±1.3
33347.5 ±3.1
33418.5 ±1.6
33450.4 ±1.4
33548.6 ±2.5
33580.8 ±3.2
32800
32900
33000
33100
33200
33300
33400
33500
33600
33700
mass

e)


IAF932-R275A
100
%
0
33130.5
±0.2
33261.3
±0.5
33227.8
±0.7
33359.3
±1.4
33391.7
±1.0
33163.2
±1.9
33192.5
±2.1
33291.5
±2.4
33488.6
±2.6
33523.3
±3.1
33000
33100
33200
33300
33400
33500
33600
33700
33800
mass

8.3 Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés

Le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine est influencé par plusieurs facteurs dont sa composition en acides aminés aromatiques et la conformation de ses liens peptidiques et donc par la nature de ses structures secondaires (Vuilleumier *et al.*, 1993). Par conséquent, le spectre de dichroïsme circulaire des enzymes purifiées a été obtenu afin de s'assurer que les mutations n'ont pas infligé des changements majeurs dans les structures secondaires de ces protéines. Entre 200 et 220 nm, longueurs d'onde où les hélices-α et les brins-β montrent une différence d'absorption de la lumière polarisée positivement et négativement, la forme de la courbe de la xylanase 10A et celle des mutants T235G, D238G et R275A/S276W est la même (Figure 24) ce qui suggère qu'aucun changement majeur n'a été introduit avec ces mutations dans les structures secondaires de l'enzyme. Pour le mutant V202F, la forme du spectre est quelque peu distincte mais la différence majeure est que le signal est légèrement plus faible que celui de l'enzyme sauvage ce qui peut être attribuable à l'introduction d'un résidu aromatique dans la protéine (Strickland, 1974).

8.4 Dénaturation thermique

Pour déterminer à quelle température devrait s'effectuer les tests enzymatiques, la dénaturation thermique des enzymes purifiées a été évaluée par dichroïsme circulaire. Ainsi, des courbes de dénaturation (Figure 25) ont été obtenues en augmentant la température de façon linéaire tout en faisant l'acquisition des données de dichroïsme circulaire à 215 nm, longueur d'onde pour laquelle la différence entre le signal de la forme native et dénaturée de la xylanase 10A est la plus élevée. La température moyenne de dénaturation (T_m) est évaluée à 66,8°C pour l'enzyme sauvage ce qui est cohérent avec les valeurs retrouvées dans la littérature (Ebanks *et al.*, 2000; Jodoin, 1999). Par rapport à la xylanase 10A, une diminution du T_m a été observée chez tous les mutants avec 8,5°C, 12,4°C, 7,2°C et 2,7°C de moins respectivement pour les mutants V202F, T235G, D238G et R275A/S276W.

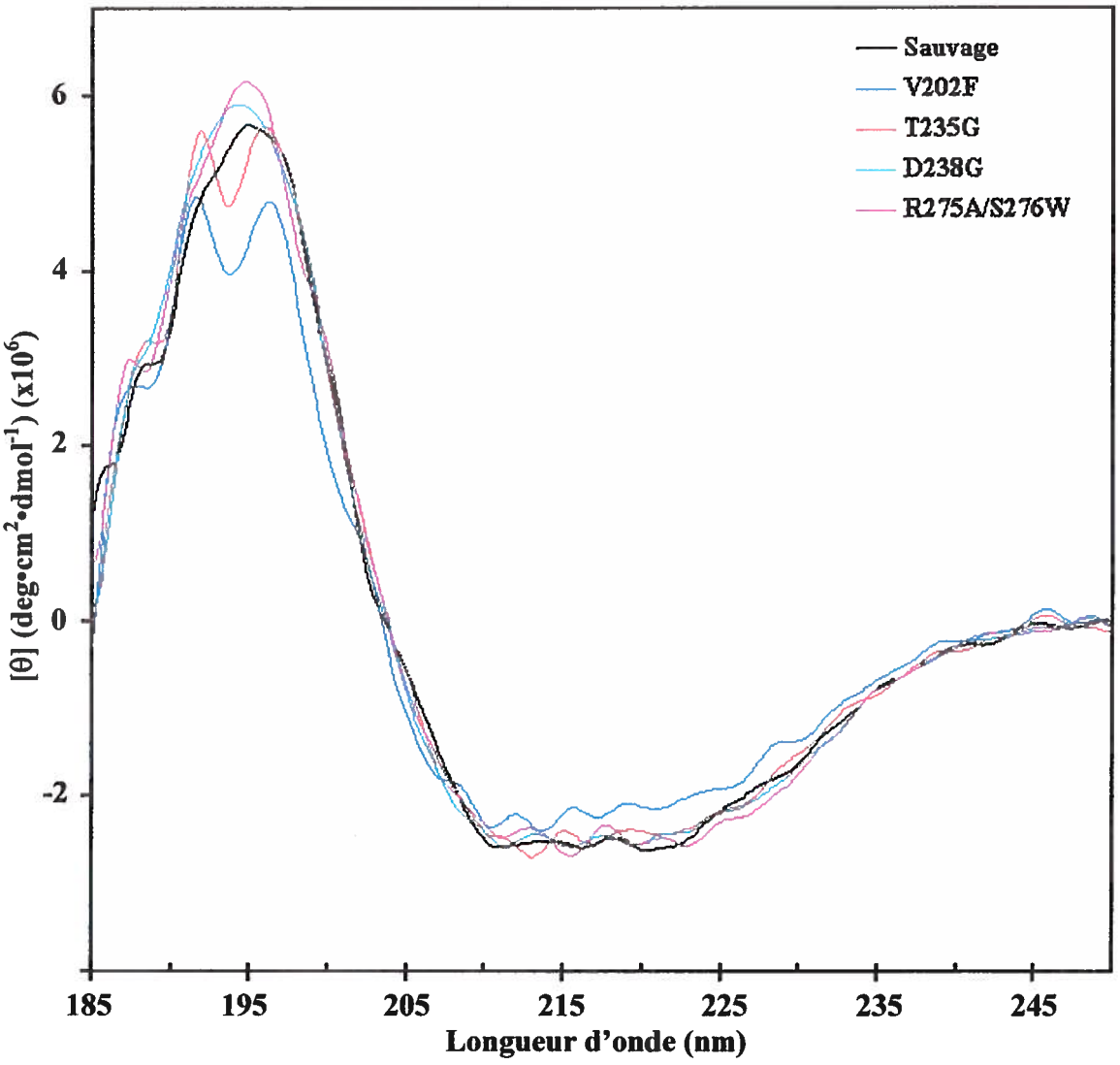


Figure 24 : Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A.

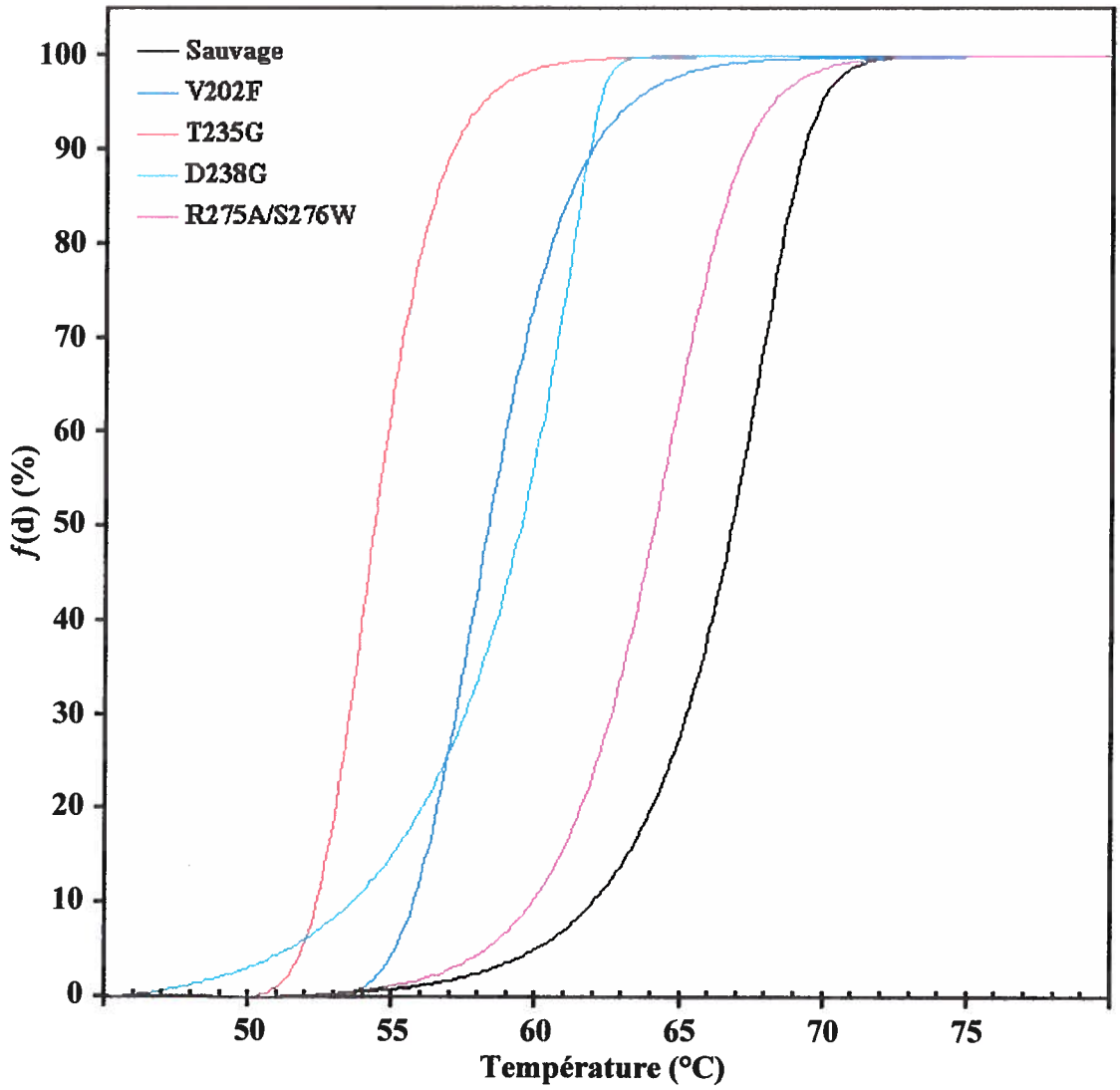


Figure 25 : Courbe de dénaturation thermique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A suivie par dichroïsme circulaire.

8.5 Spectrofluorométrie

Suite à une mutation, des changements majeurs dans la structure tertiaire d'une protéine peuvent être évalués à l'aide d'un spectre de fluorescence puisque ces spectres sont révélateurs de l'ensemble des micro-environnements de chaque résidu aromatique, particulièrement les résidus tryptophane (Jiskoot *et al.*, 1995). Ainsi, des spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés entre 300 et 400 nm pour la xylanase 10A et les quatre mutants avec une longueur d'onde d'excitation de 285 nm (Figure 26). La longueur d'onde d'émission maximale de l'enzyme type sauvage est de 338,3 nm. Les mutations V202F, T235G et D238G ont induit un « Blue shift » respectivement de 2,0 nm, 0,4 nm et 0,8 nm alors que la mutation R275A/S276W a induit un « Red shift » de 0,4 nm. Étant donné que le micro-environnement des tryptophanes est sensiblement le même malgré les différentes mutations, les enzymes mutantes ont sensiblement la même structure tertiaire que l'enzyme sauvage.

9.0 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE

L'activité spécifique des enzymes mutantes a été comparées à celle de la xylanase 10A, et ce, en présence de xylane, de carboxyméthylcellulose, de *p*-nitrophénylcellobiose, de β-glucan, de lichenane, de laminarin, de glucomannane, de galactomannane et de galactane (Tableau 11). Les seules hausses significatives d'activité par rapport à l'enzyme sauvage sont observées pour le mutant V202F en présence de laminarin avec 186 % d'activité relative et pour le mutant R275A/S276W en présence de β-glucan et de lichenane avec respectivement 166 % et 207 % d'activité relative. Dans tous les autres cas, l'activité est soit du même ordre ou inférieure à celle de l'enzyme sauvage ou elle est supérieure mais de façon non-significative en raison de l'erreur sur la mesure.

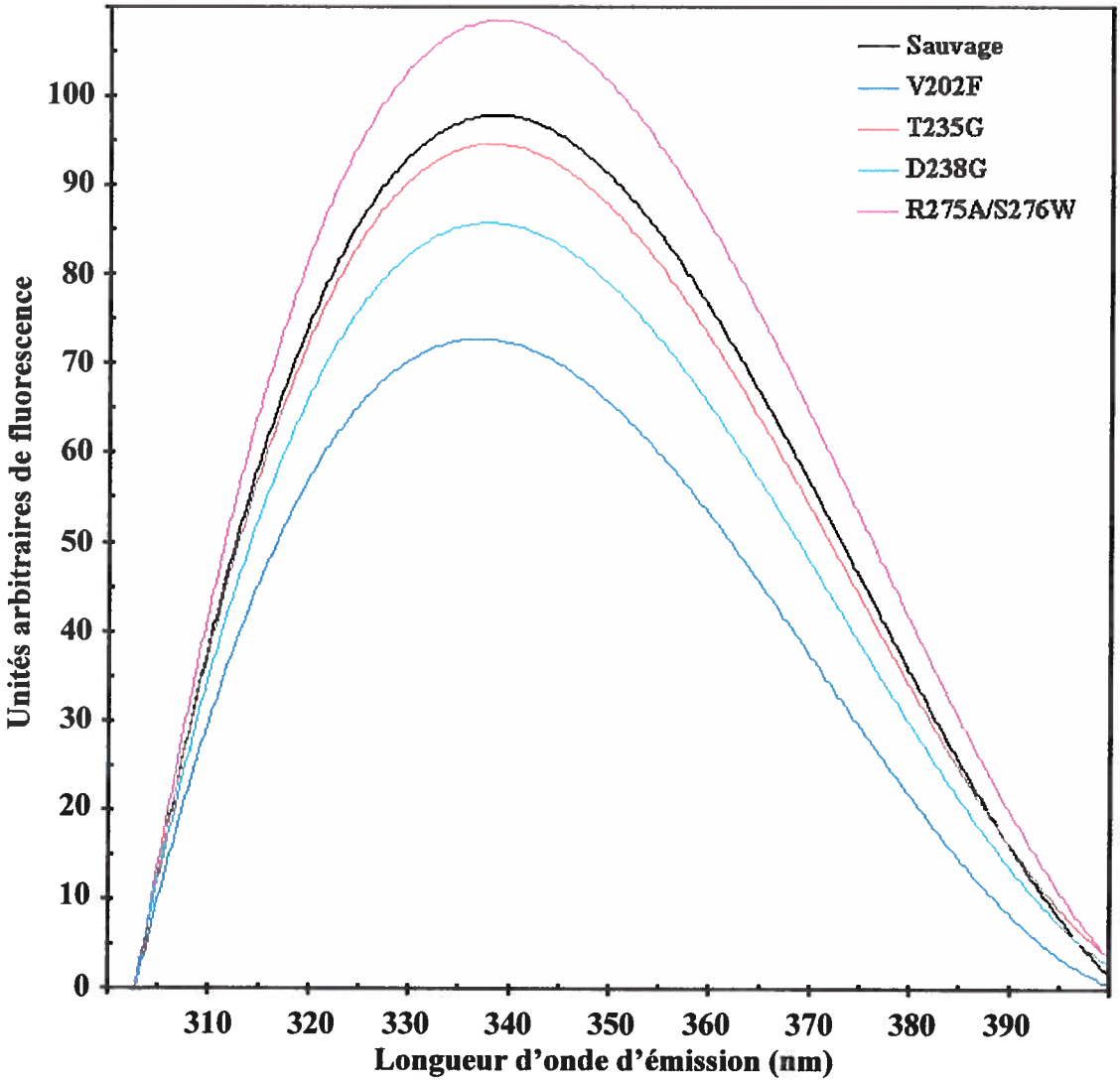


Figure 26 : Spectre d'émission de fluorescence de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A.

Tableau 11 : Activité spécifique de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A en présence de différents substrats. Les activités en caractère gras sont celles qui montrent une hausse significative de la part d'une protéine mutante par rapport à l'enzyme sauvage.

Substrat	Activité	Sauvage	V202F	T235G	D238G	R275A /S276W
Xylane	Spécifique (UI/mg)	227,4 ± 15,6	145,8 ± 9,3	37,6 ± 6,0	18,4 ± 10,0	163,0 ± 15,1
	Relative (%)	100 ± 6,9	64,1 ± 4,1	16,5 ± 2,6	8,1 ± 4,4	71,0 ± 6,6
CMC	Spécifique (UI/mg)	4,40 ± 0,17	3,64 ± 0,59	2,86 ± 0,31	1,49 ± 0,06	0,87 ± 0,42
	Relative (%)	100 ± 3,9	82,6 ± 13,4	65,0 ± 7,1	33,9 ± 1,4	19,7 ± 9,5
p-NPG_2	Spécifique (UI/mg)	0,339 ± 0,007	0,250 ± 0,004	0,026 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,286 ± 0,001
	Relative (%)	100 ± 2,1	73,7 ± 1,2	7,7 ± 0,3	2,1 ± 0,3	84,4 ± 0,3
β-glucan	Spécifique (UI/mg)	0,059 ± 0,006	0,063 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,001	**0,098 ± 0,010**
	Relative (%)	100 ± 10,2	106,8 ± 5,1	10,2 ± 5,1	10,2 ± 1,7	**166,1 ± 16,9**
Lichenane	Spécifique (UI/mg)	0,029 ± 0,007	0,033 ± 0,006	0,008 ± 0,003	0,005 ± 0,002	**0,060 ± 0,009**
	Relative (%)	100 ± 24,1	113,8 ± 20,7	27,6 ± 10,3	17,2 ± 6,9	**206,9 ± 31,0**
Laminarin	Spécifique (UI/mg)	0,021 ± 0,003	**0,039 ± 0,011**	0,016 ± 0,004	0,008 ± 0,004	0,025 ± 0,019
	Relative (%)	100 ± 14,3	**185,7 ± 52,4**	76,2 ± 19,0	38,1 ± 19,0	119,0 ± 90,4
Glucomannane	Spécifique (UI/mg)	0,056 ± 0,020	N.D.	0,021 ± 0,013	0,051 ± 0,030	0,024 ± 0,012
	Relative (%)	100 ± 35,7		37,9 ± 23,2	91,2 ± 53,6	42,4 ± 21,4
Galactomannane	Spécifique (UI/mg)	0,007 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,004	0,005 ± 0,002	0,009 ± 0,006
	Relative (%)	100 ± 42,9	114,3 ± 14,3	100,0 ± 57,1	71,4 ± 28,6	128,6 ± 85,7
Galactane	Spécifique (UI/mg)	0,011 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,008 ± 0,004	0,020 ± 0,008
	Relative (%)	100 ± 27,3	72,7 ± 9,1	54,5 ± 18,2	72,7 ± 36,4	181,8 ± 72,7

CMC : Carboxyméthylcellulose
p-NPG_2 : *p*-Nitrophénylcellobiose
N.D. : Activité non-détectée

10.0 ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Les produits d'hydrolyse de certains substrats, lorsqu'incubés en présence de la xylanase 10A et des mutants de la xylanase 10A, ont été fractionnés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Ces substrats sont le xylane (Figure 27), le β-glucan (Figure 28), le lichenane (Figure 29), le laminarin (Figure 30), le glucomannane (Figure 31), le galactomannane (Figure 31), le galactane (Figure 31), l'amylose (Figure 31), le cellopentaose (Figure 32) et le laminaripentaose (Figure 33). Sauf pour le mutant V202F en présence de β-glucan et de lichenane, le profil d'hydrolyse des protéines mutantes est le même que celui de l'enzyme sauvage. En présence de β-glucan et de lichenane, seul le mutant V202F libère du laminaribiose ainsi qu'un autre oligosaccharide non-identifié. En présence de laminarin, toutes les enzymes montrent une accumulation énorme de glucose, un monosaccharide, ce qui est typique des enzymes de mode *exo* (Kulminskaya *et al.*, 2001). Pour toutes les enzymes, aucune hydrolyse n'a été détectée suite a une incubation prolongée en présence de galactomannane, de galactane et d'amylose. Par ailleurs, les mutants T235G et D238G ont montré très peu d'hydrolyse en présence de tous les substrats autres que le laminarin et le laminaripentaose. Dans tous les cas, très peu de transglycosylation est observé lorsque les enzymes sont incubées en présence de cellopentaose alors que lorsqu'elles sont incubées avec du laminaripentaose beaucoup de produits d'un degré de polymérisation supérieur au matériel de départ apparaissent au cours de la réaction. Tous les profils d'élution des oligosaccharides ayant servi de standard pour l'identification des pics sont répertoriés à l'annexe G.

