

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier Microbiologie et biotechnologie

Évaluation des glycosyles hydrolases de *Streptomyces lividans* pour la production d'oligosaccharides par glycosynthèse

Par

Pascal Fex

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

Jury d'évaluation

Directeur de recherche	Claude Dupont, INRS-Institut Armand Frappier Microbiologie et biotechnologie
Codirecteur de recherche	François Lépine, INRS-Institut Armand Frappier Microbiologie et biotechnologie
Examineur interne	Claire Simard, INRS-Institut Armand Frappier Microbiologie et biotechnologie
Examineur externe	Hermann Dugas, Université de Montréal Département de chimie

RÉSUMÉ

Des méthodes efficaces de synthèses d'oligosaccharides ne sont pas disponibles malgré l'importance de cette classe de biomolécules au niveau de plusieurs processus biologiques et en tant qu'agents thérapeutiques. En effet, les méthodes chimiques et enzymatiques via les glycosyltransférases et les glycosidases par le mode de transglycosylation ont été exploitées mais se sont avérées non efficaces pour une production à grande échelle.

Dernièrement, une nouvelle méthode mettant à profit l'utilisation de glycosidases de rétention spécifiquement mutées a été élaborée et semble prometteuse. En effet, parmi les deux résidus d'acide aminé du site actif responsables de l'activité d'hydrolyse (Glu ou Asp), la substitution par une alanine du résidu nucléophile a pour effet d'inactiver l'activité glycosidique de l'enzyme et du même coup rend possible la synthèse d'oligosaccharides. En conjonction avec un sucre donneur activé de configuration anomérique opposé au substrat normal et en présence d'un sucre accepteur approprié, l'enzyme mutée peut efficacement effectuer la synthèse d'oligosaccharides. D'excellents rendements de synthèse ont été obtenus (> 90%) pour l'enzyme mutée β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium* (Mackenzie *et al.*, 1998) et l'enzyme mutée 1,3-1,4- β -glucanase de *Bacillus licheniformis* (Malet et Planas, 1998).

Streptomyces lividans est une bactérie qui produit des glycosidases de rétention dont entre autres les xylanases A, B et C. L'objectif général du projet est de muter spécifiquement ces glycosyles hydrolases et d'évaluer leur capacité à synthétiser des oligosaccharides par cette réaction appelée glycosynthèse. Le résidu catalytique nucléophile des enzymes a donc été substitué par une alanine à l'aide de la mutagenèse dirigée par PCR. Suite à leur production et leur purification, l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées a été déterminée. Cependant, les résultats ont démontré que chacune des enzymes mutées possèdent une activité résiduelle d'hydrolyse. L'enzyme mutée XlnA₂-E236A a présenté l'activité résiduelle d'hydrolyse la plus faible avec une valeur moyenne de 0,02% lorsque comparé à l'enzyme sauvage correspondante. De son côté, l'enzyme mutée XlnC-E85A a démontré une valeur moyenne d'activité résiduelle

d'hydrolyse de 0,20%. Quant à l'enzyme mutée XlnB₂-E87A, des valeurs beaucoup plus élevées s'élevant jusqu'à 11,9% ont été obtenues.

Non disponible commercialement, le sucre donneur activé nécessaire à la réaction de glycosynthèse a par ailleurs été synthétisé. Parmi les nombreuses synthèses effectuées, seulement deux ont menées au sucre donneur activé 1-fluoroxylbiose. Des rendements très faibles, soit de 1,1% et 1,3%, ont cependant été obtenus. La première synthèse a fournit le sucre donneur fluoré sous une forme brute tandis qu'une forme pure a été obtenue lors de la seconde synthèse. Une première série de tests de glycosynthèse des enzymes mutées a été effectuée avec le sucre donneur fluoré sous forme brute et différents sucres accepteurs. Seules les enzymes mutées XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A lorsque mises en présence du sucre donneur fluoré et du sucre accepteur xylotriose ont démontré, mais à un niveau très faible, un phénomène de synthèse. Par contre, ces résultats n'ont pu être reproduits lors de la seconde série de tests de glycosynthèse avec le sucre donneur fluoré sous forme pure.



Étudiant



Directeur de recherche



Codirecteur de recherche

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Claude Dupont, qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire et ainsi donné la chance de goûter aux plaisirs de la recherche. Également, je voudrais remercier mon codirecteur de recherche, François Lépine, et le professeur François Shareck pour leurs conseils fournis lors de ce projet. Un remerciement est aussi porté envers le professeur Alain Fournier pour sa collaboration lors de la fluoration des sucres.

Je voudrais également remercier Lisette Duval pour son aide en purification, sa grande écoute et son agréable compagnie en laboratoire ainsi que Roger (le sage) Dubuc pour ses conseils tant au niveau sciences que dans tout autre domaine imaginable. Par ailleurs, une attention particulière est portée envers Christine Jacques pour ses nombreux conseils, son oreille attentive et sa personnalité vivante de tous les jours qui a su illuminer ce laboratoire situé au sous-sol. Une attention particulière est aussi portée envers Patrick St-Pierre pour ses milles et un conseils, son extrême générosité et cet énorme plaisir d'avoir travaillé en sa compagnie. Je voudrais également remercier Nabil Masri pour les nombreuses discussions et le bon temps passé en sa présence. Enfin, je tiens aussi à remercier Sylvain Milot pour sa précieuse aide en chimie organique.

Finalement, je voudrais remercier les responsables du programme de microbiologie et biotechnologie qui, en m'accordant deux sessions de prolongation, m'ont permis, en plus de terminer mon projet de maîtrise, de rencontrer cette belle passionnée de la vie avec qui je partage mon quotidien aujourd'hui.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1 GÉNÉRALITÉS	2
1.2 CARACTÉRISTIQUES PARTICULIÈRES DES POLYSACCHARIDES.....	2
1.3 RÔLES BIOLOGIQUES DES OLIGOSACCHARIDES	3
1.4 OLIGOSACCHARIDES ET LEUR UTILISATION THÉRAPEUTIQUE	5
1.4.1 Inhibition d'adhésines microbiennes	6
1.4.2 Inhibition de toxines microbiennes	6
1.4.3 Inhibiteurs de sélectines	8
1.4.4 Vaccins contre certains cancers.....	8
1.4.5 Anticorps naturels : Xénotransplantation	9
1.5 SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES	10
1.5.1 Synthèse chimique.....	10
1.5.2 Synthèse enzymatique	12
1.5.2.1 Glycosyltransférases.....	12
1.5.2.2 Glycosidases	13
1.6 SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES : GLYCOSIDASES DE RÉTENTION	
SPÉCIFIQUEMENT MUTÉES	18
1.6.1 Glycosynthèse	18
1.6.2 Exo-glycosidase de rétention ; E358A β -glucosidase/galactosidase d' <i>Agrobacterium</i>	20
1.6.3 Endo-glycosidase de rétention.....	23

1.7 STREPTOMYCES LIVIDANS	26
1.7.1 Xylanases.....	27
1.7.1.1 Xylanase A	27
1.7.1.2 Xylanase B.....	28
1.7.1.3 Xylanase C.....	28
1.8 OBJECTIFS DU PROJET.....	28
APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	30
2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES	31
2.1.1 <i>Streptomyces lividans</i>	31
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	31
2.2 PLASMIDES UTILISÉS	31
2.2.1 Plasmide pC209.....	31
2.2.2 Plasmides pIAF932, pIAF935 et pIAF936.....	31
2.3 CONSERVATION DES SOUCHES	32
2.4 MUTAGÈSE DIRIGÉE PAR PCR	32
2.5 SOUS-CLONAGE DES GÈNES CHEZ <i>S. LIVIDANS</i>	36
2.5.1 Digestion avec des enzymes de restriction et électrophorèse.....	36
2.5.2 Isolement d'ADN à partir d'un gel d'agarose	36
2.5.3 Ligation d'un vecteur et d'un fragment d'ADN.....	37
2.6 MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES DES SOUCHES.....	37
2.6.1 <i>S. lividans</i> 10-164	37
2.6.1.1 Transformation des protoplastes et sélection des transformants	37
2.6.1.2 Isolement de plasmides.....	38
2.6.2 <i>E. coli</i>	39
2.6.2.1 Préparation des cellules compétentes DH11S	39
2.6.2.2 Transformation	39
2.6.2.3 Isolement de plasmides.....	40
2.7 CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS CHEZ <i>S. LIVIDANS</i>.....	41
2.8 SÉQUENÇAGE DES GÈNES	41
2.8.1 Sous-clonage dans M13.....	41
2.8.2 Transfection.....	42
2.8.3 Production et purification de l'ADN simple brin.....	42
2.8.4 Protection à la nucléase S1	43

2.9 PRODUCTION DES ENZYMES MUTÉES	44
2.9.1 En erlenmeyers	44
2.9.2 En fermenteurs	44
2.10 PURIFICATION DES ENZYMES MUTÉES	45
2.10.1 Ultrafiltration à débit tangentiel	45
2.10.2 Dialyse.....	45
2.10.3 Échangeurs d'ions	45
2.10.4 Tamis moléculaire	46
2.11 ANALYSE DES PROTÉINES	47
2.11.1 Dosage des protéines	47
2.11.2 SDS-PAGE.....	47
2.11.3 Immunobuvardage.....	48
2.12 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ RÉSIDUELLE D'HYDROLYSE DES ENZYMES MUTÉES	48
2.13 PRÉPARATION DU SUCRE DONNEUR ACTIVÉ	49
2.13.1 Hydrolysats de xylane.....	49
2.13.2 Protection des groupements hydroxyles par acétylation	50
2.13.3 Fluoration au carbone anomérique	52
2.13.4 Déprotection des groupements hydroxyles par désacétylation	53
2.13.5 Purification par chromatographie préparative sur couche mince du sucres donneur activé fluoré.....	53
2.14 ANALYSE DU SUCRE DONNEUR ACTIVÉ	54
2.14.1 Chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC)	54
2.14.2 Chromatographie sur couche mince	55
2.14.2 Spectre de masse	55
2.15 TEST DE GLYCOSYNTHÈSE	55
2.15.1 Xylobiose fluoré sous forme brute	55
2.15.2 Xylobiose fluoré purifié	56
RÉSULTATS	57
3.1 MUTAGÈSE DIRIGÉE PAR PCR	58
3.2 DIGESTION ET LIGATION DANS LE VECTEUR PC209	58
3.3 TRANSFORMATION DANS <i>S. LIVIDANS</i> ET CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS	58