Figure 27 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du xylane par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme.

Légende : Xyl_2 : Xylobiose
Xyl_3 : Xylotriose
Xyl_4 : Xylotétraose
Xyl_5 : Xylopentaose
Xyl_6 : Xylohexaose

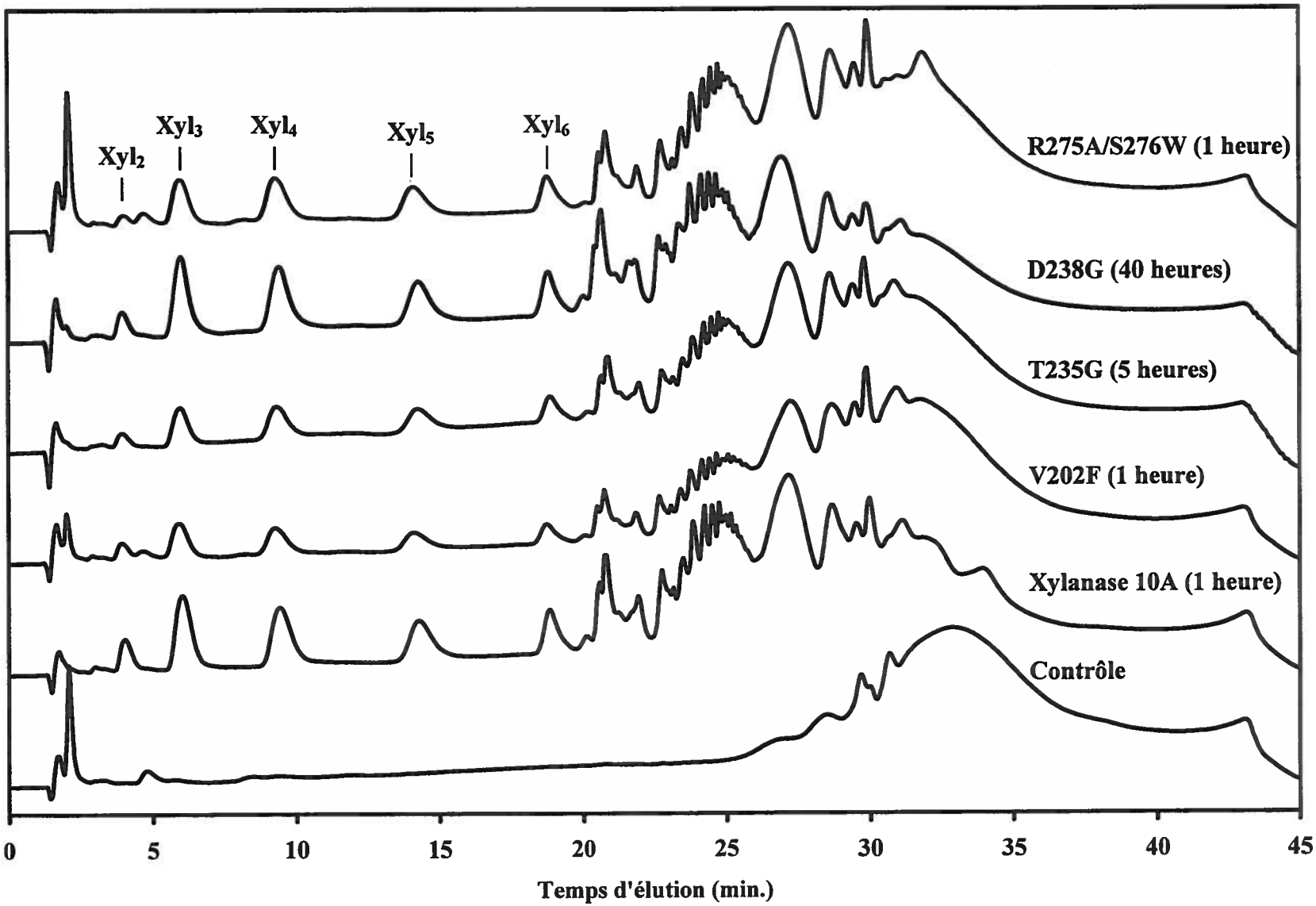

Xyl2
Xyl3
Xyl4
Xyl5
Xyl6
R275A/S276W (1 heure)
D238G (40 heures)
T235G (5 heures)
V202F (1 heure)
Xylanase 10A (1 heure)
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Temps d'élution (min.)

Figure 28 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du β-glucan par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme. a) Xylanase 10A sauvage, b) mutant V202F c) mutants T235G et D238G et d) mutant R275A/S276W.

Légende :
Glc : Glucose
Cel_2 : Cellobiose
Cel_3 : Cellotriose
Cel_4 : Cellotétraose
Lam_2 : Laminaribiose

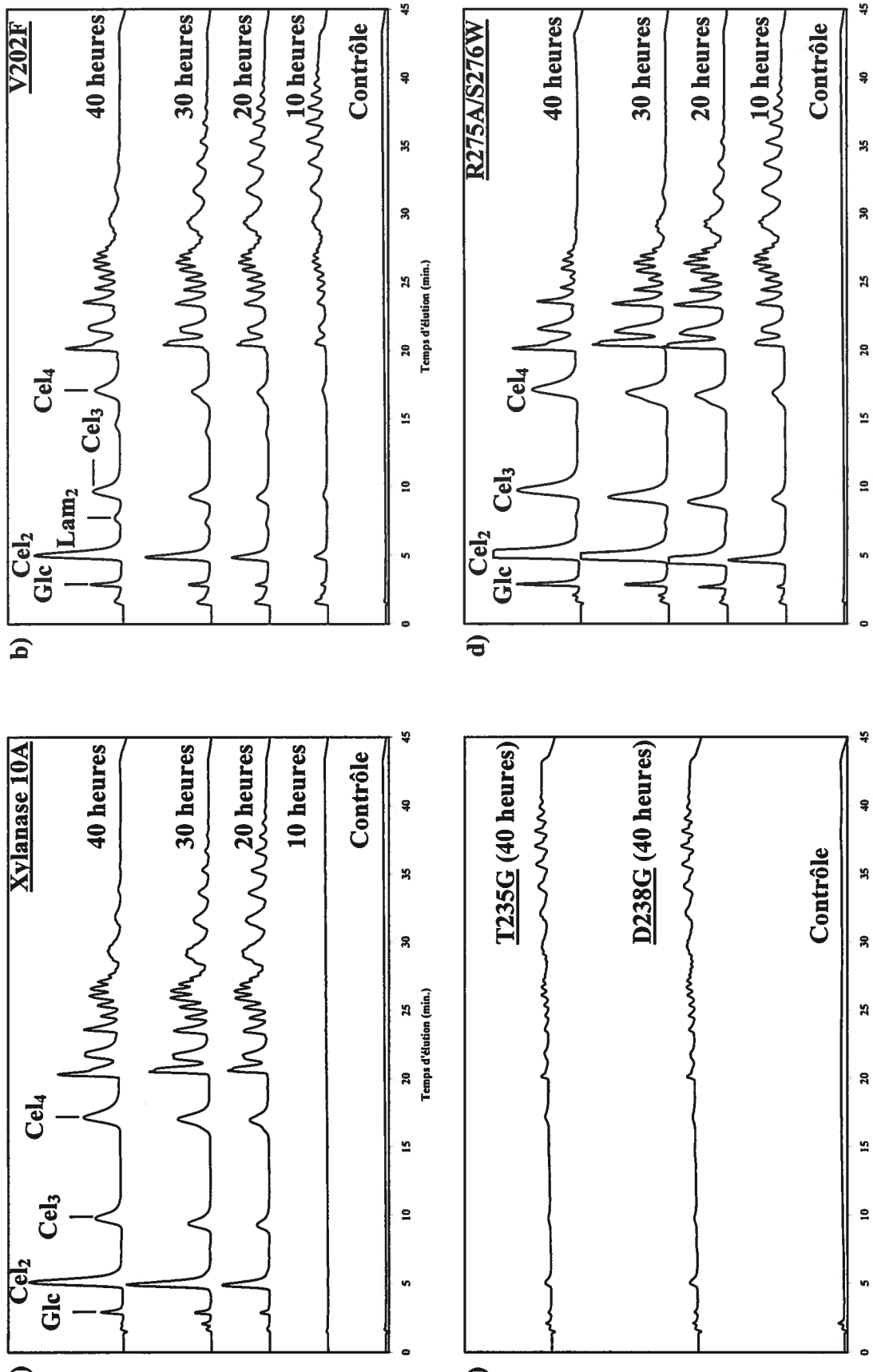

a)
Xylanase 10A
Cel2
Glc
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
b)
V202F
Cel2
Glc
Lam2
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
c)
T235G (40 heures)
D238G (40 heures)
Contrôle
Temps d'élution (min.)
d)
R275A/S276W
Cel2
Glc
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)

Figure 29 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du lichenane par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme. a) Xylanase 10A sauvage, b) mutant V202F c) mutants T235G et D238G et d) mutant R275A/S276W.

Légende :
Glc : Glucose
Cel_2 : Cellobiose
Cel_3 : Cellotriose
Cel_4 : Cellotétraose
Lam_2 : Laminaribiose

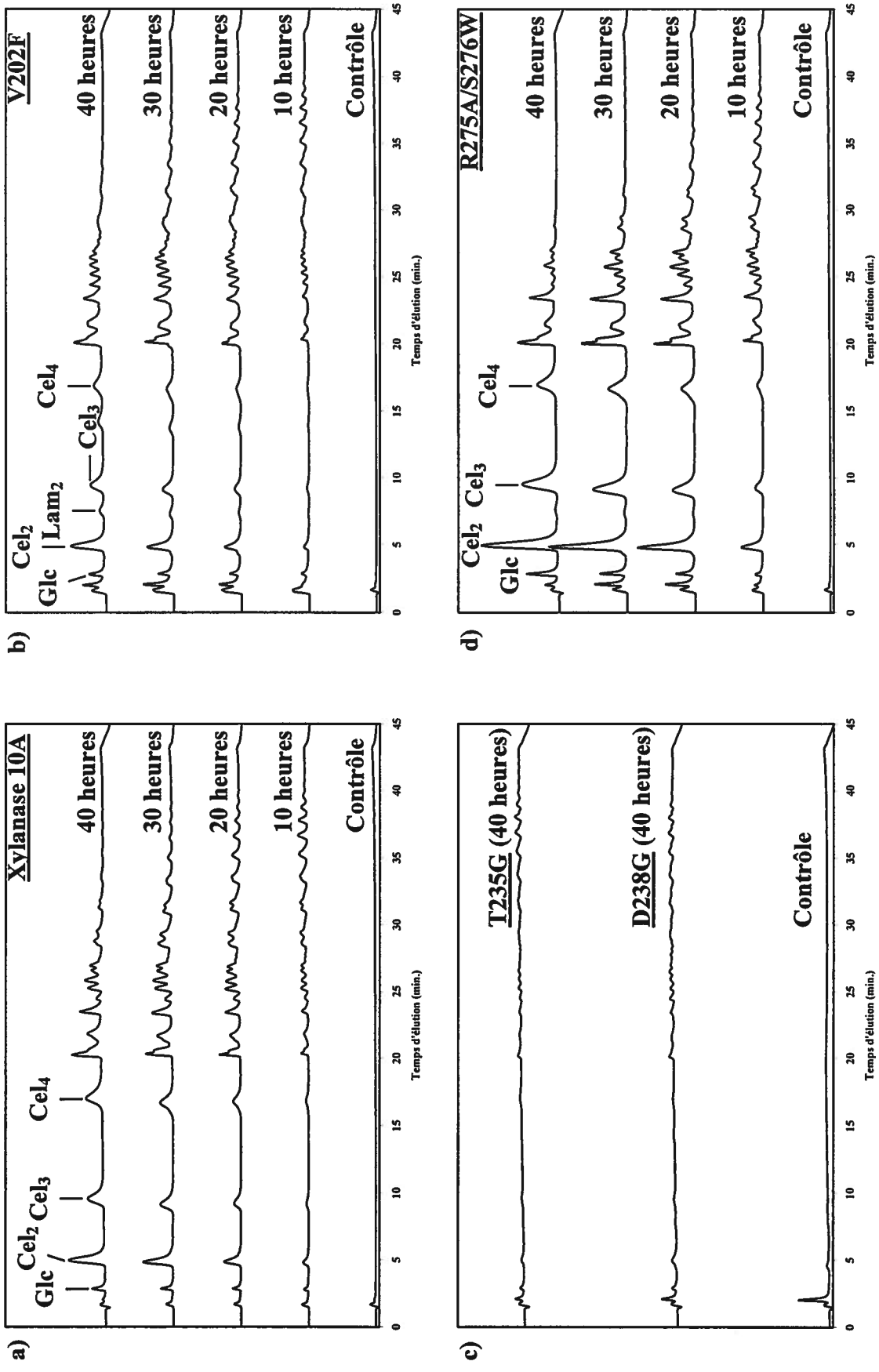

a)
Xylanase 10A
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
b)
V202F
Glc
Cel2
Lam2
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
c)
T235G (40 heures)
D238G (40 heures)
Contrôle
Temps d'élution (min.)
d)
R275A/S276W
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)

Figure 30 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du laminarin par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme. a) Xylanase 10A sauvage, b) mutant V202F c) mutants T235G et D238G et d) mutant R275A/S276W.

Légende : Glc : Glucose
Gnt : Gentiobiose
Lam_2 : Laminaribiose
Lam_3 : Laminaritriose

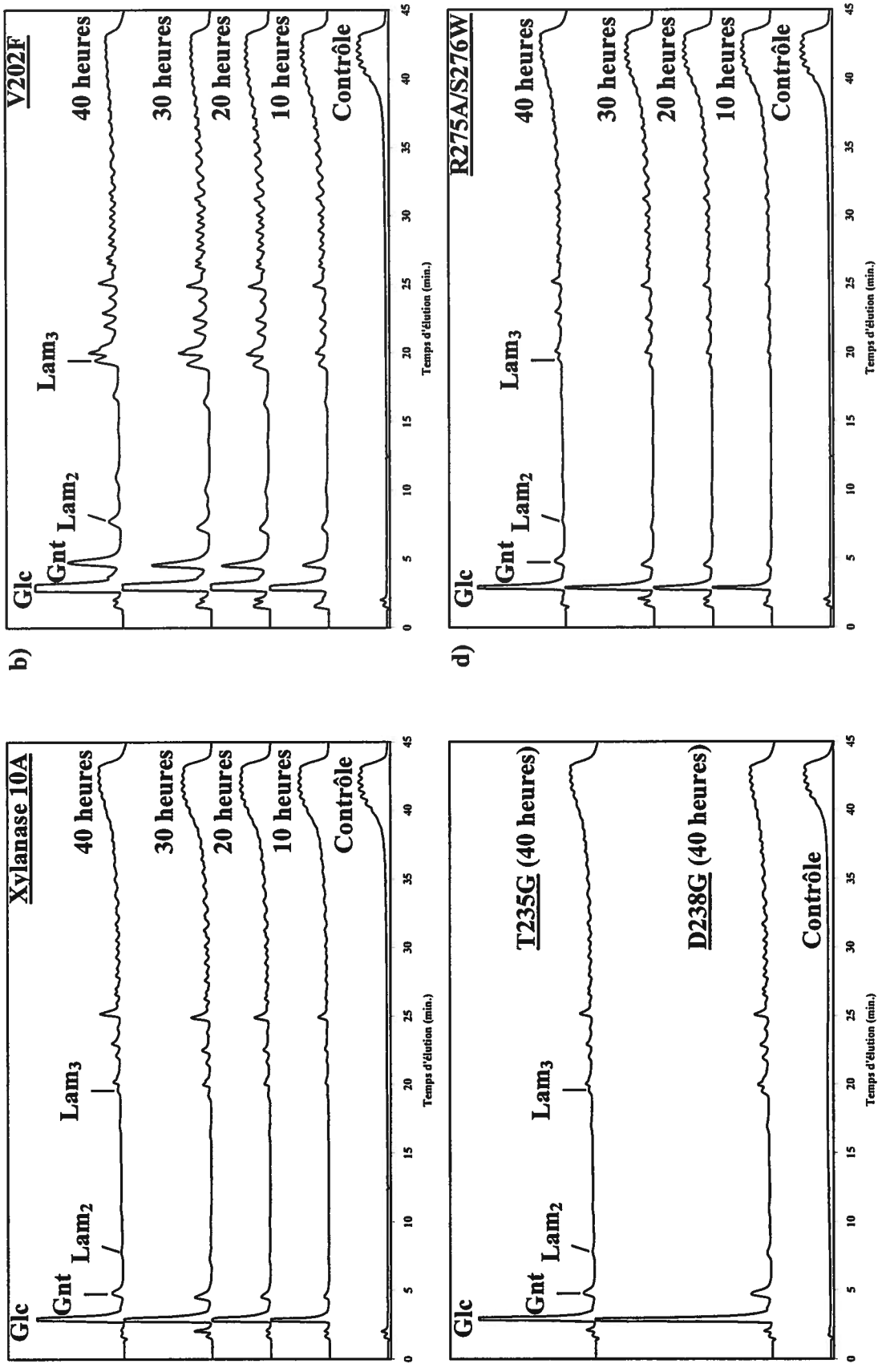

a)
Xylanase 10A
Glc
Gnt
Lam2
Lam3
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
b)
V202F
Glc
Gnt
Lam2
Lam3
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)
c)
Glc
Gnt
Lam2
Lam3
T235G (40 heures)
D238G (40 heures)
Contrôle
Temps d'élution (min.)
d)
R275A/S276W
Glc
Gnt
Lam2
Lam3
40 heures
30 heures
20 heures
10 heures
Contrôle
Temps d'élution (min.)

Figure 31 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse a) du glucomannane, b) du galactomannane, c) du galactane et d) de l'amylose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est de 40 heures sauf pour l'amylose qui est de 30 heures.

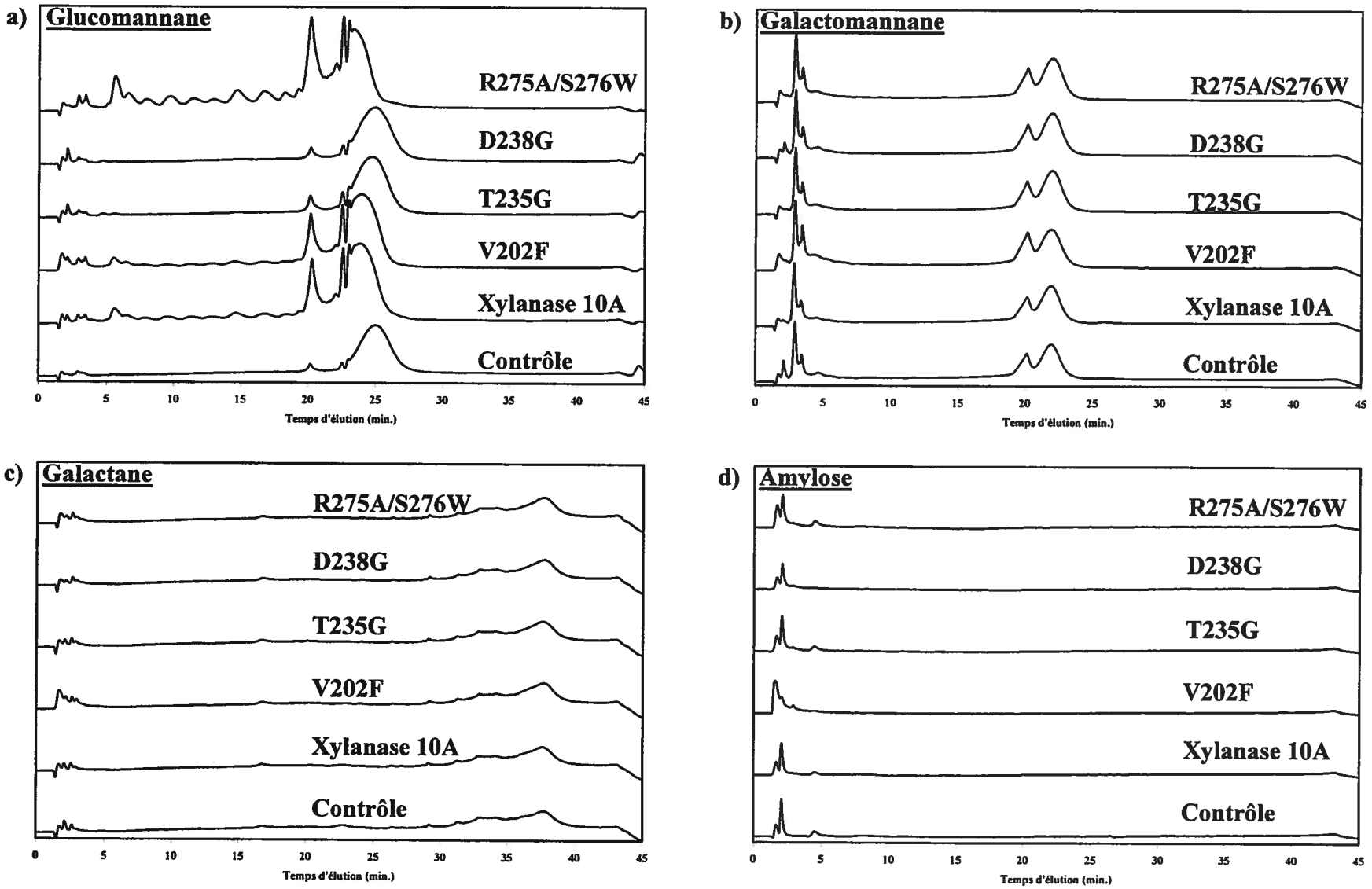
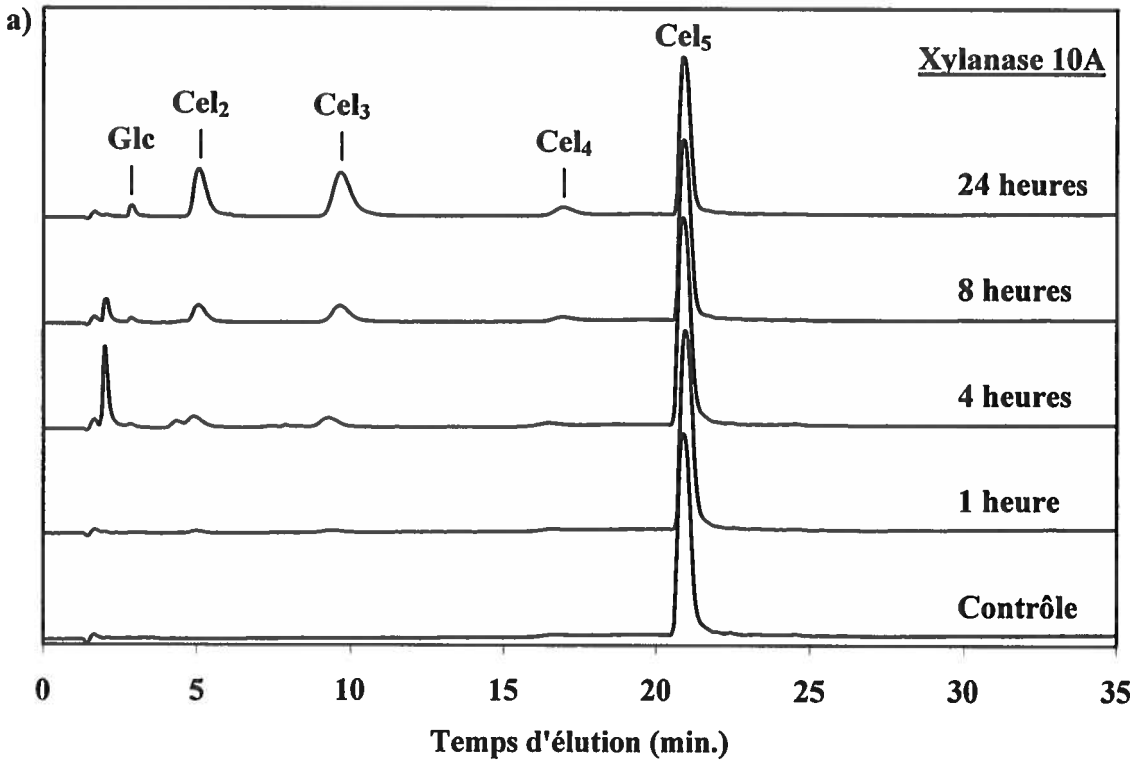
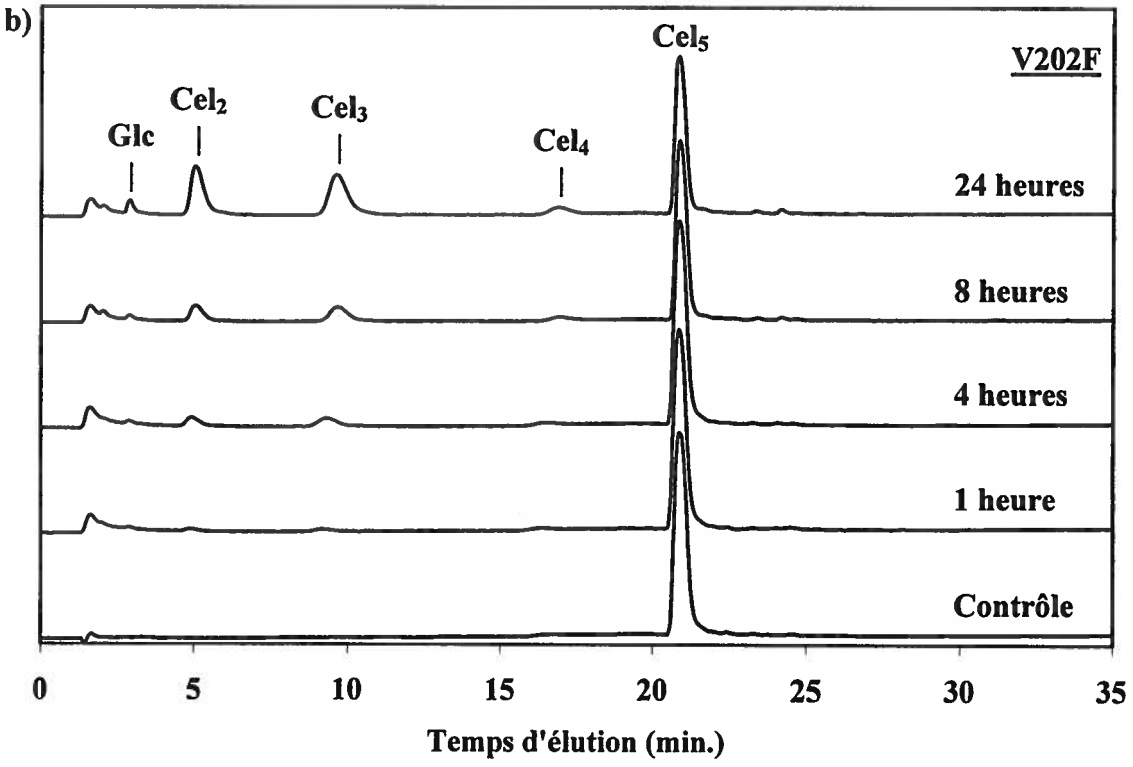
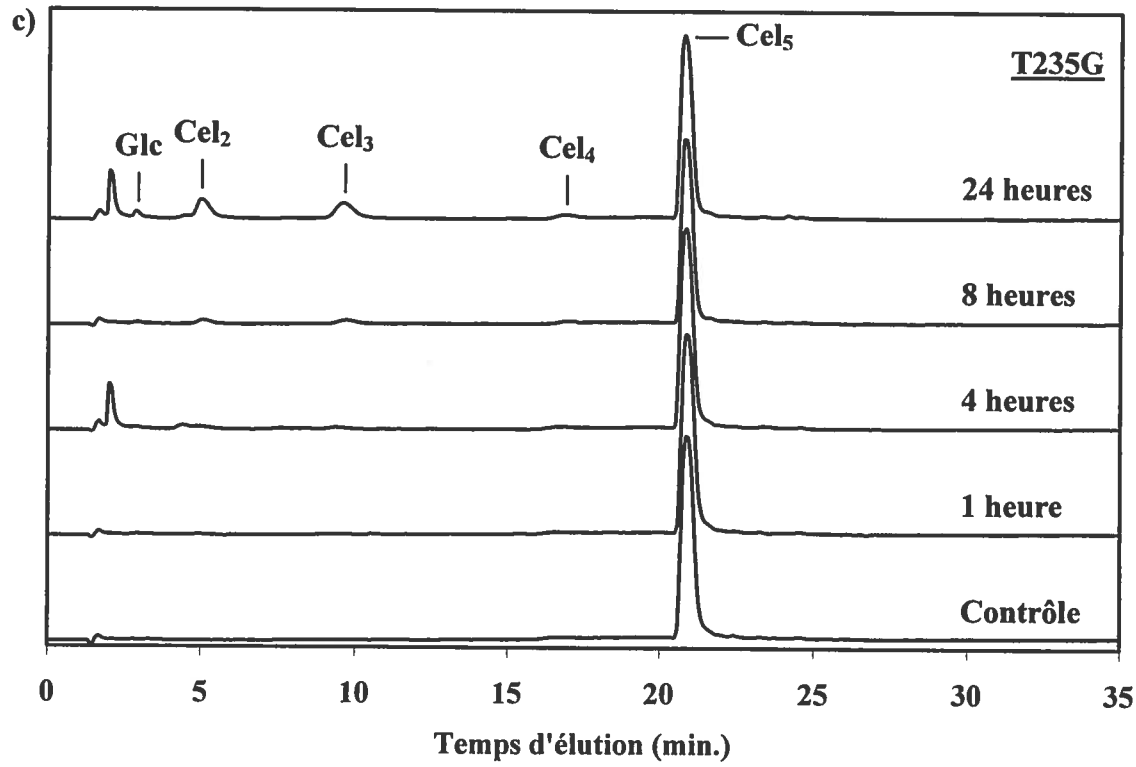

a)
Glucomannane
R275A/S276W
D238G
T235G
V202F
Xylanase 10A
Contrôle
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Temps d'élution (min.)
b)
Galactomannane
R275A/S276W
D238G
T235G
V202F
Xylanase 10A
Contrôle
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Temps d'élution (min.)
c)
Galactane
R275A/S276W
D238G
T235G
V202F
Xylanase 10A
Contrôle
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Temps d'élution (min.)
d)
Amylose
R275A/S276W
D238G
T235G
V202F
Xylanase 10A
Contrôle
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Temps d'élution (min.)

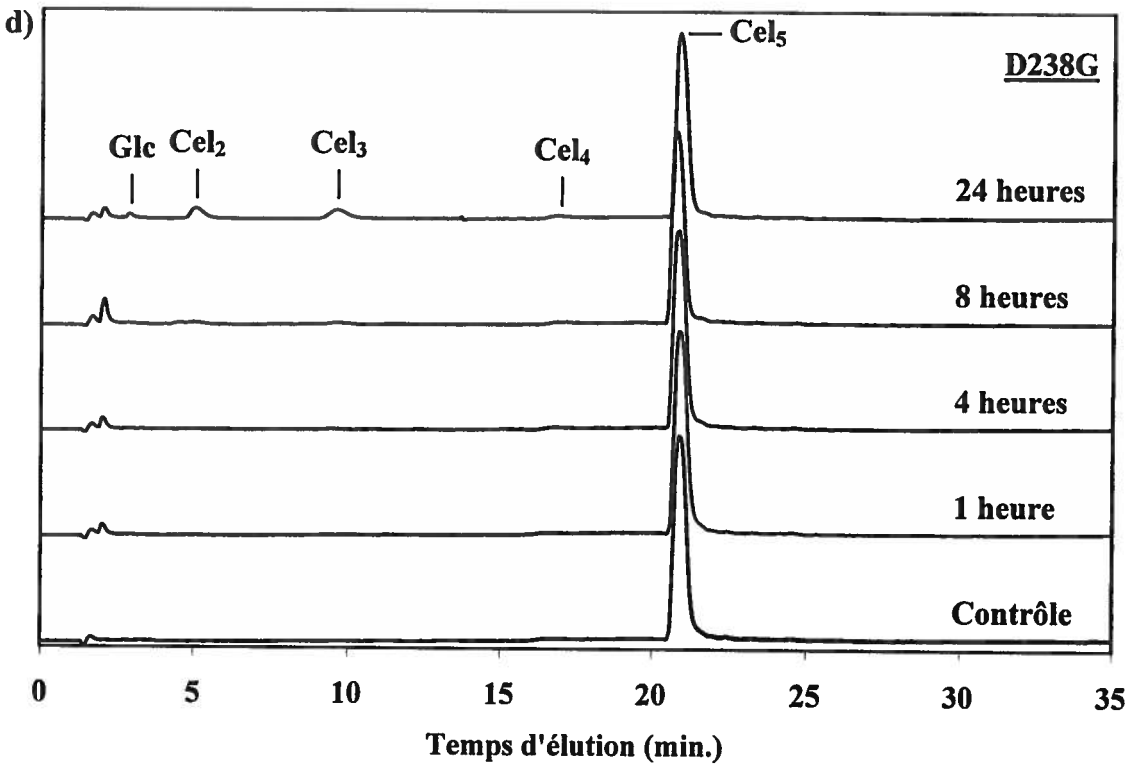
Figure 32 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du cellopentaose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme. a) Xylanase 10A sauvage, b) mutant V202F c) mutant T235G, d) mutant D238G et e) mutant R275A/S276W.

Légende : Glc : Glucose
Cel_2 : Cellobiose
Cel_3 : Cellotriose
Cel_4 : Cellotétraose
Cel_5 : Cellopentaose


a)
Xylanase 10A
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
Cel5
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


b)
V202F
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
Cel5
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


c)
Cel5
T235G
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


d)
Cel5
D238G
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)