3.4 PRODUCTION DES ENZYMES MUTÉES EN ERLLENMEYERS.....	60
3.5 PRODUCTION DES ENZYMES MUTÉES EN FERMENTEUR	62
3.6 PURIFICATION DES ENZYMES MUTÉES.....	63
3.7 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ RÉSIDUELLE D'HYDROLYSE DES ENZYMES MUTÉES	67
3.8 PHÉNOMÈNE DE TRANSGLYCOSYLATION DE L'ENZYME SAUVAGE XLNA₂ ET DE L'ENZYME MUTÉE XLNA₂-E236A EN PRÉSENCE DE XYLOPENTAOSE.	69
3.9 SYNTHÈSE DU SUCRE DONNEUR ACTIVÉ	70
3.9.1 Préparation du β-xylobiose	70
3.9.2 Acétylation du xylobiose.....	73
3.9.3 Fluoration du β-xylobiose acétylé.....	73
3.9.4 Désacétylation	76
3.10 TEST DE GLYCOSYNTÈSE AVEC LE 1-FLUOROXYLOBIOSE SOUS FORME BRUTE.....	80
3.11 SECONDE SYNTHÈSE DU SUCRE DONNEUR ACTIVÉ 1-FLUOROXYLOBIOSE.	82
3.12 TEST DE GLYCOSYNTÈSE AVEC LE 1-FLUOROXYLOBIOSE PURIFIÉ.....	86
DISCUSSION	88
4.1 ACTIVITÉ RÉSIDUELLE D'HYDROLYSE DES ENZYMES MUTÉES.....	89
4.2 SYNTHÈSE DU SUCRE DONNEUR ACTIVÉ	92
4.3 TEST DE GLYCOSYNTÈSE	97
CONCLUSION	101
BIBLIOGRAPHIE.....	105
ANNEXES	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Liaisons glycosidiques possibles entre deux monosaccharides.	4
Figure 2 :	Synthèse chimique du disaccharide β ,1-3 galactobiose.(Nilsson, 1988)	11
Figure 3 :	Réaction des glycosyltransférases.(selon Thiem, 1995)	13
Figure 4 :	Mécanisme d'inversion des glycosidases.	14
Figure 5 :	Mécanisme de rétention des glycosidases.	16
Figure 6 :	Mécanisme de la synthèse d'oligosaccharides par transglycosylation.	17
Figure 7 :	Modification de l'état d'ionisation du groupement carboxylique du glutamate jouant le rôle d'acide/base suite à la mutation du glutamate nucléophile par une alanine.	19
Figure 8 :	Représentation schématique de l'emplacement des sucres au site glyconique et aglyconique a) lors de l'hydrolyse du lien glycosidique b) lors de la réaction de glycosynthèse.	21
Figure 9 :	Mécanisme de la réaction de glycosynthèse à l'aide de la β -glucosidase/galactosidase d' <i>Agrobacterium</i> .	22
Figure 10 :	Principe de la mutagenèse dirigée par PCR.	33
Figure 11 :	Synthèse du 1- α -fluoroxylobiose.	50
Figure 12 :	Schéma de la construction des plasmides pIAF932-E236A, pIAF935-E87A et pIAF936-E85A à partir du plasmide pC209 de <i>S. lividans</i> et des amplicons obtenus par PCR.	59
Figure 13 :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS des protéines sécrétées au niveau des surnageants de culture des productions de 48 heures en milieu liquide M15 contenant 1% (p/v) de glucose et supplémenté de thiostrepton de quatre clones chacun des transformants pIAF932-E236A (A, puits 1-4), pIAF935-E87A (B, puits 1-4) et pIAF936-E85A (B, puits 5-8).	61

- Figure 14 : Immunobuvardage de type Western des protéines sécrétées au niveau des surnageants de culture des productions de 48 heures en milieu liquide M15 contenant 1% (p/v) de glucose et supplémenté de thiostrepton de quatre clones chacun des transformants pIAF932-E236A (A, puits 1-4), pIAF935-E87A (B, puits 1-4) et pIAF936-E85A (B, puits 5-8) avec les anticorps anti-XlnA, anti-XlnB et anti-XlnC. 61
- Figure 15 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS des protéines du surnageant concentré des trois productions en fermenteur des enzymes mutées XlnA₂-E236A (A), XlnB₂-E87 (B) et XlnC-E85A (C). 64
- Figure 16 : Détermination du degré de purification des protéines mutées (XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS (A, puits 2-5, 3 µg de protéines ; B, puits 2 et 3, 3 µg de protéines). 66
- Figure 17: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC) de la purification du β-xylobiose sur tamis moléculaire à partir d'un hydrolysats de xylane. A) Standard d'oligoxylosides X1 à X9 B) hydrolysats de xylane C) β-xylobiose purifié sur tamis moléculaire. 72
- Figure 18 : Acétylation du β-xylobiose A) Schéma de l'acétylation du β-xylobiose B) Analyse par CCM de l'acétylation du β-xylobiose avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1). 74
- Figure 19 : Synthèse du 1-α-fluoroxylobiose acétylé à partir du β-xylobiose acétylé. A) Schéma de la synthèse B) Analyse de la synthèse par CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1), CCM 1) 4 heures après la réaction, CCM 2) 10 jours après la réaction. 75
- Figure 20 : Synthèse par désacétylation du 1-α-fluoroxylobiose à partir du 1-α-fluoroxylobiose acétylé. A) schéma de la réaction de désacétylation B) Analyse de la synthèse par CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1). 77
- Figure 21 : CCM avec l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle (4 :3 :10) du 1-fluoroxylobiose en comparaison avec le xylobiose. 78
- Figure 22 : Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du 1-fluoroxylobiose. 79
- Figure 23: Spectre de masse m/z A) Tampon acétonitrile 4 mM B) Tampon acétonitrile 4 mM contenant 1 mM du sucre 1-fluoroxylobiose. 81

- Figure 24: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du test de glycosynthèse après un temps d'incubation de 240 minutes dans un tampon 50 mM de citrate de sodium lorsque le sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose sous forme brute (5 mM) et le sucre accepteur β -xylotriose (10 mM) sont utilisés A) Témoin B) En présence de 30 μ M de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A à une température de 30°C C) En présence de 30 μ M de l'enzyme mutée XlnB₂-E87A à la température de la pièce. 83
- Figure 25: CCM à l'aide de l'éluant méthanol, eau, acétate d'éthyle (4 : 3 :10) de la seconde synthèse du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose. 85
- Figure 26: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance de la pureté du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose A) suite à la deuxième synthèse B) après purification par chromatographie préparative sur couche mince. 87
- Figure 27: Analyse à différents temps d'incubation du surnageant de culture de la production en fermenteur de la souche 10-164 de *S. lividans* A) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) avec SDS et par immunobuvardage de type Western avec les anticorps B) anti-XlnA C) anti-XlnB D) anti-XlnC. (A= XlnA, A₂= XlnA₂, B= XlnB, B₂= XlnB₂, C= XlnC). 90
- Figure 28: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du sucre donneur 1-fluoroxylobiose obtenu sous forme pratiquement pure A) suite à sa synthèse B) au moment de son utilisation pour la réaction de glycosynthèse. 99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Liste de microorganismes pathogènes se liant aux oligosaccharides des cellules humaines (Zopf et Roth, 1996).	7
Tableau 2 :	Réaction de glycosynthèse envers différents sucres accepteurs lorsque l'enzyme mutée Glu358Ala d' <i>Agrobacterium</i> utilise l' α -galactosyle fluoré en tant que sucre donneur (tiré de Mackenzie <i>et al.</i> , 1998).	24
Tableau 3 :	Réaction de glycosynthèse envers différents sucres accepteurs lorsque l'enzyme mutée Glu358Ala d' <i>Agrobacterium</i> utilise l' α -glucosyle fluoré comme sucre donneur (tiré de Mackenzie <i>et al.</i> , 1998).	25
Tableau 4 :	Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée. Les mutations sont indiquées en caractères gras et soulignées.	35
Tableau 5 :	Programme d'élution sur la colonne CM-sépharose AP2 à un débit linéaire de 48,9 cm/h des enzymes mutées XlnA ₂ -E236A, XlnB ₂ -E87A et XlnC-E85A.	46
Tableau 6 :	Profil d'élution par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC) à un débit linéaire de 4,77 cm/h de l'analyse du sucre donneur activé purifié.	54
Tableau 7 :	Pourcentage de récupération des protéines totales lors de la purification des protéines mutées sur colonne échangeuse de cations et tamis moléculaire.	65
Tableau 8 :	Détermination du pourcentage d'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées envers le xylane et le xylopentaose en comparaison avec leur enzyme de type sauvage respective.	68
Tableau 9 :	Comparaison entre l'enzyme sauvage XlnA ₂ et l'enzyme mutée XlnA ₂ -E236A du phénomène de transglycosylation en présence de xylopentaose. (Concentration des sucres déterminé par HPEAC)	71
Tableau 10 :	Rendements des deux synthèses du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose à partir du β -xylobiose.	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
Ac	Groupement acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytosine
CCM	Chromatographie sur couche mince
DMF	Diméthylformamide
EDTA	Éthylène diamine tétraacétate
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines (Fast protein liquid chromatography)
g	Force gravitationnelle
G	Guanine
Gal	Galactose
h	Heure(s)
HPEAC	Chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (High performance exchange anions chromatography)
IgG	Immunoglobuline de type G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodaltons
Man	Mannose
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
nC	Nano coulombs
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	Paire de bases
PEG	Polyéthylène glycol
PSI	Livre par pouce carré (Pound per square inch)
p/v	poids/volume
RBB	Rémazol bleu brillant
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Révolution par minute
SDS	Sulfate de sodium dodécyle
Std	Standard
T	Thymine
TBS	Tampon Tris salin
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TSB	“Tryptic soy broth”
tsr	Thiostrepton
TY	“Tryptic soya broth-yeast extract”
U	Unité

UV	Ultra-violet
Vh	Volts heure
v/v	volume/volume
WT	Type sauvage (Wild type)
X1	Xylose
X2	Xylobiose
X2F	1-fluoroxylobiose
X3	Xylotriose
X4	Xylotétraose
X5	Xylopentaose
X6	Xylohexaose
X7	Xyloheptaose
X8	Xylooctaose
X9	Xylononaose
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
XlnA	Xylanase A de <i>S. lividans</i>
XlnA ₂	Domaine catalytique de la xylanase A de <i>S. lividans</i>
XlnA _{tr}	Xylanase A tronquée de <i>S. lividans</i>
XlnB	Xylanase B de <i>S. lividans</i>
XlnB ₂	Domaine catalytique de la xylanase B de <i>S. lividans</i>
XlnB _{tr}	Xylanase B tronquée de <i>S. lividans</i>
XlnC	Xylanase C de <i>S. lividans</i>

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Généralités

Les progrès en biologie moléculaire ont permis d'élucider le rôle des acides nucléiques et des protéines comme des molécules comportant de l'information biologique. Les acides nucléiques portent l'information selon l'arrangement linéaire des bases nucléotidiques tandis que les protéines expriment leur information biologique non seulement par l'arrangement linéaire des acides aminés mais aussi par la structure tertiaire que ces résidus d'acides aminés adoptent dans la chaîne polypeptidique. De son côté, l'étude des chaînes de sucres, soit la troisième classe majeure de biopolymères, a été moins exploitée. Les rôles biologiques sont donc moins bien définis pour cette classe de molécules. Cependant, l'intérêt pour la synthèse et donc l'étude des oligosaccharides s'est accentuée ces dernières années. En effet, en plus de leur utilisation connue comme source d'énergie et en tant que matériaux de structures cellulaires, diverses recherches ont permis de démontrer leur importance au niveau de plusieurs processus biologiques et leur efficacité en tant qu'agents thérapeutiques. À ce jour, peu de méthodes efficaces de synthèse à grande échelle ont encore été élaborées pour ces biopolymères. Ainsi, devant les nombreux rôles des oligosaccharides au niveau de certains processus biologiques et étant donné leurs applications pharmaceutiques prometteuses, le développement de méthodes efficaces pour leur synthèse en grande quantité se voit d'un grand intérêt.