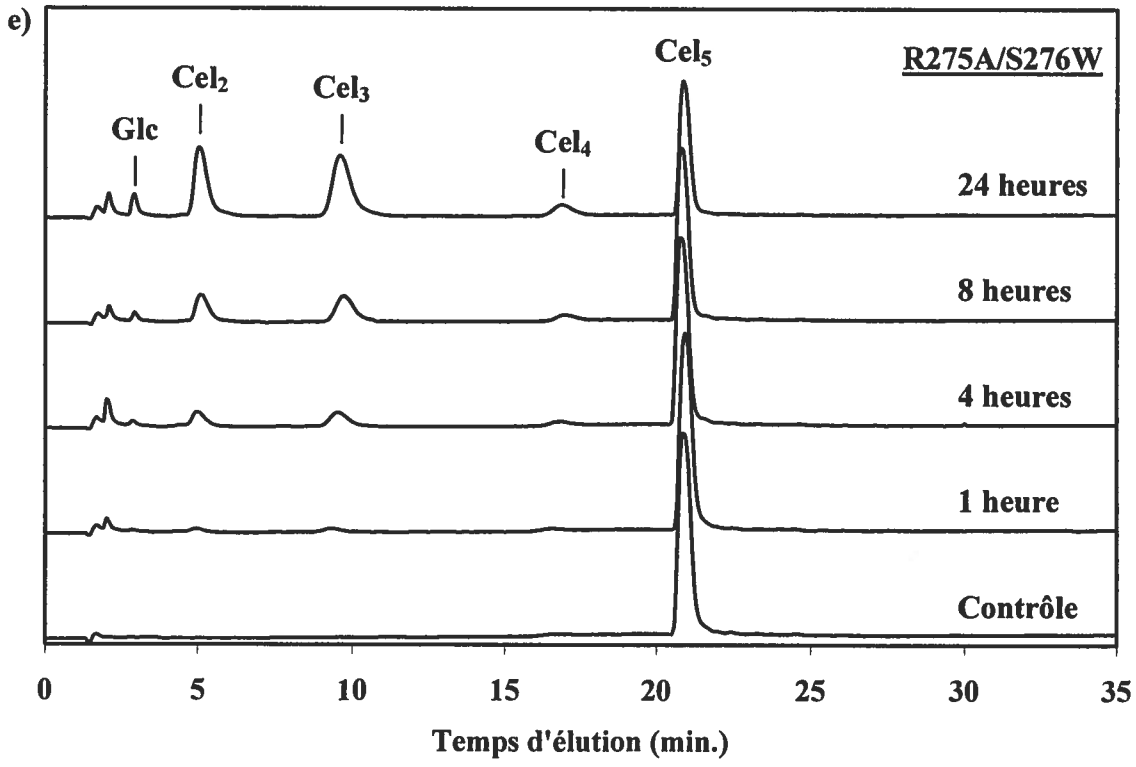
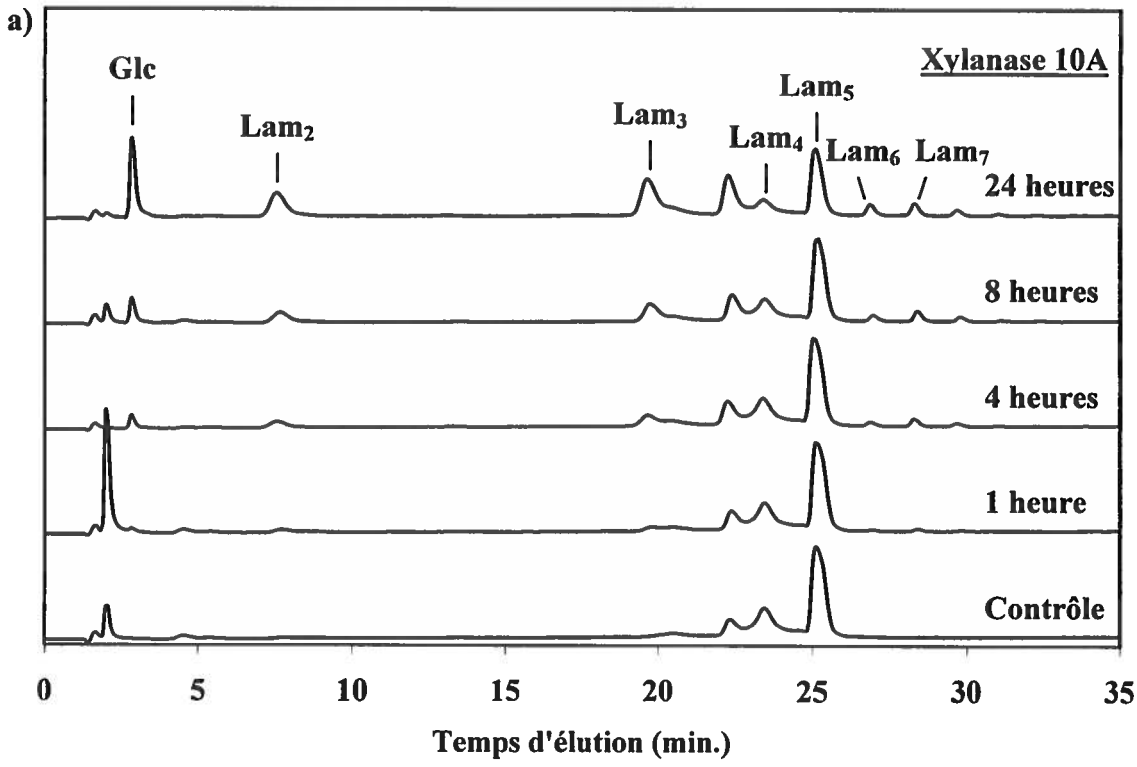
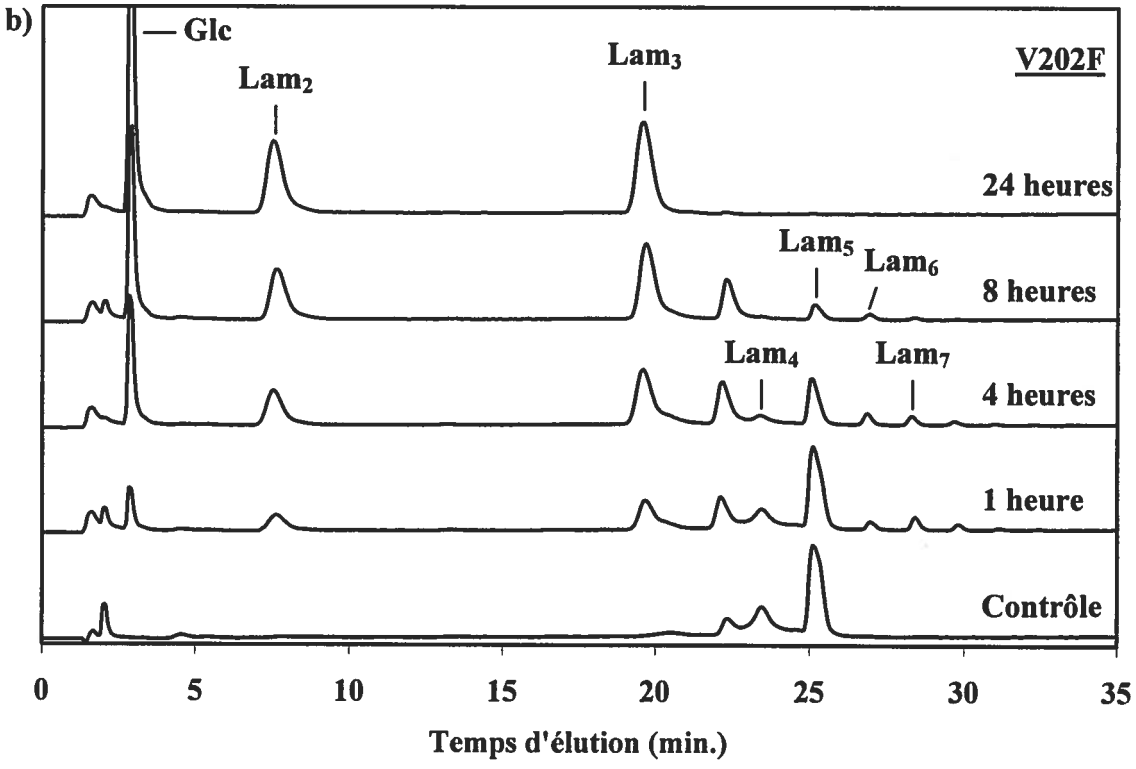
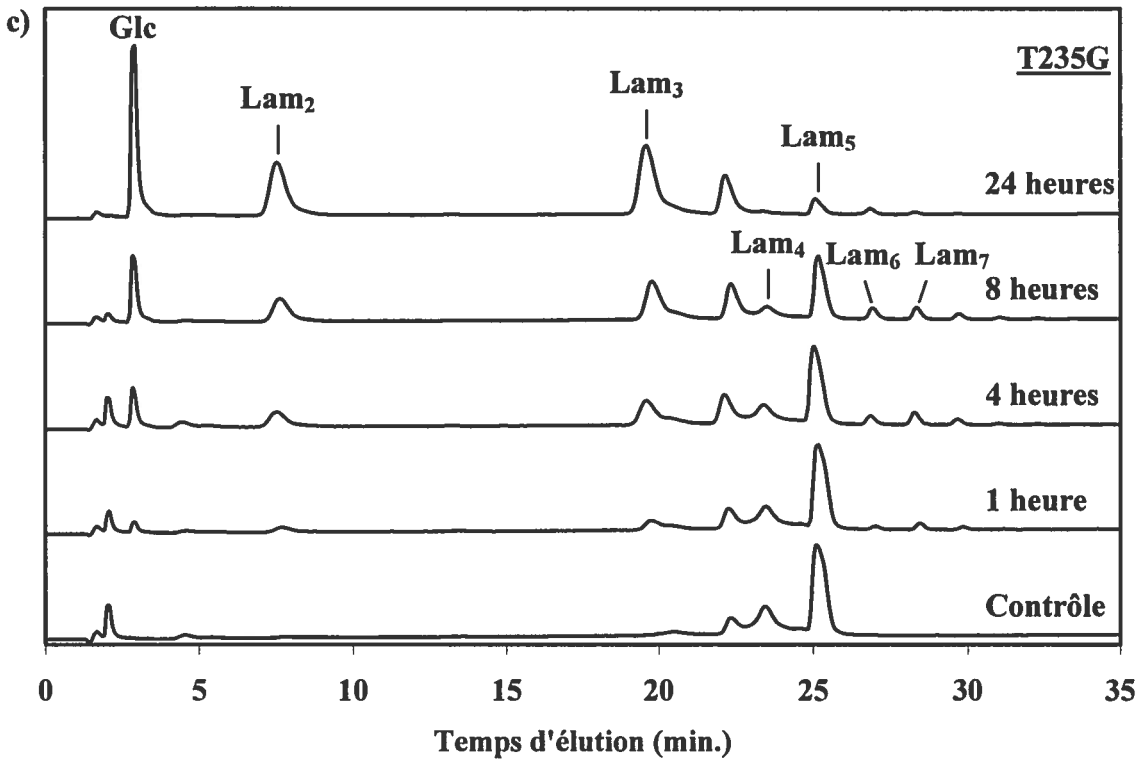

e)
Glc
Cel2
Cel3
Cel4
Cel5
R275A/S276W
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)

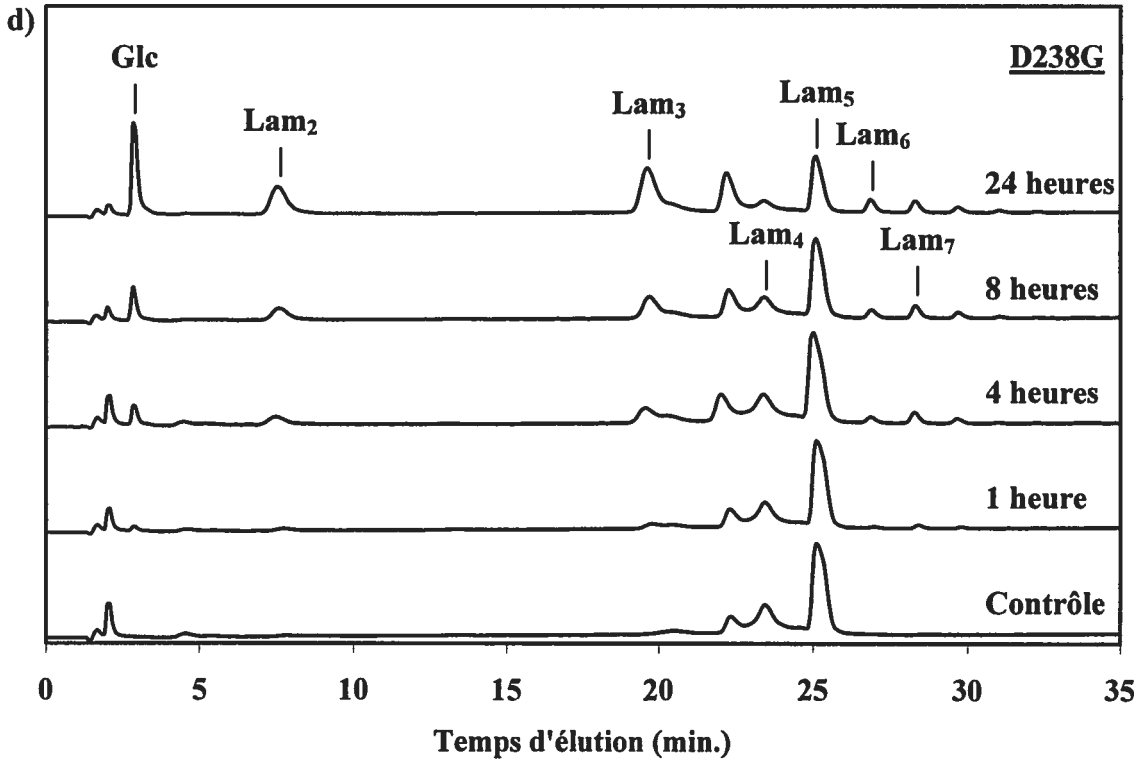
Figure 33 : Chromatogrammes des produits issus de l'hydrolyse du laminaripentaose par la xylanase 10A et les mutants de la xylanase 10A séparés par chromatographie à haute performance échangeuse d'anions. Le temps d'incubation avant les différents prélèvements est indiqué sur chaque chromatogramme. a) Xylanase 10A sauvage, b) mutant V202F c) mutant T235G, d) mutant D238G et e) mutant R275A/S276W.

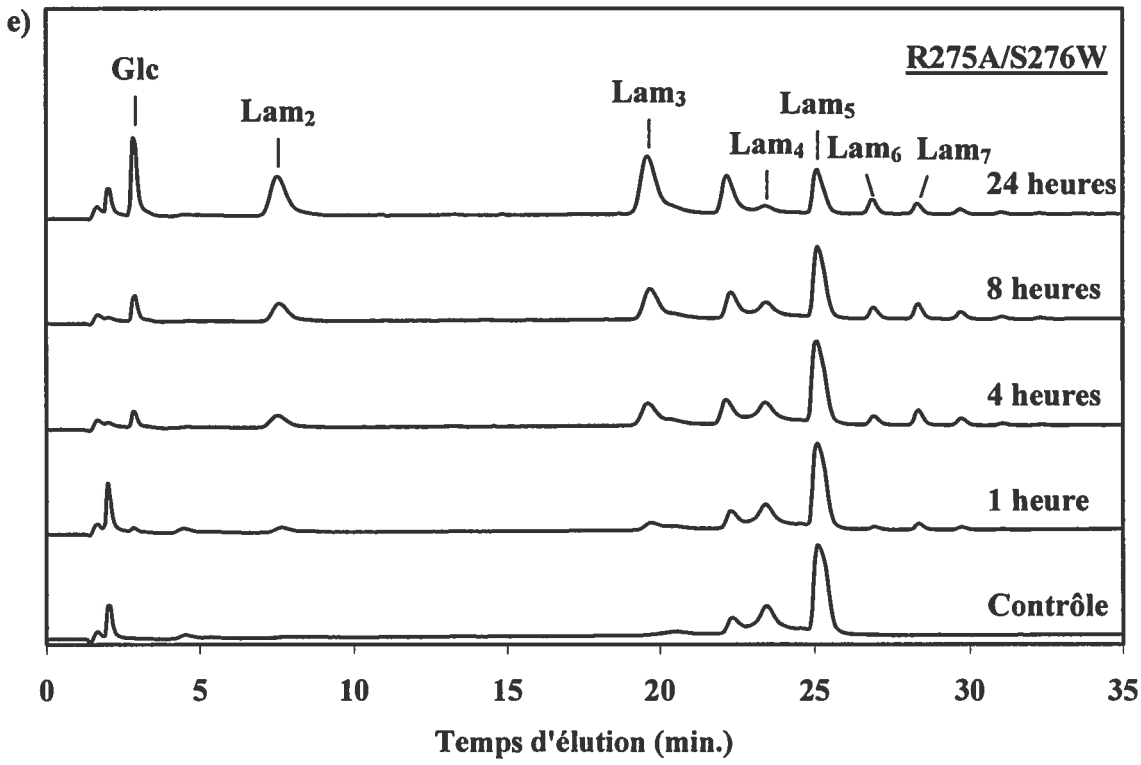
Légende :
Glc : Glucose
Lam_2 : Laminaribiose
Lam_3 : Laminaritriose
Lam_4 : Laminaritétraose
Lam_5 : Laminaripentaose
Lam_6 : Laminarihexaose
Lam_7 : Laminariheptaose


a)
Xylanase 10A
Glc
Lam2
Lam3
Lam4
Lam5
Lam6
Lam7
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


b)
V202F
Glc
Lam2
Lam3
Lam4
Lam5
Lam6
Lam7
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


c)
Glc
Lam2
Lam3
Lam5
T235G
24 heures
Lam4
Lam6
Lam7
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


d)
Glc
Lam2
Lam3
Lam5
Lam6
D238G
24 heures
Lam4
Lam7
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)


e)
R275A/S276W
Glc
Lam2
Lam3
Lam5
Lam4
Lam6
Lam7
24 heures
8 heures
4 heures
1 heure
Contrôle
0
5
10
15
20
25
30
35
Temps d'élution (min.)

DISCUSSION

1.0 SUPERPOSITION DES STRUCTURES ET CHOIX DES MUTATIONS

Suite à la superposition de toutes les structures disponibles du clan GH-A avec la structure de la xylanase 10A de *Streptomyces lividans*, il s'est avéré que les enzymes de mode *endo* se supperposaient mieux que celles de mode *exo* (Tableau 7). Ceci est dû au fait que la xylanase 10A est elle-même une enzyme de mode *endo* et que les enzymes de mode *exo* ont des boucles beaucoup plus longues entre les brins-β et les hélices-α et qui sont d'ailleurs responsables du mode *exo* en encombrant stériquement le site actif (Davies et Henrissat, 1995). Par conséquent, seules les glycosides hydrolases du clan GH-A de mode *endo* ont été utilisées pour l'étude des résidus impliqués dans la spécificité de substrat chez les enzymes de ce clan.

Suite à la superposition de ces structures, uniquement les brins-β ont été comparés pour y trouver des différences structurelles puisque les acides aminés composant le site actif des enzymes au repliement de type tonneau-$(\beta/\alpha)_8$ sont retrouvés à l'extrémité N-terminale des brins-β et à l'extrémité C-terminale des boucles qui suivent les brins-β (Figure 34) (Wierenga, 2001). Par ailleurs, les brins-β_1 et β_5 n'ont pas été analysés puisque les résidus qui font partie du site actif sur ces deux brins sont encore mal connus.

Le tableau 8 compte 16 positions potentiellement impliquées dans la spécificité de substrat de la xylanase 10A. Si chaque résidus était muté pour son équivalent chez les autres glycosides hydrolases de mode *endo* du clan GH-A, cela impliquerait 50 mutations différentes. Dans le cadre du présent projet de maîtrise, six mutations ont été sélectionnées et les paragraphes qui suivent expliquent le rationnel derrière le choix de chaque mutation.

1.1 Mutation T42R

La position T42 de la xylanase 10A de *S. lividans* se situe tout près des résidus E44 et N45 qui font partie du sous-site -2 (Ducros *et al.*, 2000) et elle est conservée chez les xylanases de la famille 10 (Figure 35a). De plus, une arginine est conservée à la

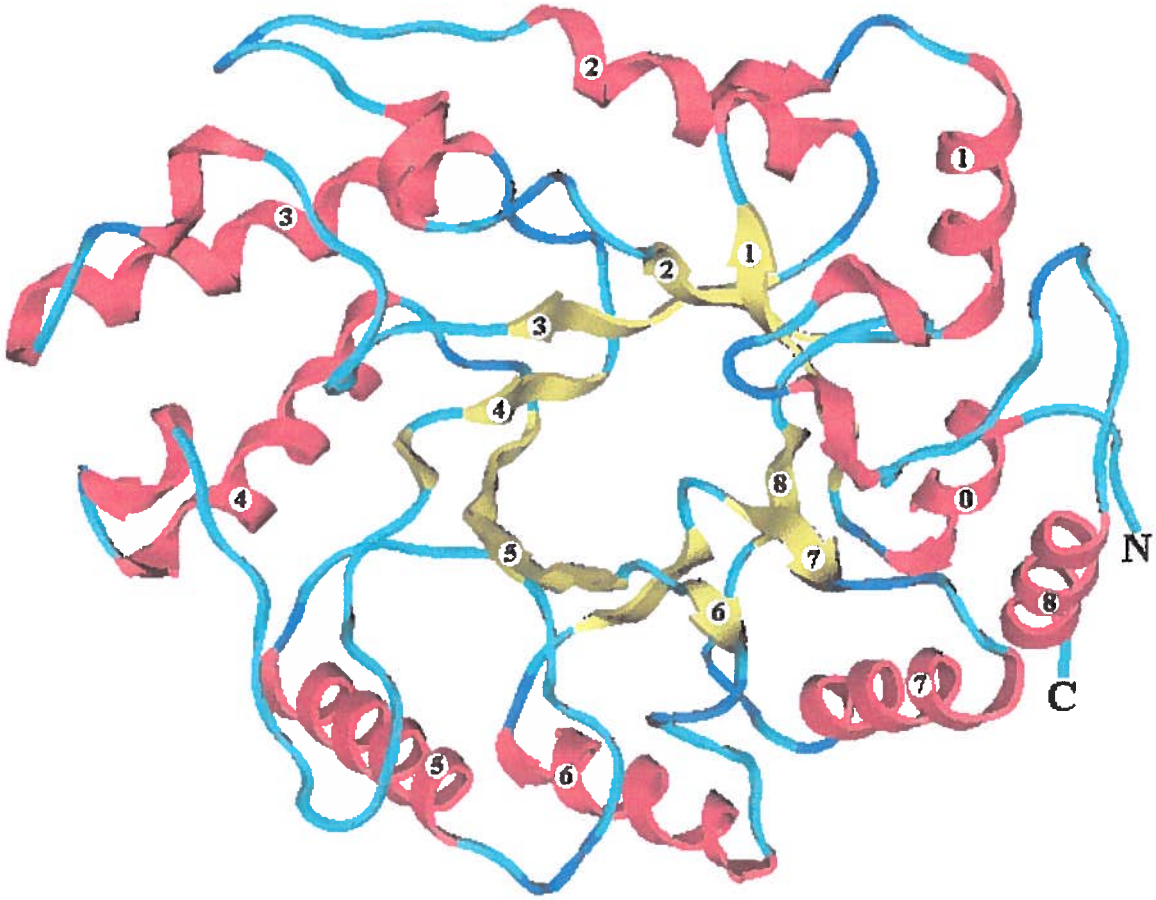


Figure 34 : Disposition des brins-β et des hélices-α au sein de la xylanase 10A de *S. lividans*. Image générée à l'aide du logiciel Molecular Operating Environment (MOE) avec les brins-β en jaune, les hélices-α en rouge, les boucles en turquoise et les coudes-β en bleu.

a) Brin-β_2

Famille 10

S. lividans - Xylanase	40	MVTAE 44
C. fimi - Xylanase	39	LVVAE 43
C. thermocellum - Xylanase	40	MVVCE 44
P. simplicissimum - Xylanase	43	QLTPE 47
P. fluorescens cellulosa - Xylanase	39	QITAE 43
T. aurantiacus - Xylanase	42	QVTPE 46

Famille 5

A. cellulolyticus - cellulase	60	TIRLP 64
B. agaradherans - cellulase	57	VFRAA 61
C. thermocellum - cellulase	43	HVRLP 47
C. cellulolyticium - cellulase	77	TVRIP 81
E. chrysanthemi - cellulase	55	IVRAA 59
T. fusca - mannanase	48	TVRVV 52

Famille 17

H. vulgare - Endo-β-1,3-glucanase	29	GMRIY 33
H. vulgare - Lichenase	29	SMRLY 33

b) Brin-β_7

Famille 10

S. lividans - Xylanase	231	DVA**ITELDI** 239
C. fimi - Xylanase	228	DVR**ITELDI** 236
C. thermocellum - Xylanase	234	IVSF**TEIDI** 242
P. simplicissimum - Xylanase	233	EIA**ITELDI** 241
P. fluorescens cellulosa - Xylanase	241	KIK**ITELDV** 249
T. aurantiacus - Xylanase	232	EVA**ITELDV** 240

Famille 5

A. cellulolyticus - cellulase	277	PVWL**GEFGT** 285
B. agaradherans - cellulase	220	AIFV**SEWGT** 228
C. thermocellum - cellulase	266	KLYC**GEFGV** 274
C. cellulolyticium - cellulase	302	PVII**GECGA** 310
E. chrysanthemi - cellulase	215	ALFV**TEWGT** 223
T. fusca - mannanase	220	PLII**GEFGH** 228

Famille 17

H. vulgare - Endo-β-1,3-glucanase	226	KVVV**SESGW** 234
H. vulgare - Lichenase	227	KLVV**SESGW** 235

Figure 35 : Alignement de séquences entre la xylanase 10A de *S. lividans* et les autres enzymes de mode *endo* du clan GH-A au niveau des brins a) β_2 et b) β_7. Les résidus en caractère gras sont ceux relevés dans le texte principal.

position équivalente chez les cellulases de la famille 5 (Dominguez *et al.*, 1995). Suite aux travaux de modélisation moléculaire, il ressort que cette arginine est conservée non-seulement chez la β-mannanase de *Thermobifida fusca*, qui fait aussi partie de la famille 5, mais également chez l'endo-β-1,3-glucanase GII et la lichenase de *Hordeum vulgare* de la famille 17. Contrairement aux xylanases, toutes ces enzymes hydrolysent un substrat composé de monosaccharides ayant un groupement hydroxyméthyle en position cinq.

1.2 Mutations V202F et V202Y

Deux facteurs ont mené à la mutation de la position V202 de la xylanase 10A par une phénylalanine et par une tyrosine. Tout d'abord, ce résidu se trouve au début du brin-β_6 dont les résidus Q205 et H207 font parti du sous-site -1 de l'enzyme (Roberge *et al.*, 1997a; Roberge *et al.*, 1997b). Il était donc intéressant d'étudier l'effet de la mutation d'un résidu situé loin des principaux acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du substrat. Par ailleurs, à la position équivalente du résidu V202 se trouve respectivement une tyrosine et une phénylalanine chez les cellulases de la famille 5 et chez la β-mannanase de *T. fusca* qui fait aussi partie de la famille 5. Par conséquent, le but de ces mutations était aussi d'étudier l'effet distinct des deux résidus aromatiques à la même position sur la spécificité de substrat de la xylanase 10A.

1.3 Mutations T235G et D238G

Dans les deux cas, les résidus T235 et D238 de la xylanase 10A font partie du motif ITELDI conservé chez les xylanases de la famille 10 (Figure 35b). Ils sont impliqués dans des réseaux de liaisons hydrogène importants pour le positionnement et l'ionisation des résidus catalytiques (Roberge *et al.*, 1997a; Roberge *et al.*, 1997b). Pour ce, il peut paraître hasardeux de muter ces résidus. Cependant, lorsque comparés aux résidus équivalents chez les autres glycosides hydrolases de mode *endo* du clan GH-A, une glycine est conservée chez les enzymes de la famille 5 à la position équivalente au résidu T235 et il en est de même chez les enzymes de la famille 5 et de la famille 17 à la

position équivalente au résidu D238 (Figures 10 à 17 et 35b). De plus une glycine montre peu d'encombrement stérique et toutes ces enzymes hydrolysent un substrat composé de monosaccharides ayant un groupement hydroxyméthyle en position 5. Par conséquent, ces deux résidus étaient de bons choix pour muter des acides aminés situés directement dans le site actif.

1.4 Mutation R275A

Le choix d'effectuer la mutation R275A n'est pas issu de l'étude de modélisation moléculaire mais plutôt de résultats obtenus par Andrews *et al.*, (2000). Ces chercheurs ont muté le résidu équivalent chez la xylanase 10A de *Pseudomonas fluorescens cellulosa*, le résidu L314, par une alanine ce qui a fait diminuer d'environ 200 fois l'efficacité de l'enzyme en présence de *p*-nitrophénylxylobiose tout en conservant sensiblement la même efficacité en présence de *p*-nitrophénylcellobiose. Cette mutation aurait pour effet de permettre une plus grande liberté du résidu précédant, un tryptophane impliqué dans la liaison du substrat au sous-site -1, qui ne peut normalement pas laisser de la place au groupement hydroxyméthyle en position cinq du glucose (Figure 7) (Ducros *et al.*, 2000).

2.0 GÉNÉRATION ET SÉLECTION DES SOUCHES MUTANTES

Les mutations choisies ont été introduites dans le gène de la xylanase 10A en utilisant la méthode de recombinaison par extension des chevauchements (Horton *et al.*, 1989). Cette technique est rapide et efficace et permet d'effectuer les mutations directement sur le gène désiré sans nécessiter de clonage préalable dans une souche ou un vecteur particulier comme c'est le cas par exemple dans la méthode décrite par Kunkel, 1985.

Les gènes issus de la mutagenèse dirigée ont par la suite été clonés dans le vecteur c209, qui possède une origine de réplication et un gène de résistance au thiostrepton, et les constructions résultantes ont servi à transformer la souche hôte *S. lividans* 10-164, une

souche cellulase et xylanase négative. La sélection au thiostrepton n'a pas été faite immédiatement après l'étalement des transformants sur le milieu de régénérescence afin de permettre aux bactéries dénudées de leur paroi cellulaire de reformer cette dernière. Il y a par conséquent possibilité de faux positifs si une bactérie non transformée croît suffisamment avant l'ajout de l'antibiotique et résiste alors à l'antibiotique de par son nombre. Pour s'assurer de sélectionner un clone qui possède bel et bien le gène de résistance au thiostrepton, et donc le plasmide qui véhicule ce gène, des colonies ont été repiquées au hasard sur un milieu de sporulation qui contenait l'antibiotique.

Le but ultime des souches construites était la surproduction des enzymes désirées. Il était donc primordial d'évaluer cette facette avant de choisir un clone parmi les autres. Par conséquent, les quatre clones repiqués ayant le plus sporulés ont été mis en culture liquide et pour chaque souche, le clone qui sécrétait le plus de protéines avec une masse moléculaire apparente de 32,5 kDa, soit celle de la xylanase 10A de type sauvage, a été sélectionné (Figure 20). Un test d'activité spécifique contre le xylane avec chacun de ces milieux de culture n'était pas envisageable puisque contrairement à l'enzyme de type sauvage, l'activité des protéines mutantes générées n'était pas connue.

Au cours de cet exercice de sélection, aucun clone de la souche IAF932-V202Y n'a produit de quantité suffisante de protéines à 32,5 kDa et cette souche à donc été abandonnée. Aussi, tous les clones de la souche IAF932-V202F ont produit beaucoup moins de protéines à 32,5 kDa que les clones des autres souches. Il semble que cette position soit importante soit pour la sécrétion ou pour le repliement de la xylanase 10A. Comme le résidu V202 est très loin du peptide signal, il est plus probable que ces mutations aient eu un effet sur le repliement de l'enzyme. En effet, le repliement des protéines globulaires est dicté par la nature de sa chaîne polypeptidique (Behe *et al.*, 1991). La complémentarité des résidus hydrophobes qui se retrouvent en bout de ligne à l'intérieur de la protéine est le premier facteur qui influence le repliement protéique. Cependant, le centre hydrophobe des protéines peut tolérer une vaste diversité de mutations sans qu'il n'y ait d'effet sur la structure, la stabilité ou la fonction des protéines.

À la lumière de ces dires, il est envisageable que l'introduction de résidus volumineux tel que la phénylalanine ou la tyrosine en position V202 rende plus ardu le repliement de la xylanase 10A ce qui fait qu'une partie des enzymes produites n'a pas le temps de se replier et est ainsi dégradée par la bactérie qui reconnaît là une protéine non fonctionnelle. Cette hypothèse semble logique d'autant plus que le remplacement du résidu V202 par une tyrosine a un effet plus grand que par un résidu phénylalanine et ses deux résidus ne diffèrent que par le groupement hydroxyle de la tyrosine qui la rend plus volumineuse. Cependant, une fois repliée, la protéine mutante V202F est stable et fonctionnelle. Le problème se situerait donc uniquement au niveau de la vitesse de repliement de ces deux mutants.

Aussi, les protéines aux environs de 32,5 kDa provenant de tous les clones mis en culture pour les souches IAF932-V202F et IAF932-V202Y n'ont à peu près pas été détectées lors des immunobuvardages de type Western (Figures 20 et 21). La raison de cette caractéristique qu'ont les protéines de ces deux souches mutantes demeure inconnue. Il est possible, mais peu probable, que la position V202 fasse partie du site de reconnaissance de la majorité des anticorps anti-xylanase 10A contenus dans le mélange d'anticorps polyclonaux produits chez le lapin. En remplaçant le petit résidu V202 par un autre beaucoup plus gros, ce dernier pourrait faire un encombrement stérique dans cette région et ainsi empêcher l'appariement des anticorps avec la protéine.

Lors du séquençage des gènes, les mutations désirées ont été observées sauf pour la souche IAF932-T42R. De plus, chez la souche IAF932-R275A, une autre mutation a été observée, en plus de celle attendue, soit la mutation S276W. Malgré ces résultats, les enzymes de ces deux souches ont tout de même été produites et purifiées puisque des erreurs de séquençage auraient pu survenir et que des techniques biochimiques comme la focalisation isoélectrique et la spectrométrie de masse effectuées avec les enzymes purifiées peuvent permettre de vérifier ces observations sous un autre angle.

3.0 PRODUCTION ET PURIFICATION DES ENZYMES

La surproduction des enzymes s'est faite dans un milieu minimal avec du xylose comme source de carbone, et ce, malgré le fait que le promoteur du vecteur c209 ne soit pas réprimé par le glucose car l'utilisation du glucose comme source de carbone fait augmenter la diversité des protéines sécrétées. Si la souche de *S. lividans* employée avait produit des xylanases de manière endogène, le glucose aurait pu permettre de réprimer la production de ces enzymes, mais comme la souche 10-164 ne produit pas de xylanase, le xylose s'avérait une meilleure source de carbone.

Le temps d'incubation des cultures lors de la production des enzymes était de 48 heures puisqu'à ce point il y avait une très bonne production des enzymes désirées sans qu'il n'y ait trop d'impuretés. Pour cette raison, une seule étape de purification était nécessaire afin de se débarrasser de la majorité de ces contaminants. Dans cette situation, le tamis moléculaire était la technique chromatographique de choix puisqu'elle permetait de purifier adéquatement une grande quantité de protéines, tout en ayant une large flexibilité relativement à la phase mobile utilisée. Ceci a donc permis de prendre le même tampon qui est utilisé lors des tests enzymatiques ce qui a évité une étape supplémentaire de dessalage qui aurait pu entraîner une perte d'enzyme.

4.0 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

4.1 Focalisation isoélectrique

Dans tous les cas, le point isoélectrique apparent était plus élevé que le point isoélectrique théorique (Figure 22) ce qui va dans le sens des résultats obtenus par Jodoin, (1999) qui avait observé un point isoélectrique apparent de 7,5 pour la xylanase 10A. Dans le cas de la souche IAF932-T42R, une différence de point isoélectrique par rapport à l'enzyme sauvage était attendue mais n'est pas survenu. Ce résultat vient appuyer, sans toutefois confirmer, le séquençage qui ne montrait pas la mutation désirée dans le gène inséré chez ce clone. Dans le cas de la souche

IAF932-R275A, un changement de point isoélectrique a été observé mais la mutation supplémentaire S276W suggérée pas le séquençage du gène n'a pas pu être confirmée à l'aide de la focalisation isoélectrique puisque le double mutant R275A/S276W aurait en théorie le même point isoélectrique que le simple mutant R275A.

4.2 Spectrométrie de masse

Afin de confirmer que les mutations désirées ont été obtenues, les protéines mutantes purifiées ont été analysées par spectrométrie de masse (Figure 23). Cette expérience a permis de confirmer que la mutation T42R n'a pas eu lieu puisque le pic correspondant à la masse moléculaire de la xylanase 10A de type sauvage a été observé. Pour les mutants V202F et T235G, la différence de 2 Da qui est observée par rapport à la masse moléculaire théorique de ces deux protéines se trouve dans la limite de détection de l'appareil pour ce type d'expérience (F. Lépine, communication personnelle). Par contre, la différence de 7 Da observée pour les mutants D238G et R275A/S276W n'entre pas dans l'erreur expérimentale asociée à l'appareil et la nature de cette différence demeure inconnue. Cependant, ces résultats avec ceux obtenus au séquençage des gènes et lors de la focalisation isoélectrique mènent tout de même à confirmer ces mutations.

Deux facteurs sont impliqués dans le patron d'ions moléculaires observés dans tous les spectres. Tout d'abord le pic qui a environ 96 Da de plus que le premier pic est dû à une molécule de phosphate restée liée à la protéine malgré la dialyse visant à se débarrasser des sels (Chowdhury *et al.*, 1990). Pour expliquer tous les autres pics, il faut avant tout introduire la notion de glycation des protéines. Ce phénomène, couramment rencontré, est une glycosylation non enzymatique des amines libres contenues sur la chaîne latérale des résidus lysines avec des sucres réducteurs (Figure 36) (Ulrich et Cerami, 2001). Lorsque la réaction est terminée, il y a une augmentation de la masse moléculaire de la protéine qui est égale à la masse moléculaire du sucre impliqué dans la réaction moins la masse moléculaire d'une molécule d'eau. Puisqu'au moment de leur production les protéines ont été sécrétées dans un milieu de culture contenant du xylose, des ions moléculaires plus lourds sont attendus avec un incrément d'environ

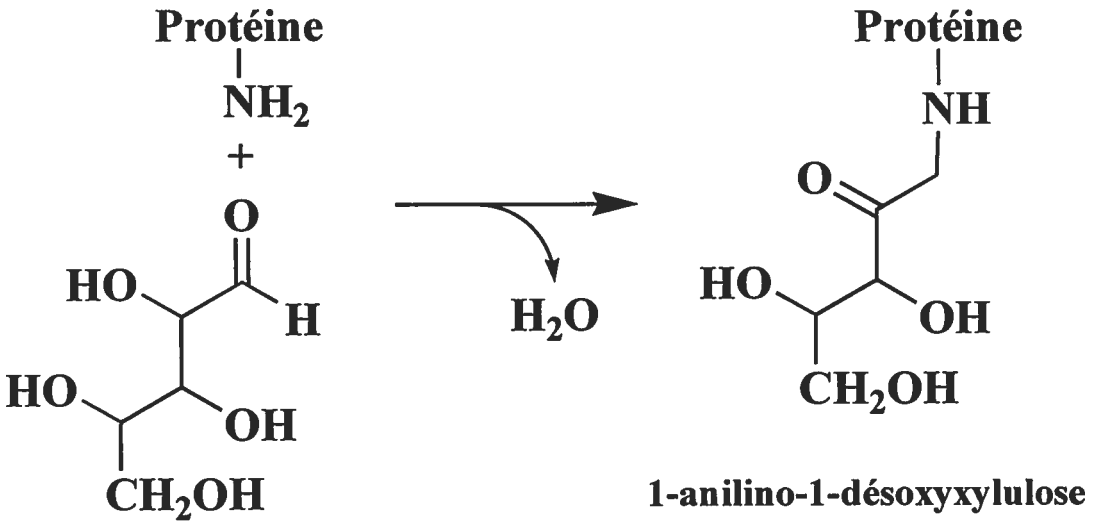


Figure 36 : Réaction de glycation entre un résidu lysine et une molécule de xylose.

132 Da qui dépend du nombre d'événements de glycation survenus au sein de la protéine. Dans les profils de masse moléculaire obtenus, deux profils de pics espacés par des multiples d'environ 131 Da sont en effet observés avec les deux premiers pics comme référence correspondant à la protéine intacte et la protéine liée à une molécule de phosphate.

Bien que la glycation soit grandement favorisée si le groupement imidazole d'une histidine ou si l'amine libre d'une autre lysine se trouve dans un rayon d'environ 5 Å de l'amine libre qui est glycosylée (Acosta *et al.*, 2000), aucune des neuf lysines de la xylanase 10A ne se trouve dans cette situation. Il est par conséquent impossible de prédire quelles lysines sont glycosylée. Une étude plus approfondie sur le sujet serait nécessaire afin de mieux comprendre ce phénomène chez la xylanase 10A.

4.3 Dichroïsme circulaire dans la région des UV éloignés

La spectroscopie par dichroïsme circulaire ressemble à la spectrophotométrie d'absorbance conventionnelle à la différence que la lumière émise est polarisée. Les molécules asymétriques, comme les protéines, n'absorbent pas systématiquement la lumière polarisée gauche et la lumière polarisée droite avec la même intensité (Johnson,

1985). Ceci permet donc, en balayant toute une gamme de longueurs d'onde, de détecter cette différence d'absorption qui dans le cas des protéines est révélatrice de l'arrangement de leurs structures secondaires.

Les courbes de dichroïsme circulaire obtenues dans la région des UV éloignés pour les différents mutants ont la même forme que celle de la xylanase 10A (Figure 24) indiquant que les structures secondaires sont demeurées semblables chez les enzymes mutantes. De plus, les courbes se superposent toutes sauf pour le mutant V202F dont le signal est légèrement moins intense. Par rapport aux résidus aromatiques, trois facteurs peuvent influencer l'intensité du spectre soit l'interaction entre les résidus aromatiques, le nombre de résidus aromatiques ainsi que la rigidité de la protéine (Strickland, 1974). L'influence globale de la mutation V202F peut donc être révélatrice d'une part de l'augmentation de la mobilité des chaînes latérales dans sa région et d'autre part, d'une contribution négative à l'ensemble des contributions produites par les résidus aromatiques déjà présents. De manière naturelle, ce résidu pointe vers l'intérieur hydrophobe de la protéine. Il est donc plausible que l'introduction d'un résidu volumineux perturbe cette région ce qui se traduirait par une augmentation de la mobilité des chaînes latérales environnantes et ainsi par une diminution du signal (Strickland, 1974).

4.4 Dénaturation thermique

Lors des expériences de dénaturation thermique, de grandes variations de T_m sont observées pour les mutants V202F, T235G et D238G (Figure 25). Dans les deux derniers cas, cette baisse de T_m est vraisemblablement due aux liaisons hydrogène disparues suite aux mutations. Pour le mutant V202F, il ne faut pas perdre de vue que le faible taux de sécrétion ainsi que la baisse d'intensité du spectre de dichroïsme circulaire peuvent être dus en partie au désordre local que créerait cette mutation. Ceci impliquerait en effet que cette protéine soit plus sujette à une déstabilisation causée par l'augmentation de la température. Pour sa part, le double mutant R275A/S276W a montré une baisse de T_m de 2,7°C qui peut être attribuable au changement de la charge en surface de la protéine.

4.5 Spectrofluorométrie

Les éléments qui contribuent à la fluorescence des protéines sont essentiellement les tryptophanes suivis, dans une proportion beaucoup plus faible, des tyrosines (Eftink, 1991). Le maximum d'excitation du tryptophane est à 280 nm et, dans l'eau, son maximum d'émission se trouve vers 348-350 nm (Jiskoot *et al.*, 1995). Dans le cas de la tyrosine, son maximum d'excitation se situe à 275 nm et son maximum d'émission est aux alentours de 305-310 nm. Cependant, à leur maximum d'excitation et d'émission respectif, l'intensité de la fluorescence du tryptophane est quatre fois plus élevée. En théorie, pour éviter toute contribution des tyrosines dans la fluorescence intrinsèque des protéines, la longueur d'onde d'excitation devrait être de 295 nm. Cependant, comme les tyrosines contribuent pour une infime partie de la fluorescence globale, les protéines ont été excitée à 285 nm puisqu'à 295 nm l'intensité de la fluorescence devenait trop basse. Par ailleurs, il importait que les expériences se fassent à température constante puisque la fluorescence intrinsèque des protéines est sensible aux variations de température (Eftink, 1991).