1.2 Caractéristiques particulières des polysaccharides

Les acides nucléiques, les protéines et les polysaccharides sont des biopolymères largement distribués chez les organismes vivants. Les unités monomériques de ces trois polymères sont réunies par des liaisons covalentes, soit respectivement la liaison phosphodiester, la liaison peptidique et la liaison glycosidique. Cependant, la liaison glycosidique des polysaccharides possède une caractéristique particulière non retrouvée chez les acides nucléiques et les protéines.

Tout d'abord, dans le cas des protéines, seule la liaison peptidique entre le groupement amine d'un résidu d'acide aminé et le groupement acide carboxylique d'un

autre résidu d'acide aminé est possible. Pour les acides nucléiques, une seule structure chimique est aussi possible lors de l'association de deux unités structurales telles l'acide adénylique et l'acide guanylique, soit la liaison phosphodiester. Ainsi, pour ces deux biopolymères, une seule structure linéaire avec une séquence particulière peut être formée lorsque le nombre d'unités augmente. La situation est tout à fait différente pour les polysaccharides. Prenons l'exemple d'une liaison glycosidique entre deux monosaccharides, soit un galactose et un mannose (Figure 1). Quatre positions différentes sont possibles pour la liaison glycosidique du résidu galactose au résidu mannose: C-2, C-3, C-4 et C-6. Ainsi, quatre structures isomériques sont possibles. Par ailleurs, le résidu galactose peut adopter deux configurations anomériques (α et β). Le nombre possible de structures isomériques augmente donc à huit. Enfin, un résidu galactose peut être présent sous la forme furanose aussi bien que sous la forme pyranose portant à 16 le nombre théorique possible de structures isomériques pour le disaccharide Gal-Man (Kobata, 1993). Ainsi, contrairement aux protéines et aux acides nucléiques, les chaînes de sucres possèdent la capacité de former plusieurs structures possibles avec une petite quantité d'unités. Cette caractéristique explique donc la grande diversité des structures des polysaccharides retrouvés chez les organismes vivants et c'est l'une des raisons pour lesquelles il est difficile de les synthétiser.

1.3 Rôles biologiques des oligosaccharides

Les oligosaccharides sont des chaînes de sucres constituées de 2-30 unités monosaccharidiques liées par des liaisons glycosidiques. En plus de leur utilisation en tant que source d'énergie pour les organismes, il a été démontré que les oligosaccharides jouent plusieurs rôles biologiques (Varki, 1993). Tout d'abord, certains ont un rôle structural et possèdent ainsi une fonction importante dans le maintien physique, l'intégrité et la porosité des tissus de structures. D'autres, retrouvés au sein de glycoprotéines, agissent au niveau de la protection, de la stabilité et de la conformation des protéines. Certains, seuls ou associés à des lipides ou protéines, sont situés à la

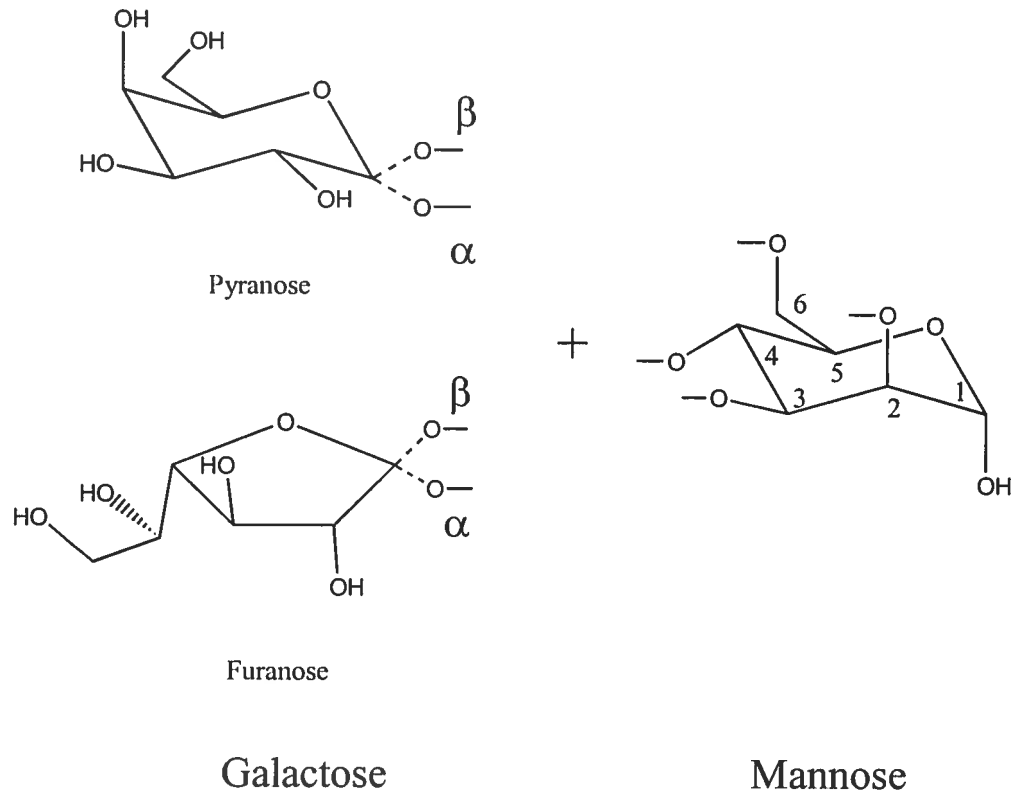


Figure 1: Liaisons glycosidiques possibles entre deux monosaccharides

surface des cellules et ont ainsi un rôle de récepteur hautement spécifique pour une variété de microorganismes, toxines et anticorps. Bien que certains jouent un rôle de récepteur spécifique, d'autres au contraire confèrent une fonction de masquage. Par ailleurs, par le processus de glycosylation et de déglycosylation, ils peuvent moduler la fonction des protéines. Enfin, certains sont aussi retrouvés sous forme libre et agissent en tant qu'hormones.

Bien qu'il soit connu que les oligosaccharides possèdent plusieurs rôles biologiques, un grand nombre d'entre eux n'ont cependant pas encore été identifiés étant donné leur grande diversité. Par ailleurs, bien que certains aient été identifiés, les mécanismes par lesquels ils agissent demeurent pour plusieurs incertains et même inconnus pour d'autres. Ainsi, afin d'en faire l'étude et donc d'en identifier de nouveaux et déterminer les mécanismes biologiques dans lesquels ils sont impliqués, on peut voir l'intérêt de développer des méthodes efficaces pour leur synthèse.

1.4 Oligosaccharides et leur utilisation thérapeutique

Les glycoprotéines et les glycolipides, exprimés en grande quantité à la surface des cellules, participent à plusieurs processus moléculaires directs de reconnaissance et de liaison et sont ainsi responsables de certaines maladies et sont impliqués au niveau du maintien de la santé. Généralement, c'est la portion carbohydrate qui est responsable de ces processus de reconnaissance et de liaison. Il a été démontré que ce processus de reconnaissance hautement spécifique apparaît fréquemment au tout début de la période de développement de certaines maladies (Sears et Wong, 1996). Les oligosaccharides présentent donc une multitude d'opportunités pour le développement d'interventions thérapeutiques.

En effet, une approche permettant de contrer cet effet de reconnaissance et de liaison est l'inhibition compétitive du processus d'adhésion. Les oligosaccharides peuvent agir comme ligands dans ces interactions d'adhésion. Administrés en solution sous formes monovalente ou multivalente ou immobilisée sur une surface accessible, ces

derniers peuvent par inhibition compétitive bloquer certains processus d'interactions spécifiques.

1.4.1 Inhibition d'adhésines microbiennes

La plupart des microorganismes pathogènes utilisent des protéines membranaires situées à la surface des cellules et qui lient des sucres de façon hautement spécifique pour s'attacher aux tissus de l'hôte et initier la maladie. Ce processus de reconnaissance est essentiel pour la colonisation du microorganisme et ainsi sa propagation et sa survie. L'infection microbienne peut donc être empêchée dans certains cas par l'utilisation d'agents oligosaccharidiques inhibant de façon compétitive ce mécanisme d'adhésion. Plusieurs ligands saccharidiques reconnus par des microorganismes pathogènes de la peau, des tractus gastro-intestinal, respiratoire et urino-génital ont été identifiés. Le tableau I liste quelques microorganismes pathogènes se liant aux oligosaccharides des cellules humaines et contre lesquelles, dans certains cas, des agents anti-adhésifs oligosaccharidiques ont été développés et évalués comme efficaces.

On remarque, selon le tableau I, qu'*Helicobacter pylori* est un exemple de microorganismes pathogènes pour lequel un agent anti-adhésif oligosaccharidique efficace a été développé. *H. pylori* est une bactérie qui cause des gastrites, des ulcères gastro-duodénaux et qui est aussi impliquée dans l'étiologie des cancers gastriques. Plusieurs ligands oligosaccharidiques contre ce microorganisme ont été rapportés. Le sialyllactose (Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc) est le seul oligosaccharide qui a le potentiel d'inhiber l'adhésion bactérienne. Un agent anti-adhésif oligosaccharidique, soit le NE 0080, a donc été mis au point par Neose Technologies (Simon, 1996).

1.4.2 Inhibition de toxines microbiennes

Comme les microorganismes pathogènes, la majorité des toxines bactériennes ont la capacité de se lier aux oligosaccharides de la membrane de certaines cellules épithéliales. Cette étape de liaison est essentielle pour l'activité cytopathique de la toxine.

Tableau 1: Liste de microorganismes pathogènes se liant aux oligosaccharides des cellules humaines (Zopf et Roth, 1996).

Bactéries	Bactéries
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bordetella pertussis</i> * +	<i>S. saprophyticus</i> *
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Streptococcus mutans</i> *
<i>Citrobacter freundii</i> *	<i>S. pneumoniae</i> * +
<i>Enterobacter aerogenes</i> *	<i>S. sanguis</i> *
<i>Escherichia coli</i> * +	<i>Vibrio cholerae</i> *
<i>Haemophilus influenzae</i> *	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
<i>H. parainfluenzae</i>	Virus
<i>Helicobacter pylori</i> * +	HIV *
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Influenza virus *
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Parvovirus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> *	Rotavirus
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Champignons
<i>Propionobacterium granulosum</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Proteus mirabilis</i> *	Autres pathogènes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	<i>Cryptosporidium parvum</i> *
<i>Salmonella typhimurium</i> *	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Serratia marcescens</i> *	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> *
<i>S. flexneri</i> *	

* Oligosaccharides anti-adhésifs spécifiques efficaces *in vitro*.

+ Oligosaccharides anti-adhésifs spécifiques prophylactiques et thérapeutiques *in vivo*.

La toxine de *Clostridium difficile* est un exemple. L'empêchement de cette toxine à s'attacher aux cellules épithéliales prévient sa pénétration et conséquemment l'effet toxique, lequel est responsable de sévères diarrhées particulièrement chez les gens âgés ou sous thérapie d'antibiotiques (Pothoulakis *et al.*, 1996).

1.4.3 Inhibiteurs de sélectines

En 1989, une nouvelle classe de glycoprotéines appelée sélectines a été identifiée sur la surface de certaines cellules. Ces glycoprotéines ont été désignées E-sélectines (Bevilacqua *et al.*, 1989), P-sélectines (Jonhston *et al.*, 1989) et L-sélectines (Lasky *et al.*, 1989; Siegelman *et al.*, 1989) dépendamment du type cellulaire sur lesquelles elles sont retrouvées soit respectivement l'endothélium, les plaquettes et les lymphocytes. Les ligands saccharidiques reconnus par ces sélectines ont aussi été identifiés (Phillips *et al.*, 1990; Lowe *et al.*, 1990; Walz *et al.*, 1990; Polley *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1991; Hemmerich *et al.*, 1994; Hemmerich et Rosen, 1994; Chandrasekaran *et al.*, 1995).

Les interactions entre les sélectines et leurs ligands saccharidiques respectifs apparaissent au début des réactions inflammatoires. Par exemple, lorsqu'un dommage tissulaire apparaît, des cytokines sont libérées pour signaler aux cellules endothéliales de synthétiser des E-sélectines pour recruter des neutrophiles au site endommagé. Cependant, lorsqu'une quantité trop élevée de neutrophiles sont recrutées, les cellules normales peuvent aussi être endommagées, d'où la réaction d'inflammation. Une nouvelle stratégie anti-inflammatoire consiste à contrôler ce processus par une inhibition adéquate de cette étape d'adhésion. Plusieurs symptômes inflammatoires tels que l'asthme, l'infarctus du myocarde, les lésions pulmonaires et l'arthrite peuvent donc être traités par cette approche.

1.4.4 Vaccins contre certains cancers

Dans certains cas, les cellules cancéreuses exposent des antigènes de surface détectables immunologiquement. De nouveaux médicaments anti-cancéreux, tel des

vaccins, peuvent donc aussi être développés afin de stimuler la production d'anticorps spécifiques. Un exemple est la glycoprotéine mucine MUC-1 qui contient de petites chaînes de sucres dont entre autres la chaîne de sucres Neu5Ac(α 2-6)GalNAc(α 1-Ser/Thr). Biomira, Inc. (Edmonton, Canada) synthétise un conjugué de cette chaîne de sucres appelé Thératope®. Lorsque le Thératope® est administré par voie intraveineuse en conjonction avec l'immunomodulateur cyclophosphamide, les patientes acquièrent une plus grande quantité d'anticorps anti-Neu5Ac(α 2-6)GalNAc(α 1-Ser/Thr) et leur temps de survie est prolongé (Simon, 1996).

1.4.5 Anticorps naturels :Xénotransplantation

Une autre opportunité quant à la rupture de l'adhésion d'oligosaccharides se trouve au niveau de la xénotransplantation. En effet, le manque de donneurs d'organes humains a généré l'intérêt pour les organes d'animaux. Le porc est une espèce d'intérêt pour la xénotransplantation. Les tissus des vertébrés autres que les humains et les primates expriment cependant des chaînes d'oligosaccharides Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc de type non fucosylé, soit α -Gal. Au contraire, les humains et les primates produisent les mêmes chaînes d'oligosaccharides mais de type fucosylé. En absence d'antigène α -Gal, les humains et les primates produisent quand même une grande quantité d'anticorps anti- α -Gal, soit de 1-3% de toutes les immunoglobulines en circulation (Galili *et al.*, 1985). Ainsi, lorsqu'un organe de porc est transplanté chez le babouin, utilisé en tant que modèle de l'humain, l'organe est rejeté et détruit par l'action rapide des anticorps anti- α -Gal par un phénomène appelé rejet hyperaigu (Cooper *et al.*, 1994). Suite à la transplantation, on s'attend à ce que la prévention du rejet hyperaigu pour une brève période (environ deux semaines) permette à l'organe de fonctionner et survivre même en présence d'anticorps anti- α -Gal dû au processus d'accommodation (Lawson et Platt, 1996). Les greffes permanentes seraient donc possibles par l'utilisation d'oligosaccharides α -Gal où ces derniers compétitionneraient avec les α -Gal de l'organe animal transplanté pour la liaison avec les anticorps anti- α -Gal. Des recherches ont donc

été entreprises afin de prévenir le rejet hyperaigu par cette méthode (Samuelsson *et al.*, 1994; Galili *et al.*, 1987; Neethling *et al.*, 1994).

1.5 Synthèse d'oligosaccharides

Étant donné les multiples résultats démontrant l'importance des oligosaccharides dans divers processus biologiques et comme agents thérapeutiques dirigés contre certaines maladies, le développement de méthodes efficaces pour la synthèse en grande quantité d'oligosaccharides est primordial. L'intérêt pour la synthèse de ces polymères s'est accentué ces dernières années. Différentes méthodes ont été mises à profit, soit la synthèse chimique et la synthèse enzymatique.

1.5.1 Synthèse chimique

Les méthodes chimiques de synthèse d'oligosaccharides sont bien développées. Cependant, les hydrates de carbone sont constitués de multiples groupes hydroxyles de réactivité similaire rendant ainsi les méthodes chimiques compliquées. En effet, plusieurs étapes de protection et déprotection sont requises pour une synthèse régiosélective. Par exemple, la simple synthèse du disaccharide β -1,3- galactobiose (Figure 2) requiert neuf étapes de protection et d'activation et ce, sans compter les étapes de purification chromatographique souvent nécessaires dues aux réactions incomplètes ou secondaires. De plus, ce nombre d'étapes augmente avec le degré de polymérisation de l'oligosaccharide. Le rendement final est donc très faible et la production en grande quantité non pratique. Par ailleurs, les réactions stéréospécifiques fournissant le bon oligomère (α ou β) présentent souvent des difficultés.

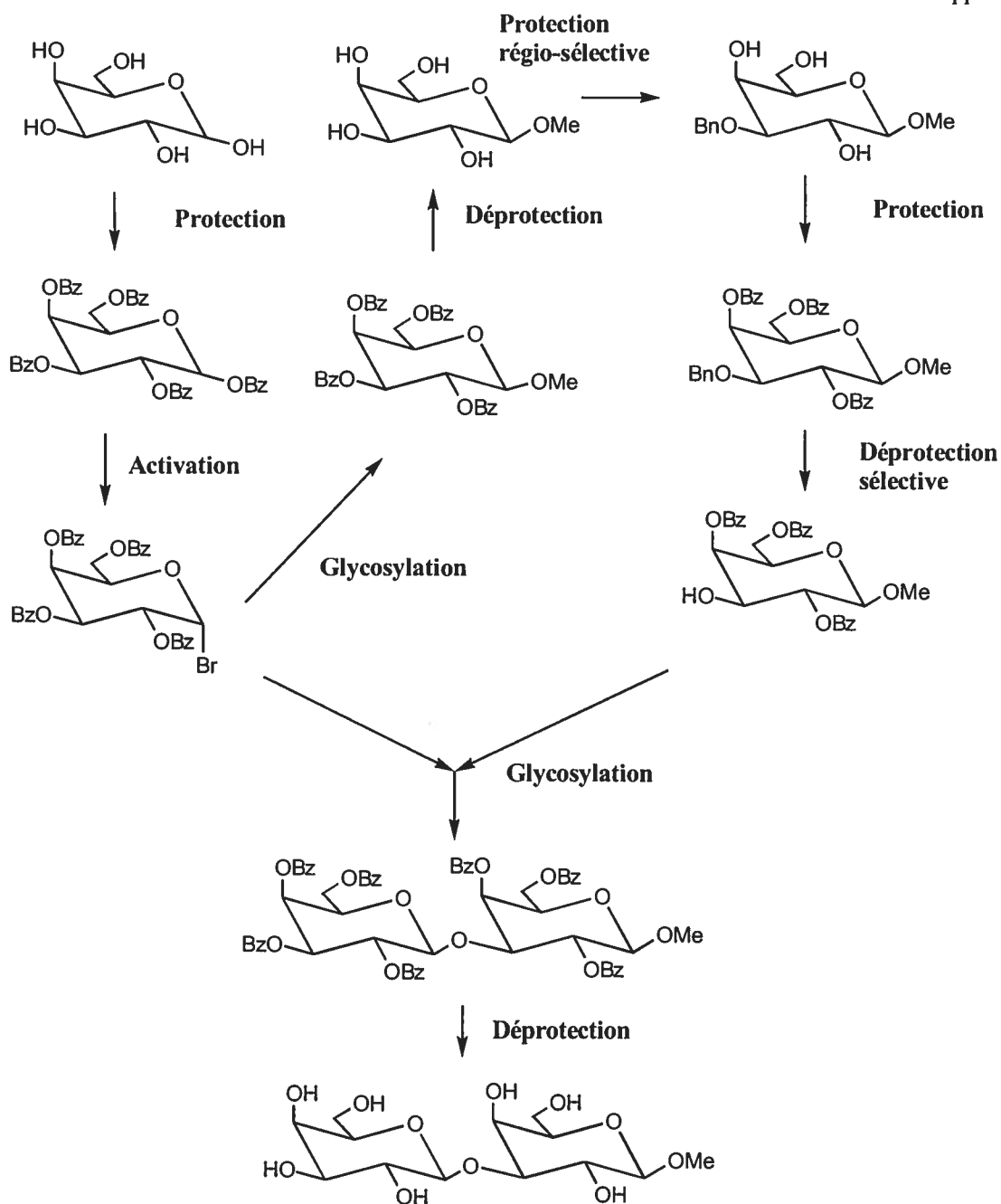


Figure 2: Synthèse chimique du disaccharide β ,1-3 galactobiose. (Nilsson, 1988)

Légende: Bz = benzyle, Me = groupement méthyle, Bn = benzyl

1.5.2 Synthèse enzymatique

La synthèse enzymatique est une bonne alternative pour la production d'oligosaccharides en grande quantité. En effet, malgré le fait que ces méthodes n'ont pas grandement été investiguées pour les hydrates de carbone complexes, elles présentent néanmoins plusieurs avantages comparativement aux méthodes chimiques. Une grande variété de réactions hautement régio-sélectives et régio-spécifiques peuvent être catalysées très efficacement sans la protection des groupements hydroxyles. Deux types d'enzymes sont utilisés pour la préparation d'oligosaccharides soit les glycosyltransférases et les glycosidases.