Plus un tryptophane se trouve dans un micro-environnement polaire, plus sa longueur d'onde maximale d'émission tendra vers le rouge d'où l'expression « Red shift » lorsque le maximum d'une protéine change pour une longueur d'onde plus élevée (Jiskoot *et al.*, 1995). Le contraire est aussi vrai à savoir que plus le micro-environnement d'un tryptophane est apolaire, plus le maximum de sa longueur d'onde d'émission se trouvera à des longueurs d'ondes plus coutres. Par opposition à un « Red shift », un « Blue shift » est défini comme étant une variation du maximum vers une longueur d'onde plus courte. Dans les protéines contenant plusieurs tryptophanes, la longueur d'onde d'émission maximale est la somme des contributions de tous les tryptophanes qu'elle contient. Lorsqu'une protéine subit une mutation, de tel « Blue shifts » ou « Red shifts » peuvent être observés si le micro-environnement d'un ou de plusieurs tryptophanes est modifié suite à ce changement en acide aminé.

Comme la xylanase 10A de type sauvage contient neuf tryptophanes, il était à prévoir que si des variations dans le maximum d'émission étaient observées, elles seraient minimes puisque des mutations ponctuelles ne sont pas suffisantes pour influencer le micro-environnement d'autant de tryptophanes à la fois. Trois des mutations ont provoqué un « Blue shift » soit les mutations V202F, T235G et D238G (Figure 26). La plus grande différence a été enregistrée par le mutant V202F ce qui peut s'expliquer par l'ajout d'un résidu extrêmement hydrophobe et aromatique qui peut rendre beaucoup plus apolaire le micro-environnement d'un ou de plusieurs tryptophanes. Cependant, il n'y a pas de tryptophane dans un rayon de 10 Å de la phénylalanine en position 202 laissant croire à un effet indirect pour expliquer le « Blue shift » observé. Pour sa part, la thréonine en position 235 est à une distance de 7 à 10 Å du tryptophane en position 266. Comme ce dernier est plutôt en surface de la protéine et qu'un résidu thréonine est polaire mais non chargé, l'effet de la mutation T235G n'est pas très prononcé. Dans le cas de la mutation D238G, c'est le micro-environnement du tryptophane en position 274 qui a été modifié puisque l'oxygène de la chaîne latérale du résidu D238 fait un pont hydrogène avec l'azote du groupement indole de ce tryptophane. De son côté, la double mutation R275A/S276W introduit un nouveau tryptophane à la surface de la protéine, donc en contact avec le solvant. Par conséquent, il est tout à fait logique que ce tryptophane fasse augmenter la longueur d'onde du maximum d'émission.

5.0 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ET PRODUITS D'HYDROLYSE

Étant donné que l'enzyme produite par la souche IAF932-T42R s'est avérée être la xylanase 10A de type sauvage, cette souche a été abandonnée. Par contre, malgré une deuxième mutations non planifiées, les tests enzymatiques et l'analyse des produits d'hydrolyse ont tout de même été effectués sur le double mutant R275A/S276W puisque la protéine était déjà purifiée et que cette mutation supplémentaire avait la possibilité d'apporter des résultats que la littérature n'a pas montrés ou prédits contrairement à la simple mutation R275A initialement désirée. Par ailleurs, il importait d'effectuer les tests enzymatiques, autant pour quantifier l'activité spécifique que pour analyser les produits d'hydrolyse, tout au plus à 40°C puisque les expériences de dénaturation thermique ont

montré que certaines des enzymes commençaient à être dénaturées non loin au delà de cette température (Figure 25).

5.1 Généralités

Parmi toutes les méthodes disponibles pour détecter les sucres réducteurs, celle utilisant l'acide *p*-hydroxybenzoïque hydrazide a été choisie puisqu'elle est l'une des plus sensibles (Lever, 1972). Dans les conditions utilisées ici, elle permetait de détecter des concentrations de l'ordre de 10 µM de sucres réducteurs. Cependant, à concentration égale, tous les sucres ne sont pas détectés avec la même sensibilité. Par exemple, pour une réponse arbitraire du glucose de 100 %, la réponse du mannose est de 98 % et celle du galactose et du xylose est de 62 %. Il était par conséquent primordial de choisir un étalon se rapprochant le plus des sucres réducteurs libérés lors des tests enzymatiques.

La chromatographie à haute performances échangeuses d'anions impliquant une résine pelliculaire et un détecteur à ampérométrie pulsée est la façon la plus précise et la plus sensible pour séparer des sucres (Lee, 1990). Cette méthode repose sur l'observation qu'en milieu alcalin, les groupements hydroxyle des saccharides se déprotonent partiellement ce qui leur confère une charge négative partielle qui est propre à chaque espèce saccharidique. Il est donc possible de les séparer en augmentant graduellement la force ionique du milieu. Par conséquent, de par leurs charges négatives, le carboxyméthylcellulose et ses produits d'hydrolyse n'on pas été injectés dans ce type de système puisqu'ils s'associeraient trop fortement à la résine et il deviendrait presqu'impossible d'en faire leur élution ce qui endommagerait la colonne.

D'autre part, il est à noter que l'analyse des produits d'hydrolyse par chromatographie échangeuse d'anions ne peut faire office de test d'activité. La seule possibilité où la disparition du produit initial et l'apparition de nouveaux produits peuvent être quantifiées est en présence d'oligosaccharides car les polysaccharides ne sont pas constitués d'une seule espèce moléculaire. De plus, même avec des oligosaccharides, la tâche n'est pas simple puisque le phénomène de transglycosylation vient quelque peu compliquer l'analyse. Cependant, la vitesse de dégradation d'un substrat

polysaccharidique peut être comparée entre les enzymes en analysant l'apparition de produits au degré de polymérisation plus petit en fonction du temps. Cependant, ceci n'est que purement qualitatif et nécessite que les enzymes comparées hydrolysent le substrat de la même façon libérant ainsi les mêmes produits dans les mêmes proportions.

5.2 Xylane

Il importait d'abord et avant tout de comparer les mutants à l'enzyme sauvage en ce qui a trait à l'hydrolyse du xylane, substrat naturel des xylanases. Il s'est avéré qu'aucune des protéines mutantes n'a présenté une activité spécifique égale ou supérieure à celle de la xylanase 10A (Tableau 11). De plus, la chromatographie à échange d'anions n'a révélé aucune différence quant aux profil d'élution des produits d'hydrolyse du xylane (Figure 27). Les mutations apportées n'ont donc pas modifié la façon de lier le xylane dans les différents sous-sites puisque cela se serait traduit en une différence au niveau des oligosaccharides apparus ou dans la proportion relative entre ceux-ci.

5.3 Carboxyméthylcellulose, *p*-nitrophénylcellobiose et cellopentaose

Il aurait été intéressant d'étudier l'effet de la présence des groupements hydroxyméthyle en position cinq des unités glucopyranose composant la cellulose sur l'activité spécifique de la xylanase 10A et de ses mutants mais ce substrat est insoluble en solution aqueuse. Le carboxyméthylcellulose (CMC) était le substrat polysaccharidique soluble qui se rapprochait le plus de la cellulose mais les groupements carboxyméthyle qu'il porte sont encore plus volumineux que les groupements hydroxyméthyle que le xylane ne possède pas. Pour sa part, le *p*-nitrophénylcellobiose (*p*-NPG_2) a permis d'étudier l'effet de ces groupements hydoxyméthyles mais uniquement au niveau des sous-sites -1 et -2. Outre pour le mutant V202F, l'activité relative des autres mutants est passablement différente entre le CMC et le *p*-NPG_2 (Tableau 11). Dans le cas des mutants T235G et D238G, l'activité relative est beaucoup plus élevée en présence de CMC ce qui peut être dû à une meilleure liaison des groupements carboxyméthyle au niveau de l'espace laissé vacant par ces mutations. Pour sa part, l'activité relative du

double mutant R275A/S276W est quatre fois supérieure sans les groupements carboxyméthyle qui ont probablement plus de difficulté à se positionner au niveau du sous-site -1 lorsque le tryptophane en position 276 est présent.

D'un autre côté, sans pouvoir quantifier l'activité, l'analyse des produits d'hydrolyse du cellopentaose a donné une bonne idée de la manière dont la cellulose pourrait se faire hydrolysée par les xylanases 10A sauvage et mutantes. À la lumière des résultats observés, il est clair que cet oligosaccharide est hydrolysé via un mode *endo* puisqu'il n'y a pas d'accumulation de glucose propre aux glycosides hydrolases de mode *exo* (Figure 32) (Kulminskaya *et al.*, 2001).

5.4 β-glucan, lichenane, laminarin et laminaripentaose

La présence au sein de la chaîne polysaccharidique de liens $\beta(1\rightarrow3)$ unissant les unités glucopyranose fait chuter drastiquement l'activité spécifique des enzymes étudiées (Tableau 11). Dans le cas de la xylanase 10A de type sauvage, il y a une décroissance de l'activité spécifique avec l'augmentation de la proportion de liens $\beta(1\rightarrow3)$ composant les différents glucans.

Le double mutant R275A/S276W pour sa part montre une activité respectivement 1,7 et 2 fois plus élevée que l'enzyme sauvage contre le β-glucan et le lichenane mais contre le laminarin, son activité est du même ordre que celle de la xylanase 10A (Tableau 11). Par contre, les produits d'hydrolyse restent les mêmes dans tous les cas (Figures 28 à 30) indiquant que les deux enzymes attaquent ces substrats de la même façon. La différence entre les deux polysaccharides aux liens glycosidiques mixtes et le laminarin réside principalement dans la forme globale de la molécule. Alors que le laminarin adopte une structure hélicoïdale régulière, le β-glucan et le lichenane peuvent tous deux être considérés comme des parcelles de cellulose linéaires liées entre elles par des liens $\beta(1\rightarrow3)$ (Figure 8) ce qui augmentent la flexibilité de ces polymères (Roubroeks *et al.*, 2000). Il est possible que malgré la présence de la mutation S276W, la meilleure activité du double mutant envers le β-glucan et le lichenane soit due à la mutation R275A

qui rendrait le résidu W274 plus libre tel que proposé par Andrews *et al.*, (2000). Ceci lui permettrait d'accommoder les groupements hydroxyméthyle des unités glucopyranose unis par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ puisque lorsque le substrat n'est composé que de glucoses unis par des liens $\beta(1\rightarrow3)$, l'activité est du même ordre que celle de l'enzyme sauvage.

Dans le cas du mutant V202F, l'effet contraire est observé à savoir que dans le cas des polysaccharides aux liens mixtes, l'activité spécifique est du même ordre que celle de l'enzyme sauvage mais qu'en présence de laminarin, l'activité est presque deux fois celle de la xylanase 10A (Tableau 11). De plus, la façon d'hydrolyser le β-glucan et le lichenane est différente de celle de l'enzyme sauvage (Figures 28 et 29). En effet, il y a apparition de laminaribiose ainsi que d'un oligosaccharide non identifié. Pour qu'il y ait libération de laminaribiose, il faut que les liens $\beta(1\rightarrow4)$ qui se situent de part et d'autre du lien $\beta(1\rightarrow3)$ soit hydrolysés. Comme la mutation a eu lieu dans la région des sous-sites glycones de l'enzyme, il est probable que le changement d'acide aminé améliore la fixation aux sous-sites -2 et -1 de deux glucoses unis par un lien $\beta(1\rightarrow3)$ faisant en sorte que le lien hydrolysé soit le lien $\beta(1\rightarrow4)$ subséquent à ce lien $\beta(1\rightarrow3)$ (Figure 37a). Cette meilleure liaison aux sous-sites -2 et -1 expliquerait le fait que le mutant V202F ait une activité spécifique plus grande que celle de l'enzyme sauvage en présence de laminarin. Aussi, il est probable que l'oligosaccharide non identifié soit un trisaccharide de glucose dont le lien glycosidique du côté non réducteur est de type $\beta(1\rightarrow4)$ et l'autre de type $\beta(1\rightarrow3)$ (Figure 37b). Comme aucun standard correspondant à cette description n'est disponible commercialement, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée.

En présence de laminarin et de laminaripentaose, la xylanase 10A ainsi que tous les mutants ont montré une accumulation de glucose (Figures 30 et 33) propre aux glycosides hydrolases de mode *exo* (Kulminskaya *et al.*, 2001). Comme les modifications apportées ont eu lieu dans les sous-sites glycones et que même avec l'enzyme sauvage ce phénomène est observé, il est logique de croire que le sous-site +2 de la xylanase 10A soit récalcitrant au positionnement de glucoses liés de façon $\beta(1\rightarrow3)$. Cependant, en présence de laminarin, il y a tout de même apparition d'oligosaccharides puisque l'enzyme avec son site actif à découvert reste fondamentalement de mode *endo*.

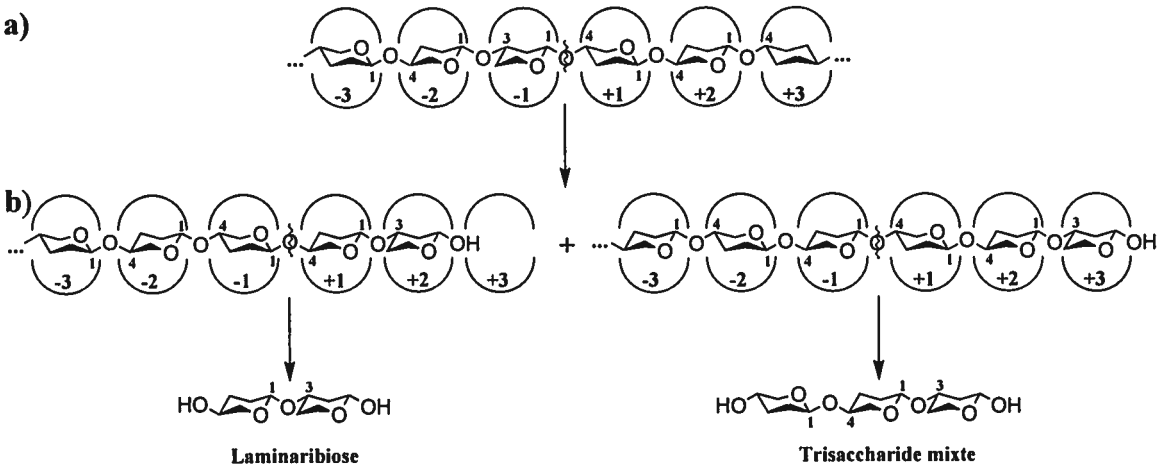


Figure 37 : Hypothèse visant à expliquer l'accumulation de laminaribiose et d'un oligosaccharide non identifié en présence de β-glucan et de lichenane pour le mutant V202F. a) Le substrat se positionne de manière à ce qu'un lien $\beta(1\rightarrow4)$ subséquent à un lien $\beta(1\rightarrow3)$ soit clivé. b) Le saccharide résultant peut entre autres se positionner des deux façons illustrées pour ainsi libérer du laminaribiose et un trisaccharide aux liens glycosidiques mixtes.

Par ailleurs, le phénomène de transglycosylation observé lorsque les différentes enzymes sont incubées en présence de laminaripentaose implique dans tous les cas la formation de liens $\beta(1\rightarrow3)$ puisqu'il y a apparition à tout le moins de laminarihexaose et de laminariheptaose.

5.5 Glucomannane, galactomannane, galactane et amylose

En présence de glucomannane, l'activité spécifique des mutants n'a en aucun cas dépassée celle de la xylanase 10A sauvage (Tableau 11). D'autre part, les produits issus de l'hydrolyse de ce polysaccharide mixte ne peuvent être analysés puisqu'aucun standard oligosaccharidique relié à ce substrat n'est disponible commercialement. Cependant, cela importe peu étant donné que toutes les enzymes ont montré le même patron d'hydrolyse (Figure 31). Pour ce qui est du galactomannane, du galactane et de l'amylose, aucun produit d'hydrolyse n'a été détecté après une incubation prolongée et ce pour toutes les enzymes (Figure 31). Pour cette raison, les valeurs d'activité spécifique en présence de galactomannane et de galactane (Tableau 11), qui sont d'ailleurs très faibles, ne peuvent être prises en considération.

CONCLUSIONS

La classification des glycosides hydrolases selon la similarité de séquence répertorie en familles et en clans des enzymes qui ont le même mécanisme d'action et le même type de repliement protéique. Cependant, la spécificité de substrat des glycosides hydrolases retrouvée dans une famille ou un clan peut être très diversifiée puisque le réglage fin de la spécificité n'est pas dicté par le type de repliement. Le clan GH-A est le plus diversifié tant pour le nombre de séquences répertoriées que pour le nombre de structures disponibles. Par conséquent, il était possible d'utiliser toutes ses structures afin d'émettre des hypothèses relativement à la spécificité de substrat chez les enzymes de ce clan.

Suite à la superposition des structures disponibles du clan GH-A avec la xylanase 10A de *Streptomyces lividans*, 16 positions ont été identifiées comme étant potentiellement impliquées dans la spécificité de substrat et les résidus équivalents chez les autres enzymes ont été répertoriés. Quatre mutants de la xylanase 10A ont été obtenus par mutagenèse dirigée sur le gène de la xylanase 10A pour vérifier si les résidus mutés auraient une incidence sur la spécificité de substrat. Suite à la purification des protéines, une série d'analyses ont été faites afin de bien connaître l'influence biochimique des différentes mutations sur la xylanase 10A.

Les profils de masse moléculaire ont révélés que les enzymes purifiées ont subi en partie une modification post-traductionnelle appelée glycation qui est une réaction non-enzymatique entre l'amine libre d'une lysine et, dans le cas présent, une molécule de xylose. Cette modification survient vraisemblablement durant la production des enzymes puisque ces dernières sont sécrétées dans le milieu de culture qui contient du xylose à titre de source de carbone. Ceci implique que toutes les expériences ont été effectuées avec un mélange de protéines glycosylées et non-glycosylées. L'incidence de cela sur les résultats obtenus est difficile à évaluer exception faite des expériences de dénaturation thermique où dans tous les cas, un seul état de transition est observé ce qui signifie que toutes les espèces protéiques présentes dans le mélange ont le même T_m. Par conséquent, la glycosylation des enzymes ici étudiées n'a pas d'influence sur leur dénaturation thermique.

Contrairement à l'enzyme de type sauvage, la protéine mutante V202F est capable de libérer du laminaribiose lorsqu'incubée en présence de β-glucan et de lichenane. Cette mutation aurait donc induit un changement dans la liaison de l'enzyme avec ces substrats améliorant ainsi la fixation de deux molécules de glucose liées de façon $\beta(1\rightarrow3)$ au niveau des sous-sites -2 et -1. Ceci expliquerait par le fait même l'augmentation de l'activité spécifique de cette protéine mutante par rapport à l'enzyme sauvage en présence de laminarin qui est composé uniquement de molécules de glucose unies par des liens $\beta(1\rightarrow3)$. Une structure du mutant serait l'outil le plus utile pour étudier le changement de conformation de l'enzyme qui a mené aux résultats observés.

La double mutation R275A/S276W a provoqué une amélioration d'activité spécifique en présence de β-glucan et de lichenane mais pas en présence de laminarin. Cette augmentation d'activité est donc due à la présence des glucoses unis par des liens $\beta(1\rightarrow4)$ plutôt que par ceux liés de façon $\beta(1\rightarrow3)$. Comme l'activité spécifique ne peut être évaluée en présence de cellulose, l'effet des glucoses liés uniquement de façon $\beta(1\rightarrow4)$ n'a pas pu être étudié. Il serait intéressant de connaître la contribution des deux mutations R275A et S276W seules sur l'activité spécifique en présence de β-glucan et de lichenane. Il serait alors possible de déterminer si les données recueillies avec le double mutant sont le résultat d'une simple addition de deux effets indépendants ou s'il y a synergie entre les deux résidus mutés permettant l'amélioration de l'activité spécifique.

Les protéines mutantes T235G et D238G n'ont montré aucune augmentation significative d'activité spécifique en présence des différents substrats par rapport à l'enzyme sauvage. Ceci est dû au fait que les deux résidus mutés sont impliqués dans des réseaux de liaisons hydrogène dans la région du site actif de l'enzyme. La baisse d'activité observée est par conséquent due à la disparition de ces ponts hydrogène plutôt qu'à l'introduction de résidus glycine.