1.5.2.1 Glycosyltransférases

Les glycosyltransférases sont des enzymes qui catalysent le transfert stéréo- et régio-spécifique d'un monosaccharide issu d'un substrat donneur, soit un sucre nucléotidique, à un substrat accepteur (Figure 3). Ces enzymes sont classifiées dépendamment du sucre transféré du donneur à l'accepteur ainsi que selon la spécificité de l'accepteur. Plusieurs glycosyltransférases ont été utilisées ces dernières années pour la synthèse d'oligosaccharides. Cependant, trois problèmes majeurs sont fréquemment rencontrés lors de l'utilisation de ces enzymes. Tout d'abord, les sucres nucléotidiques servant de substrat donneurs sont très dispendieux. Leur utilisation comme réactifs stœchiométriques en vue d'une synthèse à grande échelle présente donc des coûts très élevés. Deuxièmement, la réaction enzymatique souffre grandement d'un processus de rétro-inhibition causé par le nucléoside phosphate libéré.

Pour remédier à ces deux problèmes, certaines réactions efficaces mais s'avérant plutôt complexes ont été élaborées pour quelques glycosyltransférases. Ces réactions mettent en oeuvre un système de recyclage des nucléotides. Finalement, le troisième inconvénient concerne la biodisponibilité des glycosyltransférases. En effet, la quantité pouvant être isolée d'une source naturelle est souvent limitée par la présence en faible concentration de ces enzymes au niveau de plusieurs tissus et fluides corporels. Les

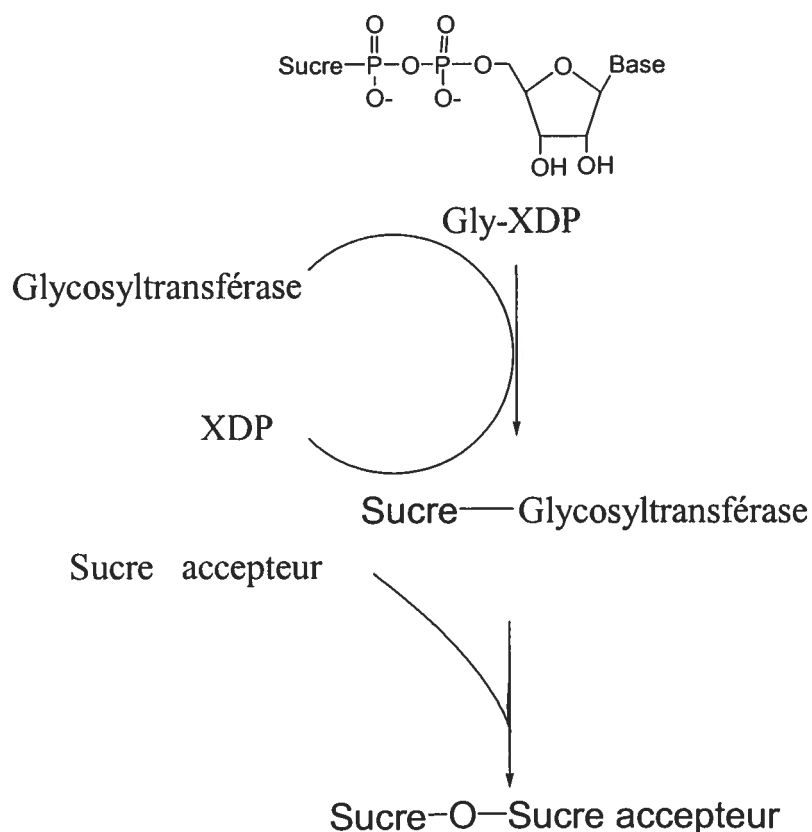


Figure 3: Réaction des glycosyltransférases. (selon Thiem, 1995)
Légende: XDP = Nucléotide, Gly-XDP= sucre nucléotidique

glycosyltransférases ne sont donc pas facilement disponibles. Une stratégie consiste à cloner les gènes de glycosyltransférases dans des systèmes d'expression convenables. Cependant, à ce jour, peu de glycosyltransférases ont été clonées, exprimées et produites en quantité suffisante pour la synthèse enzymatique (Wong *et al.*, 1995).

1.5.2.2 Glycosidases

Les glycosidases peuvent également être utilisées pour la synthèse enzymatique d'oligosaccharides. En effet, utilisées généralement pour catalyser l'hydrolyse des liens

glycosidiques, ces enzymes peuvent effectuer la synthèse d'oligosaccharides par le mécanisme de transglycosylation. Pour l'hydrolyse de la liaison glycosidique, les glycosidases agissent selon deux mécanismes d'action, soit par un mécanisme d'inversion ou de rétention.

Les glycosidases agissant selon le mécanisme d'inversion hydrolysent la liaison avec une nette inversion de la configuration anomérique (Figure 4). Les résidus du site actif responsable de cette catalyse acido-basique sont deux acides aminés constitués d'un groupement acide carboxylique au niveau de la chaîne latérale (Glu ou Asp): l'un agit en tant qu'acide tandis que l'autre joue le rôle de base. Tel qu'illustré à la figure 4, le groupement carboxylique agissant en tant qu'acide libère son proton lequel est capté par l'oxygène du lien glycosidique. Suite au départ de l'oxygène, il y a formation d'un intermédiaire oxocarbonium. Cette étape est suivie de l'attaque catalytique basique de l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire oxocarbonium ce qui engendre finalement le clivage catalytique du lien glycosidique.

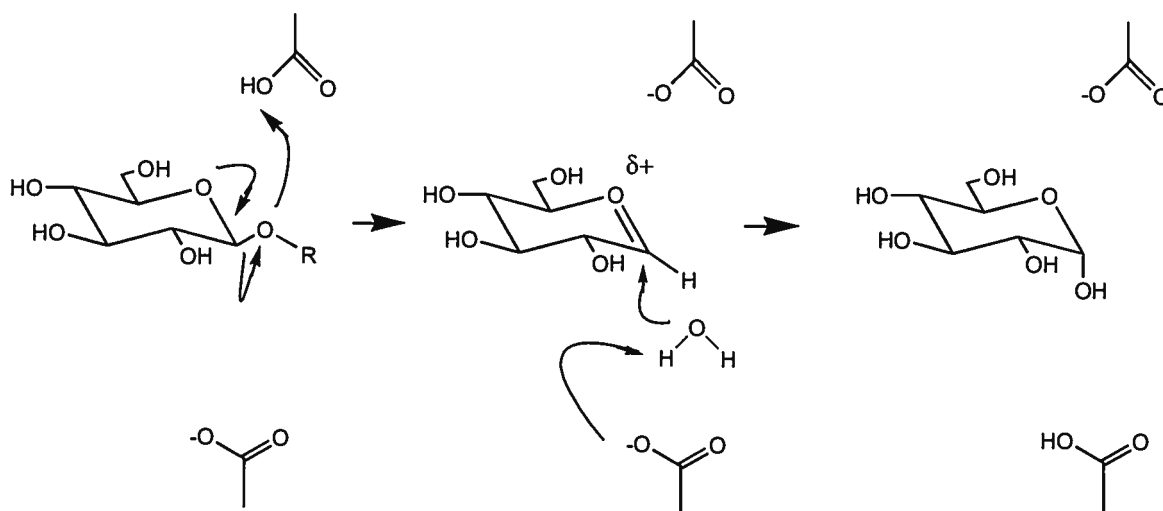


Figure 4: Mécanisme d'inversion des glycosidases.
(adapté de Wang *et al.*, 1994).

De son côté, le mécanisme de rétention implique un déplacement double dans lequel un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme est formé et hydrolysé via un état de transition avec un ion oxocarbenium (Figure 5). Deux groupements d'acides carboxyliques sont aussi impliqués dans ce mécanisme. Un résidu sert de nucléophile dans la première étape pour former l'intermédiaire et agit ensuite comme groupe sortant dans la seconde étape. L'autre groupement carboxylique joue un rôle d'acide lors de la réaction de glycosylation et agit comme base pour favoriser la déglycosylation. Le mécanisme de rétention des glycosidases est donc le suivant. Dans la première étape, soit celle de glycosylation, l'un des groupements carboxyliques joue son rôle d'acide et fournit un hydrogène à l'oxygène du lien glycosidique. De son côté, l'autre groupement carboxylique joue le rôle de nucléophile en attaquant le carbone anomérique du sucre. Il y a formation d'un ion oxocarbenium et cet état de transition est stabilisé par la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Dans la deuxième étape, soit l'étape de déglycosylation, une molécule d'eau entre en jeu. L'atome d'oxygène de la molécule d'eau attaque le carbone anomérique du sucre. Le groupement carboxylique ayant joué le rôle de nucléophile dans la première étape agit cette fois-ci en tant que groupe sortant. L'autre groupement carboxylique agit comme base et s'accapare de l'hydrogène libéré par la molécule d'eau. Ainsi, il y a second passage par l'état de transition et finalement hydrolyse du lien glycosidique avec nette rétention au niveau du carbone anomérique. La configuration β de départ est conservée (Wang *et al.*, 1994).

Les glycosidases peuvent aussi effectuer la synthèse d'oligosaccharides par transglycosylation. L'augmentation de la concentration des composés de départ (substrats), l'élévation de la température et l'utilisation de co-solvants sont différentes manières efficaces de favoriser la transglycosylation et donc de contribuer à l'augmentation du rendement de la synthèse. La synthèse par ces enzymes s'effectue selon le mécanisme illustré à la figure 6. L'intermédiaire réactif glycosyl-enzyme formé réagit avec un sucre accepteur approprié (R-OH) pour former l'oligosaccharide. Les glycosidases sont des enzymes facilement disponibles. On les retrouve en grand nombre dans les virus, les microorganismes, les plantes et les cellules animales. Cette approche utilise des sucres donneurs non dispendieux et ne requiert pas de co-facteurs. Cependant,

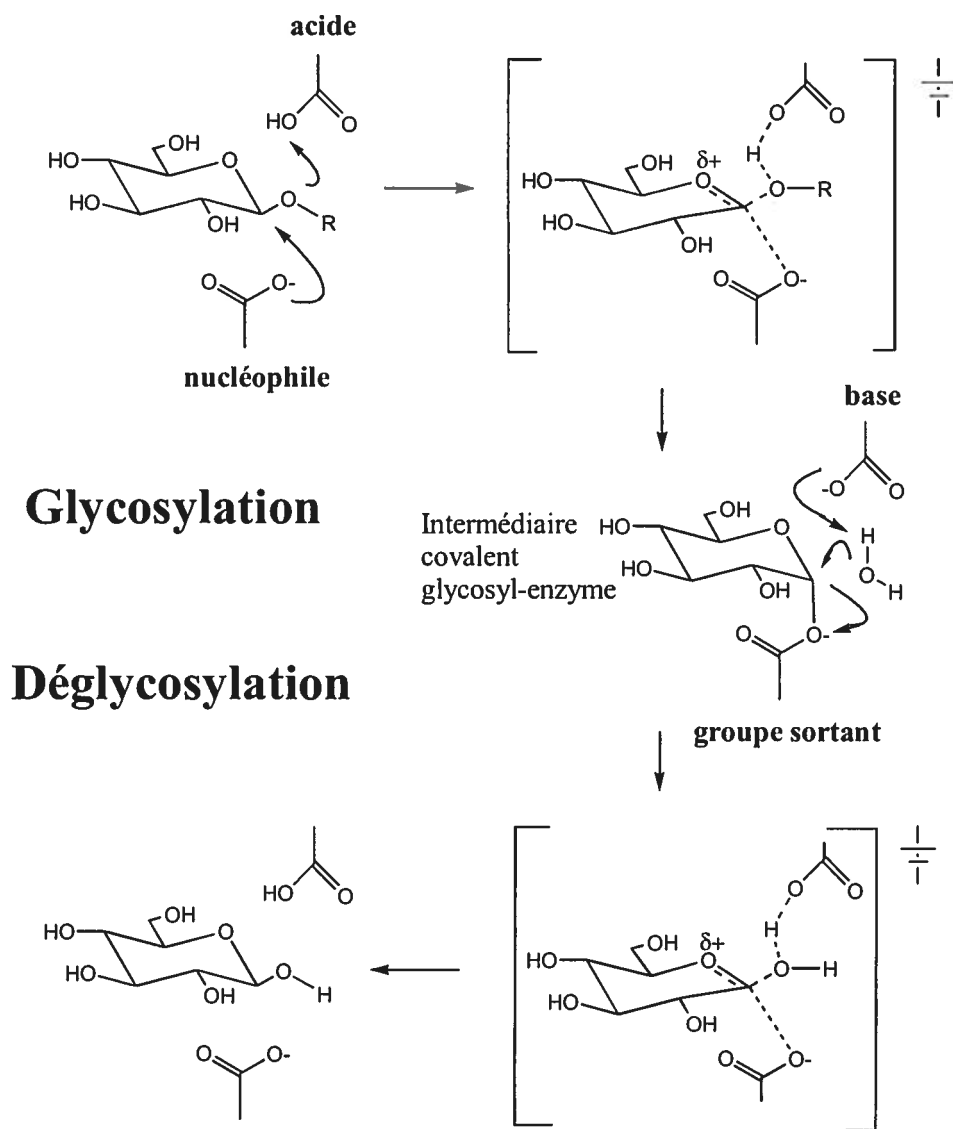


Figure 5: Mécanisme de rétention des glycosidases.
(selon Wang *et al.*, 1994)

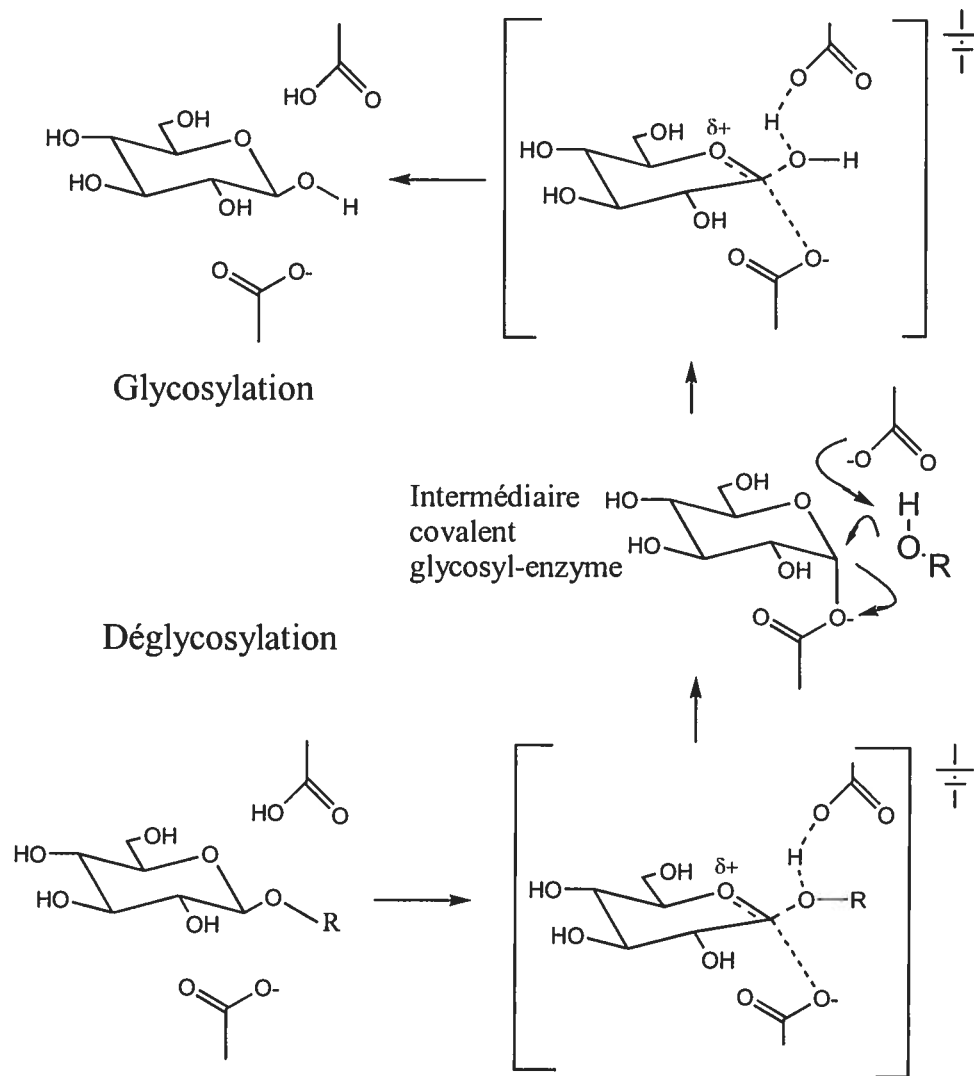


Figure 6: Mécanisme de la synthèse d'oligosaccharides par transglycosylation.
(adapté de Mackenzie *et al.*, 1998)

le rendement de synthèse d'oligosaccharides est d'un maximum de 20-30%, certaines fois considérablement plus bas. En effet, la transglycosylation présente le grand désavantage que le produit formé devient nécessairement un substrat pour l'enzyme et est conséquemment hydrolysé lorsque sa concentration augmente.

1.6 Synthèse d'oligosaccharides : Glycosidases de rétention spécifiquement mutées

Une nouvelle méthode prometteuse pour la synthèse d'oligosaccharides a été publiée récemment par le groupe de Stephen G. Whitters de l'Université de Colombie Britannique à Vancouver (Mackenzie *et al.*, 1998). Cette méthode met à profit l'utilisation d'une glycosidase de rétention spécifiquement mutée. Cette mutation a pour effet d'empêcher totalement l'hydrolyse de la liaison glycosidique, rendant possible la synthèse d'oligosaccharides sous certaines conditions. Cette méthode a été désignée sous le nom de glycosynthèse.

1.6.1 Glycosynthèse

Les études antérieures qui ont porté sur les β -glycosidases ont révélé que le remplacement au site actif de l'acide aminé comportant le groupement carboxylique nucléophile par un acide aminé constitué d'une chaîne latérale non nucléophile résulte en une enzyme correctement repliée, donc possédant une même structure tridimensionnelle. Par ailleurs, lors d'une telle mutation, l'intermédiaire glycosyl-enzyme requis ne peut être formé de sorte que l'enzyme devient catalytiquement inactive pour la réaction d'hydrolyse.

En effet, la première étape, soit l'étape de glycosylation, se trouve inactivée suite à la substitution du glutamate nucléophile par une alanine. La formation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme est impossible. Évidemment, la seconde étape, soit l'étape de déglycosylation, ne peut donc avoir lieu empêchant ainsi l'hydrolyse du lien glycosidique. Cette substitution a donc pour effet d'empêcher totalement la réaction

d'hydrolyse. En fait, la substitution du résidu glutamate nucléophile par une alanine a pour effet de modifier l'environnement au site actif. Tel qu'illustré à la figure 7, on observe que la substitution engendre un changement au niveau de l'état d'ionisation du groupement carboxylique du résidu acido-basique. En effet, à pH 7.0, le groupement carboxylique du résidu glutamate non muté passe, suite à la mutation, de l'état protonné à l'état ionisé. Il se trouve donc sous une forme déprotonnée. En plus d'empêcher la réaction d'hydrolyse, cette nouvelle configuration au site actif confère à l'enzyme la possibilité de synthétiser des oligosaccharides sous certaines conditions d'où la réaction de glycosynthèse. En effet, le reste du site actif étant demeuré intact après la mutation, l'enzyme est en mesure de catalyser la ligation d'un dérivé α -glycosyl activé, lié au site glycone à l'emplacement normal de l'intermédiaire glycosyl-enzyme, à un sucre accepteur approprié lié dans la poche aglycone (Mackenzie *et al.*, 1998 ; Malet et Planas, 1998 ; Trincone *et al.*, 2000 ; Fort *et al.*, 2000 ; Mayer *et al.*, 2000).