Les mutations ont été effectuées en fonction des résidus équivalents chez des enzymes du clan GH-A de spécificité différente. Par rapport à cela, aucun changement de spécificité escompté n'est survenu. La mutation V202F a certes induit une augmentation

d'activité spécifique en présence de laminarin mais ceci n'était pas attendu. En effet, la mutation a été effectuée puisque chez une mannanase de la famille 5 le résidu équivalent à la position V202 de la xylanase 10A de *S. lividans* est une phénylalanine et en présence de galactomannane, il n'y a pas eu augmentation d'activité spécifique. Il peut donc être conclu que cette position est impliquée dans la spécificité de substrat sans toutefois pouvoir affirmer que le changement survenu était celui espéré.

Afin de mieux étudier l'importance des 16 positions potentiellement impliquées dans la spécificité de substrat des glycosides hydrolases du clan GH-A, l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés lors de la mutagenèse dirigée pourrait être envisagée afin de générer une banque de gènes mutants. Aussi, une mutagenèse recombinante aléatoire (*DNA Shuffling*) permettrait de générer une banque de clones dont certains pourraient contenir une xylanase mutante qui aurait une spécificité de substrat modifiée. Dans les deux cas, le nombre de clones à traiter serait trop important pour les étudier un à un. Il faudrait donc une stratégie de criblage où chaque clone serait évalué rapidement pour plus d'un substrat à la fois ce qui permettrait de trouver les mutants dont la spécificité serait modifiée.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche Claude Dupont pour son aide financière mais surtout pour m'avoir confié ce projet qui m'a occupé corps et âme durant deux ans et qui m'a permis d'approfondir mes connaissances en ingénierie des protéines, sujet qui me passionne. Merci aussi à François Shareck pour ses judicieux conseils et pour ses histoires toujours aussi captivantes qu'abracadabrantes. Il me faut également remercier Joanne Turnbull de l'Université Concordia pour l'utilisation de son appareil de dichroïsme circulaire. Je tiens aussi à souligner la contribution de François Lépine pour tout le volet spectrométrie de masse du projet.

Je me dois de remercier plusieurs techniciens sans qui l'apprentissage des procédures aurait été beaucoup plus fastidieux. Tout d'abord, un énorme merci à Lisette Duval et Roger Dubuc qui, de par la générosité de leur temps, leur talent et leur personnalité, ont fait en sorte que mon cheminement à la maîtrise a été empreint de bonne humeur. Je tient également à remercier Liette Biron et Lise Trempe pour m'avoir fait profiter de leur expertise en culture des streptomycètes.

Les études graduées sont particulièrement propices à la naissance de belles amitiés. Merci à Pascal Fex, Patrick St-Pierre, Éric Simard, Dominique Pilote et Nicolas Beaudet, votre joie de vivre est contagieuse. Je remercie particulièrement Patrick et Éric pour les discussions nombreuses qui m'ont permis de mieux comprendre certains de mes résultats les plus nébuleux.

Finalement, mes hommages à Marie-Hélène, Jean-Pierre et Laurent. C'est grâce à leur compréhension, leurs encouragements et surtout leur patience que le travail ici décrit a pu être accompli. Merci!

BIBLIOGRAPHIE

Acosta, J., Hettinga, J., Fluckiger, R., Krumrei, N., Goldfine, A., Angarita, L. et Halperin, J. 2000. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 5450-5455.

Andrews, S. R., Charnock, S. J., Lakey, J. H., Davies, G. J., Claeyssens, M., Nerinckx, W., Underwood, M., Sinnott, M. L., Warren, R. A. et Gilbert, H. J. 2000. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of *Pseudomonas cellulosa* xylanase 10A. J. Biol. Chem. **275**: 23027-23033.

Behe, M. J., Lattman, E. E. et Rose, G. D. 1991. The protein-folding problem: The native fold determines packing, but does packing determine the native fold? Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**: 4195-4199.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. et Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. **28**: 235-242.

Charnock, S. J., Spurway, T. D., Xie, H., Beylot, M. H., Virden, R., Warren, R. A., Hazlewood, G. P. et Gilbert, H. J. 1998. The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved. J. Biol. Chem. **273**: 32187-32199.

Chowdhury, S. K., Katta, V., Beavis, R. C. et Chait, B. T. 1990. Origin and removal of adducts (molecular mass = 98 u) attached to peptide and protein ions in electrospray ionization mass spectra. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **1**: 382-388.

Clarke, A. J. 1997. Chemistry and structure of cellulose and heteroxylan *dans* : Biodegradation of cellulose: enzymology and biotechnology. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster. pp-1-21.

Coutinho, P. M. et Henrissat, B. 1999a. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html

Coutinho, P. M. et Henrissat, B. 1999b. Carbohydrate-Active Enzymes: an integrated database approach *dans*: Recent advances in carbohydrate bioengineering. Gilbert, H. J., Davies, G., Henrissat, B. et Svensson, B. (*Eds*). The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp-3-12.

Davies, G. et Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure. **3**: 853-859.

Day, A. G. et Withers, S. G. 1985. A simple kinetic test to distinguish exo-glucosidase and β-glucosidase activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. **133**: 628-632.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. et Derewenda, Z. S. 1994. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of β-1,4-D-glycanases. J. Biol. Chem. **269**: 20811-20814.

Dominguez, R., Souchon, H., Spinelli, S., Dauter, Z., Wilson, K. S., Chauvaux, S., Beguin, P. et Alzari, P. M. 1995. A common protein fold and similar active site in two distinct families of β-glycanases. Nat. Struct. Biol. **2**: 569-576.

Ducros, V., Charnock, S. J., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dauter, Z., Dupont, C., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. et Davies, G. J. 2000. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Structural and kinetic analysis of the *Streptomyces lividans* xylanase 10A. J. Biol. Chem. **275**: 23020-23026.

Ebanks, R., Dupont, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. et Dupont, C. 2000. Development of an *Escherichia coli* expression system and thermostability screening assay for libraries of mutant xylanase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **25**: 310-314.

Eftink, M. R. 1991. Fluorescence techniques for studying protein structure. Methods Biochem. Anal. **35**: 127-205.

Ege, S. N. 1994. Carbohydrates *dans* : Organic chemistry: structure and reactivity. Third Edition. D. C. Heath and Company, Lexington. pp-1123-1198.

Farr, D. R. et Horisberger, M. 1978. Structure of a β-galactan isolated from the nuclei of *Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys. Acta. **539**: 37-40.

Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. et Mornon, J. P. 1987. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. FEBS Lett. **224**: 149-155.

Gilbert, H. J. et Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. **139**: 187-194.

Gusek, T. W. et Kinsella, J. E. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. Crit. Rev. Microbiol. **18**: 247-260.

Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. **280**: 309-316.

Henrissat, B. et Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. **7**: 637-644.

Higuchi, R. 1990. Recombinant PCR *dans*: PCR Protocols. A guide to methods and applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. et White, T. J. (*Eds*). Academic Press, Inc., San Diego. pp-177-183.

Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P. et Ward, J. M. 1985. Genetic manipulation of streptomyces. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.

Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. et Pease, L. R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene. **77**: 61-68.

Hrmova, M., Garrett, T. P. et Fincher, G. B. 1995. Subsite affinities and disposition of catalytic amino acids in the substrate-binding region of barley 1,3-β-glucanases. Implications in plant-pathogen interactions. J. Biol. Chem. **270**: 14556-14563.

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol. Microbiol. **17**: 367-377.

Imberty, A., Chanzy, H., Perez, S., Buleon, A. et Tran, V. 1988. The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. J. Mol. Biol. **201**: 365-378.

Jane, J. L., Robyt, J. F. et Huang, D. H. 1985. ^{13}C-N.M.R. study of the conformation of helical complexes of amylodextrin and of amylose in solution. Carbohydr. Res. **140**: 21-35.

Jenkins, A. D., Kratochvil, P., Stepto, R. F. T. et Suter, U. W. 1996. Glossary of basic terms in polymer science. Pure Appl. Chem. **68**: 2287-2311.

Jiskoot, W., Hlady, V., Naleway, J. J. et Herron, J. N. 1995. Application of fluorescence spectroscopy for determining the structure and function of proteins. Pharm. Biotechnol. **7**: 1-63.

Jodoin, P. 1999. Stabilisation du domaine catalytique de la xylanase A de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise #565. INRS-Institut Armand-Frappier, 115 p.

Johnson, W. C., Jr. 1985. Circular dichroism and its empirical application to biopolymers. Methods Biochem. Anal. **31**: 61-163.

Jones, K. L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. J. Bacteriol. **57**: 141-145.

Kramer, P., Wincierz, U., Grubler, G., Tschakert, J., Voelter, W. et Mayer, H. 1995. Rational approach to fractionation, isolation, and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica*. Arzneimittelforschung. **45**: 726-731.

Kukuruzinska, M. A. et Lennon, K. 1998. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. **9**: 415-448.

Kulminskaya, A. A., Thomsen, K. K., Shabalin, K. A., Sidorenko, I. A., Eneyskaya, E. V., Savel'ev, A. N. et Neustroev, K. N. 2001. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-β-glucanase from *Trichoderma viride*. Eur. J. Biochem. **268**: 6123-6131.

Kumagai, I., Maenaka, K., Sunada, F., Takeda, S. et Miura, K. 1993. Effects of subsite alterations on substrate-binding mode in the active site of hen egg-white lysozyme. Eur. J. Biochem. **212**: 151-156.

Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 488-492.

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

Laine, R. A. 1994. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the *Isomer Barrier* to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. Glycobiology. **4**: 759-767.

Lee, Y. C. 1990. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. Anal. Biochem. **189**: 151-162.

Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. **47**: 273-279.

Lever, M., Walmsley, T. A., Visser, R. S. et Ryde, S. J. 1984. Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines. Anal. Biochem. **139**: 205-211.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

Ly, H. D. et Withers, S. G. 1999. Mutagenesis of glycosidases. Annu. Rev. Biochem. **68**: 487-522.

McCarter, J. D. et Withers, S. G. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Curr. Opin. Struct. Biol. **4**: 885-892.

McCleary, B. V., Clarke, A. H., Dea, I. C. M. et Rees, D. A. 1985. The fine structures of carob and guar galactomannans. Carbohydr. Res. **139**: 237-260.

Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene. **49**: 323-329.

Moreau, A., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1994. Alteration of the cleavage mode and of the transglycosylation reactions of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-directed mutagenesis of the Asn173 residue. Eur. J. Biochem. **219**: 261-266.

Moss, G. P. 2002. Enzyme Nomenclature: http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/

Nakatani, H. 2001. Analysis of glycosidase-catalyzed transglycosylation reaction using probabilistic model. Arch. Biochem. Biophys. **385**: 387-391.

Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R. A., Withers, S. G. et Rose, D. R. 1998. Exploring the cellulose/xylan specificity of the β-1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. Biochemistry. **37**: 4751-4758.

Poteete, A. R. et Hardy, L. W. 1994. Genetic analysis of bacteriophage T4 lysozyme structure and function. J. Bacteriol. **176**: 6783-6788.

Read, S. M., Currie, G. et Bacic, A. 1996. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. Carbohydr. Res. **281**: 187-201.

Roberge, M., Dupont, C., Morosoli, R., Shareck, F. et Kluepfel, D. 1997a. Asparagine-127 of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a key residue in glycosyl hydrolases of superfamily 4/7: kinetic evidence for its involvement in stabilization of the catalytic intermediate. Protein Eng. **10**: 399-403.

Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. et Dupont, C. 1997b. Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase. Biochemistry. **36**: 7769-7775.

Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. et Dupont, C. 1998. Site-directed mutagenesis study of a conserved residue in family 10 glycanases: histidine 86 of xylanase A from *Streptomyces lividans*. Protein Eng. **11**: 399-404.

Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. et Dupont, C. 1999. Characterization of active-site aromatic residues in xylanase A from *Streptomyces lividans*. Protein Eng. **12**: 251-257.

Roubroeks, J. P., Mastromauro, D. I., Andersson, R., Christensen, B. E. et Aman, P. 2000. Molecular weight, structure, and shape of oat (1→3),(1→4)-β-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with lichenase. Biomacromolecules. **1**: 584-591.

Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.

Schmidt, A., GM, G. b. et Kratky, C. 1999. Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. Biochemistry. **38**: 2403-2412.

Strickland, E. H. 1974. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. CRC Crit. Rev. Biochem. **2**: 113-175.

Ulrich, P. et Cerami, A. 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. Recent Prog. Horm. Res. **56**: 1-21.

Voet, D. et Voet, J. G. 1995. Sugars and polysaccharides *dans* : Biochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp-251-276.

Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. et Fersht, A. R. 1993. Circular dichroism studies of barnase and its mutants: characterization of the contribution of aromatic side chains. Biochemistry. **32**: 10303-10313.

White, A., Withers, S. G., Gilkes, N. R. et Rose, D. R. 1994. Crystal structure of the catalytic domain of the β-1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi*. Biochemistry. **33**: 12546-12552.

Wierenga, R. K. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. FEBS Lett. **492**: 193-198.

Worthington, M. T., Luo, R. Q. et Pelo, J. 2001. Copacabana method for spreading *E. coli* and yeast colonies. Biotechniques. **30**: 738-740, 742.

Yui, T., Ogawa, K. et Sarko, A. 1992. Molecular and crystal structure of konjac glucomannan in the mannan II polymorphic form. Carbohydr. Res. **229**: 41-55.

Zeller, S. G., Griesgraber, G. W. et Gray, G. R. 1991. Analysis of positions of substitution of *O*-carboxymethyl groups in partially *O*-carboxymethylated cellulose by the reductive-cleavage method. Carbohydr. Res. **211**: 41-45.

ANNEXES

Annexe A

Particularité des codes PDB associés aux enzymes du clan GH-A

Famille	Organisme	Enzyme	PDB	Résolution (Å)	Caractéristiques
1	*Bacillus circulans (alkalophilus)*	β-glucosidase (BglA)	1QOX	2,70	Native
1	*Bacillus polymyxa*	β-glucosidase A	1BGA	2,40	Native
			1BGG	2,30	GCO
			1E4I	2,00	G2F, NFG
			1TR1	2,20	GOL
1	*Lactococcus lactis Z268*	6-P-β-galactosidase	1PBG	2,30	SO4
			2PBG	2,50	SO4
			3PBG	2,70	SO4
			4PBG	2,50	BGP
1	*Sinapis alba*	Myrosinase	1DWA	2,00	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1DWF	2,00	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1DWG	2,00	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1DWH	2,00	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1DWI	2,00	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1DWJ	2,40	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E4M	1,20	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E6Q	1,35	FUC, GOL, MAN, NAG, NTZ, SO4, XYS, ZN
			1E6S	1,35	FUC, GOL, GOX, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E6X	1,60	FUC, GOL, LGC, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E70	1,65	FUC, G2F, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E71	1,50	ASC, FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E72	1,60	ASC, FUC, GOL, GOX, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			1E73	1,50	ASC, FUC, G2F, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS
			1MYR	1,64	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
			2MYR	1,60	FUC, GOL, MAN, NAG, SO4, XYS, ZN
1	*Sulfolobus solfataricus P2*	β-galactosidase S (LacS)	1GOW	2,60	Native
1	*Thermosphaera aggregans*	β-glycosidase	1QVB	2,40	Native
1	*Trifolium repens*	β-glucosidase 2 (cyanogenic)	1CBG	2,15	Native
1	*Zea mays*	β-glucosidase 1	1E1E	2,50	Native
			1E1F	2,60	PSG
			1E4L	2,20	Mutation E191D; GOL
			1E4N	2,10	Mutation E191D; HBO
			1E55	2,00	Mutation E191D; DHR, GLC
			1E56	2,10	Mutation E191D; GLC, HBO

Famille	Organisme	Enzyme	PDB	Résolution (Å)	Caractéristiques
2	*Escherichia coli K12 / MG1655*	β-galactosidase Z	1BGL	2,50	MG
			1BGM	2,50	MG
			1DP0	1,70	DMS, MG, NA
			1F49	2,50	CME, MG
			1F4A	2,80	MG
			1F4H	2,80	MG
			1GHO	2,50	CME, MG
			1HN1	3,00	MG, NA
			1JYN	1,80	Mutation E537Q; DMS, LAT, MG, NA
			1JYV	1,75	Mutation E537Q; DMS, MG, NA
			1JYW	1,55	Mutation E537Q; DMS, MG, NA
			1JYX	1,75	DMS, IPT, MG, NA
			1JYY	2,70	2FL, CME, MG, NA
			1JYZ	2,70	2FL, CME, MG, NA
			1JZ0	2,60	2FG, CME, MG, NA
			1JZ1	2,60	2FG, CME, MG, NA
			1JZ2	2,10	2FG, DMS, MG, NA
			1JZ3	1,75	2DG, DMS, MG, NA
			1JZ4	2,10	2DG, DMS, MG, NA
			1JZ5	1,80	DMS, MG, NA
			1JZ6	2,10	DMS, GTZ, MG, NA
			1JZ7	1,50	CEA, DMS, GAL, MG, NA
			1JZ8	1,50	Mutation E537Q; DMS, LAK, MG, NA
2	*Homo sapiens*	β-glucuronidase	1BHG	2,60	MAN, NAG
5	*Acidothermus cellulolyticus*	Endo-1,4-glucanase	1C0D	2,40	Native
			1ECE	2,40	GLC
5	*Bacillus agaradherans*	Endo-1,4-glucanase Cel5A	1A3H	1,57	Native
			2A3H	2,00	CTR
			3A3H	1,64	CTR
			4A3H	1,65	DBC
			5A3H	1,82	FFC
			6A3H	1,68	FCT, GOL
			7A3H	0,95	EOH, GOL
			8A3H	0,97	ACT, GOL, IDC, SO4
			1E5J	1,85	AMG, CA, GLC, SGC
			1H5V	1,10	CA, GLC, MA3, NA, SGC
			1HF5	1,10	FCT, GOL, SO4
			1HF6	1,15	ACY, CT3, GOL, SO4
			1HF7	1,10	DCB, G2F, GLC, GOL, SO4
			1QHZ	1,95	CA

Famille	Organisme	Enzyme	PDB	Résolution (Å)	Caractéristiques
			1QI0	2,10	CA, CBI
			1QI2	1,75	CA, FCT
5	*Bacillus sp. KSM-635*	Endo-1,4-glucanase	1G01	1,90	ACY, CD
			1G0C	1,90	ACY, CBI, CD
5	*Candida albicans*	Exo-1,3-glucanase	1CZ1	1,85	Native
			1EQC	1,85	CTS
			1EQP	1,90	Native
5	*Clostridium cellulolyticium*	Endo-1,4-glucanase A	1EDG	1,60	Native
5	*Clostridium thermocellum NCIB 10682*	Endo-1,4-glucanase (CelC)	1CEC	2,15	Native
			1CEN	2,30	GLC
			1CEO	1,90	Mutation E140Q
5	*Erwinia chrysanthemi 3937*	Endo-1,4-glucanase Z	1EGZ	2.30	CA
5	*Thermobifida fusca* *(Thermomonospora fusca)*	β-mannanase	1BQC	1,50	Native
			2MAN	1,90	MAN
			3MAN	1,60	MAN
5	*Trichoderma reesei* *(Hypocrea jecorina)*	β-mannanase	1QNO	2,00	NAG, TRS
			1QNP	1,50	GOL, NAG, SO4
			1QNQ	1,65	NAG, SO4, TPT
			1QNR	1,40	GOL, MAB, NAG, SO4
			1QNS	1,50	GOL, NAG, SO4, TRS
10	*Cellulomonas fimi*	Xylanase (CEX) Xyn10A	1EXP	1,80	G2F, GLC
			1FH7	1,82	XDN, XYS
			1FH8	1,95	XIF, XYS
			1FH9	1,72	LOX, XYS
			1FHD	1,90	XIM, XYS
			2EXO	1,80	Native
			2HIS	1,80	GLC
			2XYL	1,90	X2F, XYS
10	*Clostridium thermocellum NCIB 10682*	Xylanase Z / feruloyl esterase	1XYZ	1,40	Native
10	*Geobacillus stearothermophilus T-6*	Xylanase T-6	1HIZ	2,40	GLC, SO4
10	*Penicillium simplicissimum*	Xylanase A	1B30	2,25	PCA, XYS
			1B31	1,75	PCA
			1B3V	2,40	PCA, XYS
			1B3W	2,60	PCA, XYS
			1B3X	2,20	PCA, XYS
			1B3Y	2,45	PCA, XYS
			1B3Z	2,30	PCA, XYS
			1BG4	1,75	GOL, NA, PCA, TRS