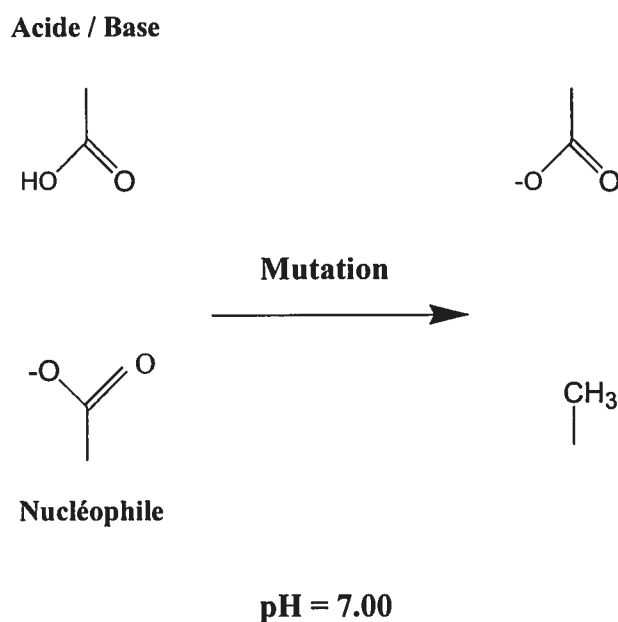


Figure 7: Modification de l'état d'ionisation du groupement carboxylique du glutamate jouant le rôle d'acide/base suite à la mutation du glutamate nucléophile par une alanine.

La figure 8A illustre l'emplacement du site glycone et aglycone des glycosidases de rétention. En fait, la poche glycone et aglycone représentent le site de liaison du substrat à l'enzyme lors du clivage du lien glycosidique. La poche glycone correspond au site de liaison à l'enzyme de la portion du substrat qui génère le sucre comportant l'extrémité non réductrice tandis que la poche aglycone correspond à la région générant l'extrémité non réductrice. La poche aglycone est représentée par des sous-sites positifs et la poche glycone par des sous-sites négatifs. Chaque sous-site est l'emplacement d'une sous-unité de l'oligosaccharide. Pour la réaction de glycosynthèse, le site glycone, tel que montré à la figure 8B, correspond à l'emplacement au niveau de l'enzyme du sucre donneur activé. De son côté, le site aglycone est l'emplacement du sucre accepteur.

Le schéma de la synthèse d'oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse est illustré à la figure 9. Tel que montré, ce processus s'effectue par une catalyse basique générale du résidu acido-basique déprotonné au niveau du sucre accepteur. Suite à l'attaque de l'oxygène au niveau du carbone anomérique du sucre donneur activé, suivi du départ du groupe partant, un lien glycosidique est formé. Le grand avantage de cette méthode est que l'oligosaccharide nouvellement formé ne peut être hydrolysé par l'enzyme glycosidique, contrairement à la transglycosylation, car la mutation a pour effet d'inactiver la réaction d'hydrolyse.

1.6.2 Exo-glycosidase de rétention ; E358A β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium*

L'enzyme mutée Glu358A de la β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium* a été la première enzyme testée par l'approche de glycosynthèse. Sous sa forme sauvage, l'enzyme catalyse efficacement la transglycosylation (Kempton et Whitters, 1992) alors que l'enzyme mutée n'a pas d'activité hydrolytique détectable (Wang *et al.*, 1994). Le mécanisme de la réaction de glycosynthèse à l'aide de la

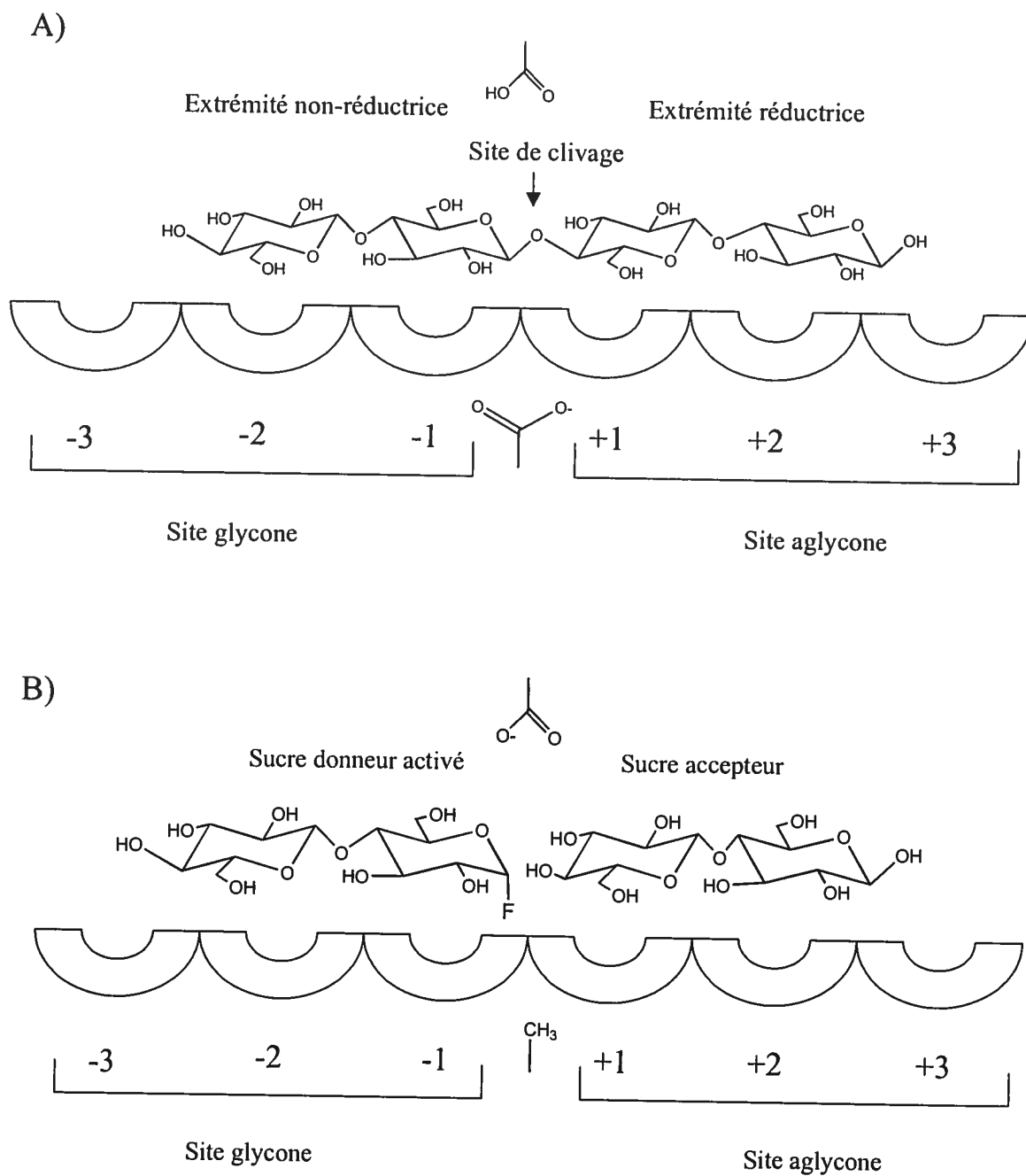


Figure 8: Représentation schématique de l'emplacement des sucres au site glyconique et aglyconique a) lors de l'hydrolyse du lien glycosidique b) lors de la réaction de glycosynthèse.

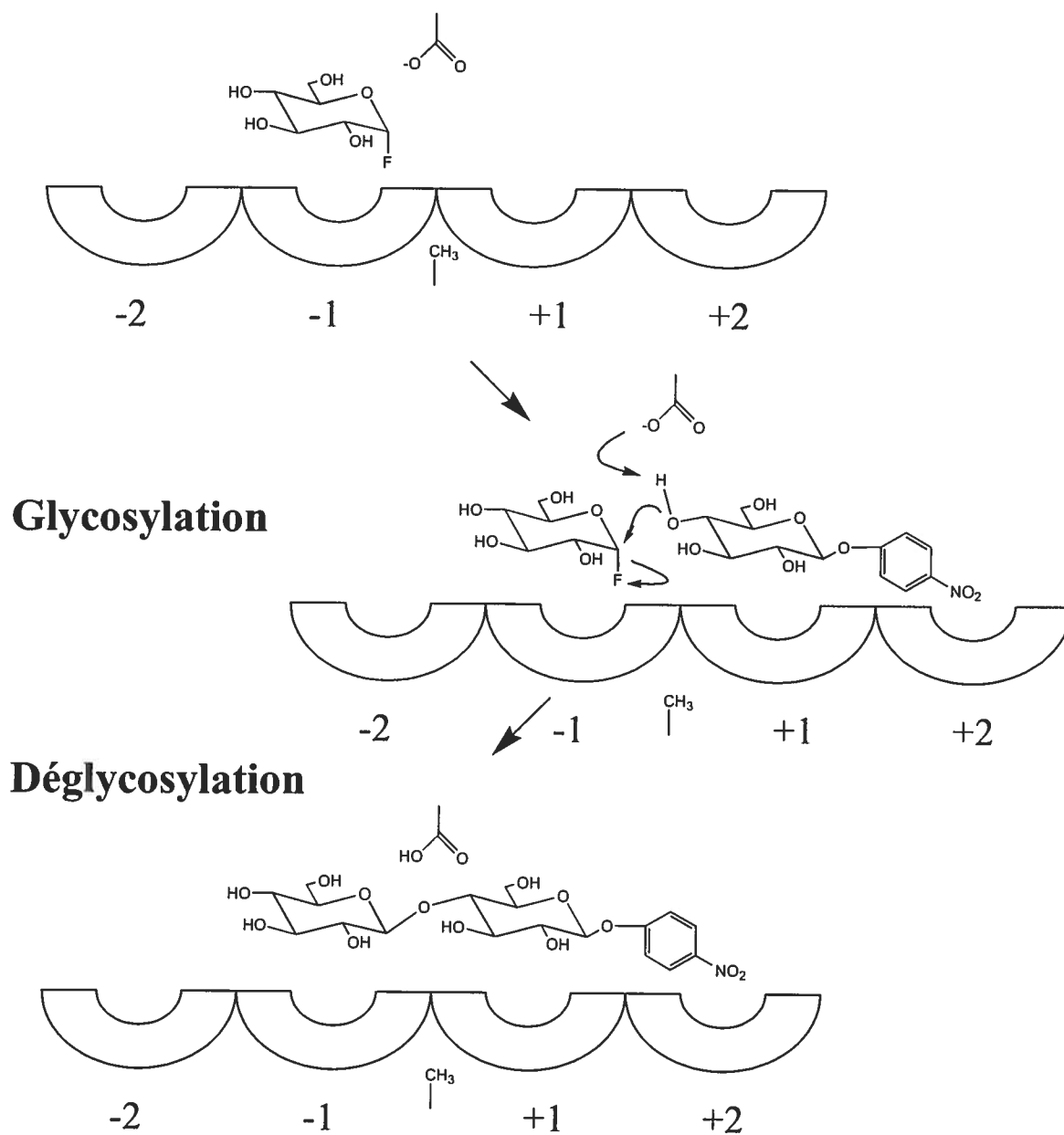


Figure 9: Mécanisme de la réaction de glycosynthèse à l'aide de la β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium*.
(adapté de Mackenzie *et al.*, 1998)

β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium* est montré à la figure 9. Comme donneur glycosyl activé, l' α -glycosyl fluoré a été employé. En plus d'être non dispendieux, un donneur α -glycosyl fluoré a la propriété d'être constitué d'un fluor qui est un excellent groupe sortant et qui de plus défavorise par sa position axiale sa liaison au site aglyconique donc diminue la compétition entre le donneur et l'accepteur. De son côté, l'accepteur choisi a été l'aryl glycoside qui a la caractéristique de bien se fixer au site aglycone (Day et Whitters, 1986) et ne peut être clivé par l'enzyme mutée.