Famille	Organisme	Enzyme	PDB	Résolution (Å)	Caractéristiques
10	*Pseudomonas fluorescens (cellulosa)*	Xylanase 10A	1CLX	1,80	CA
			1E5N	3,20	Mutation E246C; CA, XYS
			1XYS	2,50	Mutation E246C; CA
10	*Streptomyces lividans*	Xylanase 10A	1E0V	1,70	FFC
			1E0W	1,20	Native
			1E0X	1,65	GOL, X2F, XYS
			1XAS	2,60	Native
10	*Streptomyces olivaceoviridis E-86*	β-1,4-xylanase	1ISV	2,10	XYS
			1ISW	2,10	XYS
			1ISX	2,10	XYS
			1ISY	2,10	GLC
			1ISZ	2,00	GAL
			1IT0	2,00	LAT
			1XYF	1,90	Native
10	*Thermoascus aurantiacus*	Xylanase	1FXM	1,14	Native
			1GOK	1,14	PCA
			1GOM	1,92	PCA
			1GOO	1,87	GOL, PCA
			1GOQ	1,80	PCA, XYP
			1GOR	1,70	PCA, XYP, XYS
			1TAX	1,14	Native
			1TIX	1,92	Native
			1TUX	1,80	Native
17	*Hordeum vulgare*	Endo-β-1,3-glucanase GII	1GHS	2,30	Native
17	*Hordeum vulgare*	Lichenase	1GHR	2,20	Native
			1AQ0	2,00	ACT, NAG
26	*Pseudomonas fluorescens (cellulosa)*	β-mannanase	1J9Y	1,85	ZN

(abréviations page suivante)

Abréviation	Groupement hétérogène
2DG	2-désoxygalactose
2FG	2-fluorogalactose
2FL	2-fluorolactose
ACT	Ions acetate
ACY	Acide acétique
AMG	α-méthyle-D-galactoside
ASC	Acide ascorbique
BGP	β-galactose-6-phosphate
CA	Ions calcium
CBI	Cellobiose
CD	Ions Cadmium
CEA	S-hydroxycystéine
CME	S,S-(2-hydroxyéthyle) thiocystéine
CT3	Cellotriose
CT4	Cellotétrose
CTR	Cellotriose
CTS	Castanospermine
DCB	2,4-dinitrophényl-2-désoxy-2-fluoro-β-D-cellobiose
DHR	(2S)-hydroxy (4-hydroxyphényle) éthanenitrile
DMS	Diméthyle sulfoxide
EOH	Éthanol
FCT	Fluorocellotriose
FFC	2-fluoro-β-D-cellobioside
FFT	2-fluoro-β-D-cellotrioside
FUC	Fucose
G2F	2-fluoroglucose
GAL	D-galactopyranose
GCO	Acide glucuronique
GLC	D-glucopyranose
GOL	Glycérol
GOX	D-gluconhydroximo-1,5-lactam
GTZ	Galactotétrazole

Abréviation	Groupement hétérogène
HBO	2,4-dihydroxy-7-(méthyloxy)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
IDC	Dérivé imidazole du cellobiose
IPT	1-isopropyl-β-D-thiogalactoside
LAK	Allolactose
LAT	Lactose
LGC	Gluconolactone
LOX	Dérivé lactam oxime du xylose
MA3	*O*1-méthyl-4-thio-α-D-glucose
MAB	Mannobiose
MAN	α-D-mannopyranose
MG	Ions magnésium
MSE	Sélénométhionine
NA	Ions sodium
NAG	N-acétyl-D-glucosamine
NFG	2,4-dinitrophényl-2-désoxy-2-fluoro-β-D-allopyranose
NTZ	Nojirimycine tétrazole
PCA	Acide pyroglutamique
PSG	*p*-nitrophényl-1-thio-β-D-glucopyranose
SCG	4-thio-β-D-glucopyranose
SGC	4-thio-β-D-glucopyranose
SO4	Ions sulfate
TPT	2,2':6',2"-terpyridine de platine (II)
TRS	Tris
X2F	2-fluoroxylose
XDN	Dérivé 1-désoxy-nojirimycine du xylose
XIF	Dérivé isofagomine du xylose
XIM	Dérivé imidazole du xylose
XYP	D-xylopyranose
XYS	D-xylopyranose
ZN	Ions zinc

Mise à jour : 19 juin 2002

Annexe B

Produits chimiques utilisés au cours de cette études

2'-Désoxyadénine-5'-triphosphate : dATP (Roche)
2'-Désoxycytosine-5'-triphosphate : dCTP (Roche)
2'-Désoxyguanine-5'-triphosphate : dGTP (Roche)
2'-Désoxythimidine-5'-triphosphate : dTTP (Roche)
2-mercaptoéthanol : (Bio-Rad)
3',3",5',5"-tétrabromophénolsulfonephtaléine : Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
8-hydroxyquinoline (Sigma)
Acétate de sodium (J. T. Baker)
Acide acétique glacial (Fischer Scientific)
Acide borique (Pharmacia Biotech)
Acide éthylènediaminetétraacétique : EDTA (BDH)
Acide *N*-tris[hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthanesulfonique : TES (Sigma)
Acide *p*-hydroxybenzoïque hydrazide : PAHBAH (Sigma)
Acide trichloroacétique (BDH)
Acrylamide (Boehringer Mannheim)
Adénosine triphosphate : ATP (Pharmacia LKB)
Agar (Difco)
Agarose (Pharmacia Biotech)
Amidon (Sigma)
Azoture de sodium (Fischer Scientific)
β-glucan d'avoine (Megazyme)
Bleu brillant de Coomassie (Bio-Rad)
Bromure d'éthidium (Bio-Rad)
Carbonate de sodium (Sigma)
Carboxyméthylcellulose de faible viscosité sous forme de sel de sodium (Sigma)
Casamino acid (Difco)
Cellobiose (BDH)
Cellohexaose (Merck)
Cellopentaose (Merck)
Cellotétraose (Merck)
Cellotriose (Calbiochem)
Chloroforme (Fischer Scientific)
Chlorure de calcium (Sigma)
Chlorure de cobalt (J. T. Baker)
Chlorure de cuivre (Fischer Scientific)
Chlorure de fer (Fischer Scientific)
Chlorure de sodium (Sigma)
Chlorure de zinc (Fischer Scientific)
Clorure de magnésium (BDH)
Clorure de manganèse (J. T. Baker)
Diméthylsulfoxide : DMSO (Sigma)
Dodécylsulfate de sodium : SDS (Boehringer Mannheim)

Éthanol (BDH)
Extrait de bœuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Ficoll type 400 (Sigma)
Galactane de patate (Megazyme)
Galactomannane de caroubier de faible viscosité (Megazyme)
Galactose (Difco)
Gélatine (Bio-Rad)
Gentiobiose (Serva)
Glucomannane de konjac (Megazyme)
Glucose (Sigma)
Glycérol (BDH)
Glycine (ICN)
Hydrochlorure de tris hydroxyméthyle aminométhane : Tris-HCl (Fischer Scientific)
Hydroxyde de sodium (J. T. Baker)
Lait écrémé déshydraté (Difco)
Laminaribiose (V-Labs)
Lamínariheptaose (V-Labs)
Laminarihexaose (V-Labs)
Laminarin de *Laminaria digitata* (Sigma)
Laminaripentaose (V-Labs)
Laminaritétraose (V-Labs)
Laminaritriose (V-Labs)
Lichenane de mousse islandaise (Megazyme)
L-proline (Sigma)
Maltose (Difco)
Mannose (Sigma)
Méthanol (OmniSolv)
Méthionine (Sigma)
N,*N*,*N*',*N*'-tétraméthyléthylènediamine : TEMED (Sigma)
N,*N*'-méthylène-bis acrylamide : Bis acrylamide (BDH)
Nitro Blue Tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-chloro-indolyl phosphate toluidine salt : NBT/BCIP (Boerhinger Mannheim)
NZ-amine A (Sheffields Products)
Persulfate d'amonium : APS (Bio-Rad)
Phénol (BDH)
Phosphate de potassium dibasique (Fischer Scientific)
Phosphate de potassium monobasique (J. T. Baker)
Phosphate de sodium dibasique (Fluka)
Phosphate de sodium monobasique (Fluka)
p-Nitrophénol (Sigma)
p-Nitrophénylcellobiose : *p*-NPG_2 (Sigma)
Polyéthylène glycol 1 000 (Sigma)
Propionamide (Aldrich Chemical Co)
Réactif de Folin (ICN)
Saccharose (Fischer Scientific)

Sulfate d'ammonium (Fischer Scientific)
Sulfate de cuivre (J. T. Baker)
Sulfate de fer (J. T. Baker)
Sulfate de magnésium (J. T. Baker)
Sulfate de manganèse (J. T. Baker)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de zinc (J. T. Baker)
Tartrate de potassium et de sodium (BDH)
Tétraborate de sodium (J. T. Baker)
Thiostrepton (Sigma)
Tris hydroxyméthyle aminométhane : Tris (Fischer Scientific)
Tryptone de soja : TSB (Difco)
Tween 20 (BDH)
Tween 80 (Aldrich Chemical Co)
Tyrosine (Gibco BRL)
Xylane de bouleau (Sigma)
Xylène cyanol (Bio-Rad)
Xylobiose (Megazyme)
Xylohexaose (Megazyme)
Xylopentaose (Megazyme)
Xylose (Sigma)
Xylotétraose (Megazyme)
Xylotriose (Megazyme)

Annexe C

Milieu de régénérescence R5 (Hopwood *et al.*, 1985)

Agar	22,0 g
Casamino acid	100 mg
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	10,0 g
K_2SO_4	250 mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10,12 g
Saccharose	103,0 g
TES	5,73 g
Solution s'éléments de trace	2,0 mL

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver à 95 kPa et 121°C pendant 15 min

Ajouter stérilement :

KH_2PO_4 36,7 mM	10,0 mL
$CaCl_2$ 5 M	4,0 mL
L-proline 1,74 M	15,0 mL
CuSO4 31,3 mM	1,0 mL
Méthionine 67,0 mM	10,0 mL
Tyrosine 2,2 M dans du NaOH 1 M	5,0 mL

Répartir environ 25 mL par plat de Pétri et laisser déshydrater à la température de la pièce jusqu'à 85 % de la masse originale (environ 5 jours)

Solution d'éléments de trace

$ZnCl_2$	40 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	200 mg
$CuCl_3 \cdot 2H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 mg
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	10 mg

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Annexe D

Milieu de sporulation Bennett-thio (Jones, 1949)

Extrait de levure	1,0 g
Extrait de bœuf	1,0 g
NZ-amine A	2,0 g
Maltose	10,0 g

Ajuster le pH à 7,3 et compléter à 500 mL d'eau distillée

Ajouter à une solution de 20,0 g d'agar fondu dans 500 mL d'eau distillé

Autoclaver à 95 kPa et 121°C pendant 15 min

Laisser refroidir jusqu'à environ 55°C

Ajouter stérilement 1 mL d'une solution de thiostrepton 30 mM dissout dans du DMSO

Répartir environ 25 mL par plat de Pétri

Annexe E

Milieu de pré-culture TSB

Tryptone de soja (TSB) 27,5 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver à 95 kPa et 121°C pendant 15 min

Annexe F
Milieu minimal M14

K_2HPO_4	5,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,4 g
Tween 80	2,0 mL
Solution de sels de Mandels	1,0 mL

Ajuster le pH à 7,4 et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver à 95 kPa et 121°C pendant 15 min

Ajouter stérilement :

$MgSO_4$ 0,42 M	6,0 mL
$CaCl_2$ 0,27 M	10,0 mL

Sels de Mandels

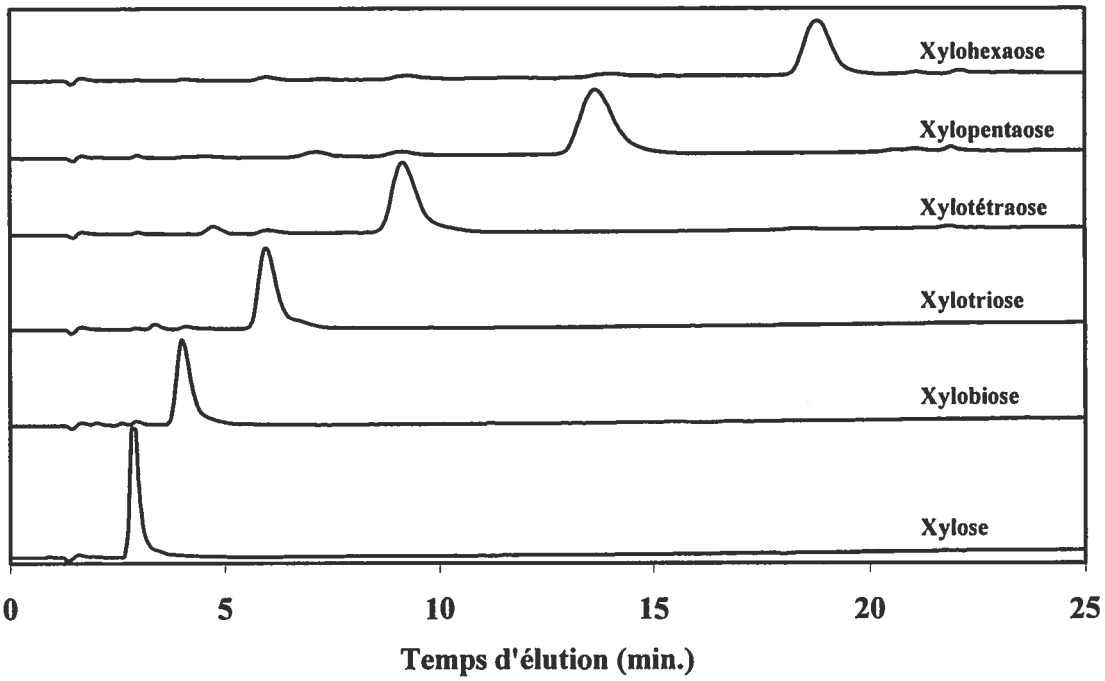
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	140 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	160 mg
$FeSO_4 \cdot H_2O$	500 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200 mg

Compléter à 10 mL avec de l'eau distillée

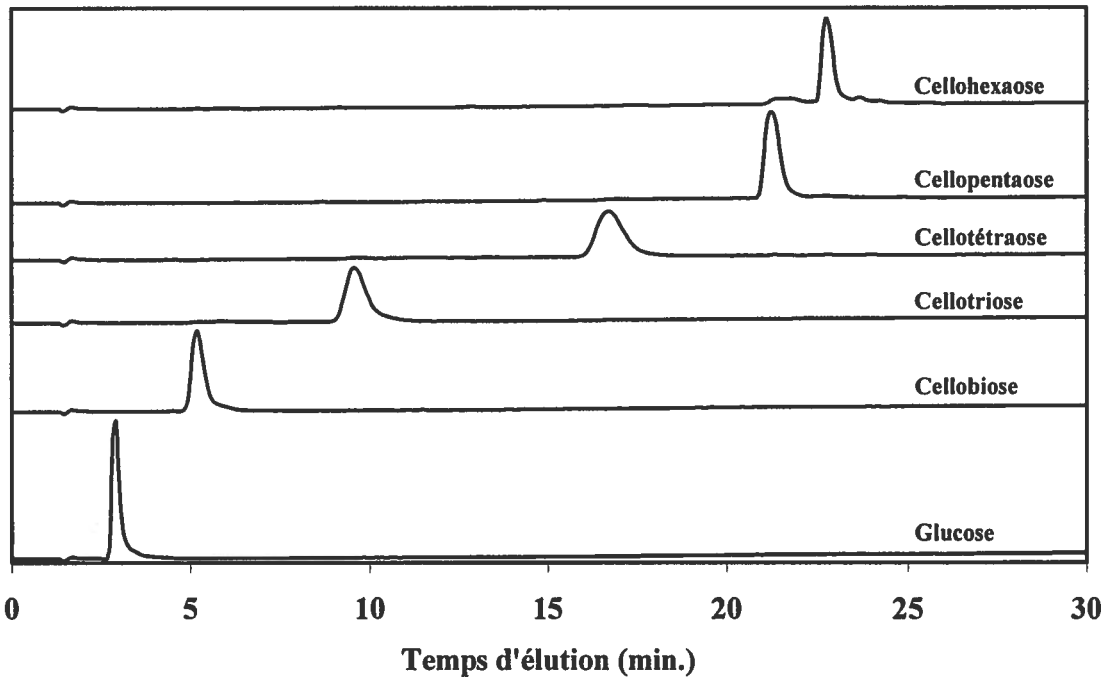
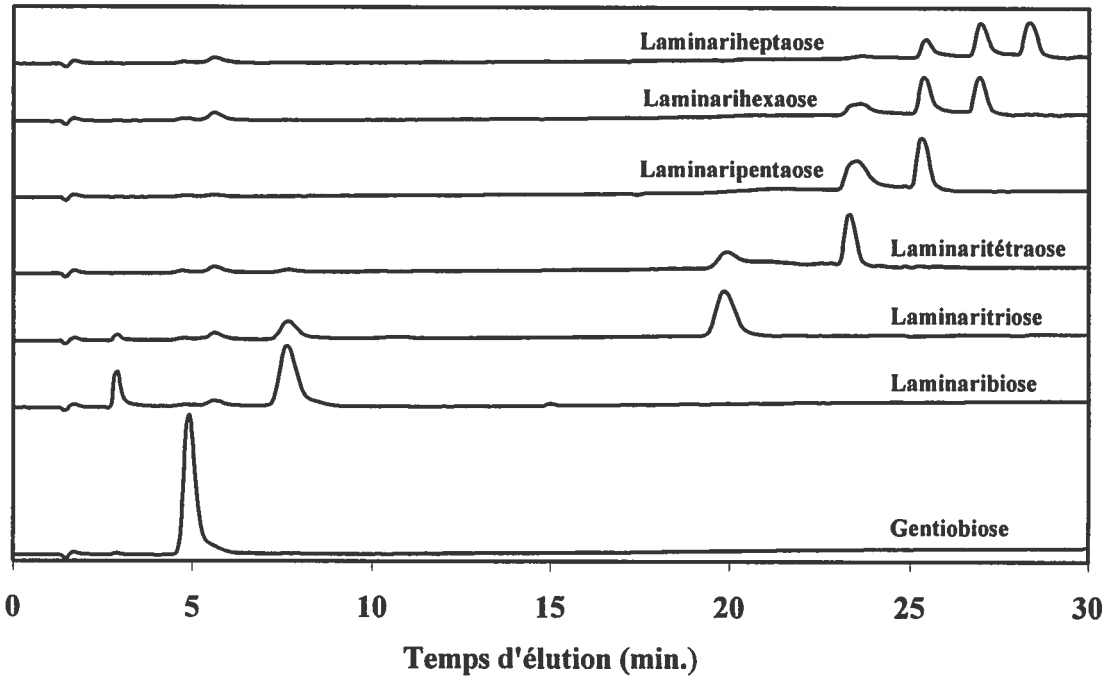
Annexe G

Profil d'élution des saccharides utilisés pour l'identification des pics lors de l'analyse des produits d'hydrolyse de certains substrats

Xylose et xylo-oligosaccharides



Glucose et cello-oligosaccharides



Gentiobiose et laminari-oligosaccharides