Cette approche a été exploitée pour deux différents donneurs glycosyl activés, soit l' α -galactosyl fluoré et l' α -glucosyl fluoré et ce pour un large spectre d'accepteurs. Le tableau 2 présente les différents produits obtenus suite à la glycosynthèse utilisant l' α -galactosyl fluoré. Excepté pour le β -xyloside où une liaison $\beta(1-3)$ est apparue, dans tous les autres cas une liaison $\beta(1-4)$ a été formée. Le produit en soi ne s'est pas présenté comme un bon accepteur. Cependant, dans le cas de la réaction de glycosynthèse utilisant l' α -glucosyl fluoré (Tableau 3), le produit résultant d'une première réaction de glycosynthèse s'est démontré comme un excellent accepteur pour une deuxième réaction de glycosynthèse. Des oligosaccharides de degré de polymérisation plus élevé ont donc été obtenus.

1.6.3 Endo-glycosidase de rétention

Les premiers essais de la réaction de glycosynthèse ayant été effectués avec l'enzyme mutée Glu358A la β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium* ont limité la synthèse d'oligosaccharides à l'utilisation de monosaccharides spécifiques comme sucres donneurs activés. En effet, cette enzyme est une exo-glycosidase. Cependant, la réaction de glycosynthèse a été évaluée par la suite pour une endo-glycosidase de rétention, soit l'enzyme 1,3-1,4- β -glucanase de *Bacillus licheniformis* (EC. 3.2.1.73) (Malet et Planas, 1998).

Tableau 2: Réaction de glycosynthèse envers différents sucres accepteurs lorsque l'enzyme mutée Glu358Ala d'*Agrobacterium* utilise l' α -galactosyl fluoré en tant que sucre donneur (tiré de Mackenzie *et al.*, 1998).

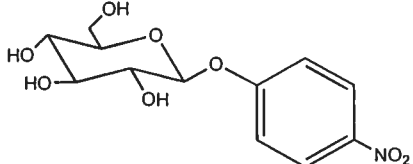
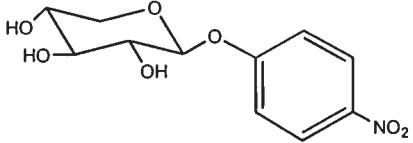
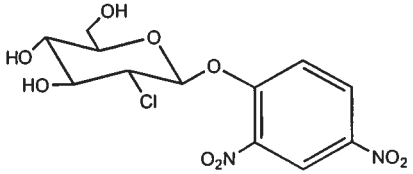
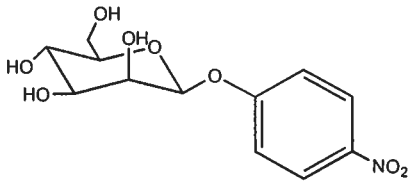
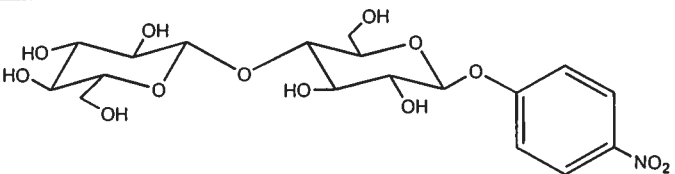
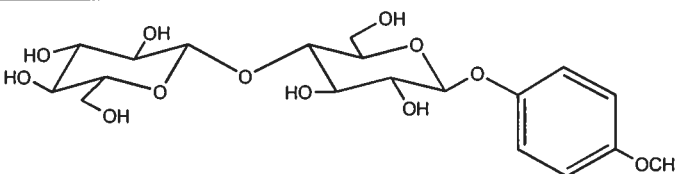
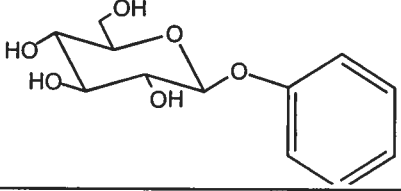
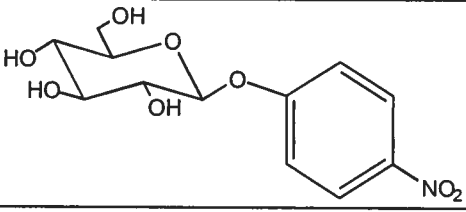
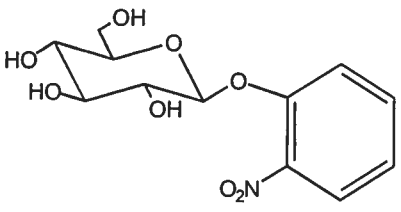
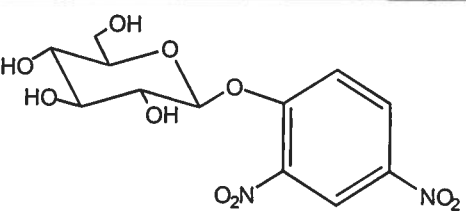
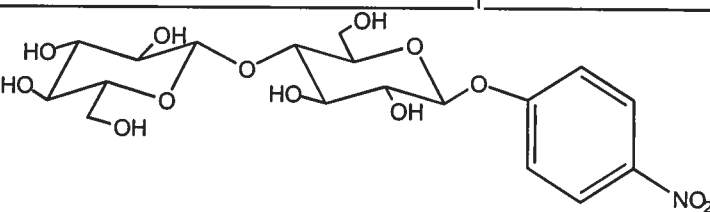
Accepteur	Produit Rendement %
	84%
	81%
	64%
	66%
Trisaccharide	
	92%
	88%

Tableau 3: Réaction de glycosynthèse envers différents sucres accepteurs lorsque l'enzyme mutée Glu358Ala d'*Agrobacterium* utilise l' α -glucosyle fluoré comme sucre donneur (tiré de Mackenzie *et al.*, 1998).

Accepteur	Produit (rendement %)			
	Di	Tri	Tetra	Total
	48%	34%	-	82%
	38%	24%	10%	72%
	41%	29%	6%	76%
	38%	42%	4%	84%
		79%	13%	92%

L'enzyme 1,3-1,4- β -glucanase possède la capacité d'hydrolyser les sucres β -glucans contenant des liaisons glycosidiques β -1,3 et β -1,4. L'enzyme est une glycosidase de rétention agissant par catalyse acido-basique selon un mécanisme de déplacement double (Malet *et al.*, 1993). Les deux résidus glutamate Glu138 et Glu134 ont été identifiés comme étant les résidus catalytiques acido-basique et nucléophile (Juncosa *et al.*, 1994). La mutation du résidu glutamate nucléophile en position 134 par une alanine a généré une enzyme ne possédant aucune activité glycosidique. De plus, suite à la mutation, l'enzyme mutée s'est vue conférer la capacité de catalyser de façon stéréo et régio-spécifique la réaction de glycosylation de l' α -laminaribiosyl fluoré avec différents glycosyls accepteurs. Étant une endo-glycosidase, des oligosaccharides de différents degrés de polymérisation ont donc pu être utilisés en tant que glycosyls donneurs pour la synthèse d'oligosaccharides. Des rendements de synthèse s'élevant à 90% ont été obtenus suite à la réaction de glycosynthèse avec cette endo-glycosidase de rétention spécifiquement mutée.

1.7 *Streptomyces lividans*

Streptomyces lividans est une bactérie filamenteuse du sol, Gram (+), qui synthétise et sécrète une grande variété d'enzymes extra-cellulaires. Parmi ces enzymes, plusieurs glycosyls hydrolases ont été identifiées ces dernières années dont des cellulases, mannanases et xylanases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>). Étant de la famille des glycosidases de rétention, ces enzymes sont donc d'excellentes candidates pour la réaction de glycosynthèse.

Parmi ces différentes enzymes, trois ont été ciblées dans le cadre de ce projet en vue de déterminer leur capacité à synthétiser des oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse, soit les xylanases A, B et C. Les gènes de ces enzymes sont déjà clonés et leur séquence est connue. De plus, les résidus d'acides aminés situés au site actif et comportant les groupements carboxyliques ont été identifiés.

1.7.1 Xylanases

Les xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) sont des glycosyles hydrolases qui possèdent la capacité de cliver la chaîne principale du xylane, un hétéropolymère de résidus xylose de liaison β -1,4. On regroupe les xylanases en deux familles, 10 et 11, selon l'homologie de séquence des acides aminés du domaine catalytique (Henrissat et Bairock, 1993). La xylanase A sécrétée par *Streptomyces lividans* appartient à la famille 10 tandis que les xylanases B et C sont membres de la famille 11. Malgré le fait que ces deux familles possèdent différentes structures, elles utilisent le mécanisme de rétention pour l'hydrolyse du lien xylosidique mais possèdent différentes spécificités envers les substrats (Biely *et al.*, 1993).

1.7.1.1 Xylanase A

La xylanase A de *Streptomyces lividans* (XlnA) est une endo-xylanase qui possède un poids moléculaire relatif de 43 kDa. Les deux résidus catalytiques de la XlnA ont été identifiés par mutagenèse dirigée. En position 128, le résidu glutamate agit comme catalyseur acido/basique tandis que le résidu glutamate en position 236 joue le rôle de nucléophile (Moreau *et al.*, 1994). De plus, l'identification de ces deux résidus catalytiques a été confirmée par la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la xylanase A (Derewenda *et al.*, 1994). Par ailleurs, la XlnA possède un domaine catalytique et un domaine de fixation au substrat lequel est le xylane insoluble (XBD). Afin d'étudier l'importance des mutations effectuées sur le domaine catalytique, une version de la XlnA constituée uniquement du domaine catalytique a été construite. Cette construction issue du plasmide pIAF932 code pour une nouvelle protéine de 32 kDa désignée xylanase A₂ (XlnA₂).

1.7.1.2 Xylanase B

La xylanase B de *Streptomyces lividans* (XlnB) est une enzyme extracellulaire de la famille 11 et qui possède un poids moléculaire relatif de 31 kDa (Kluepfel *et al.*, 1990). La XlnB agit de façon spécifique sur le xylane comme une endo-xylanase pour produire de courtes chaînes d'oligoxylosides. La position des deux résidus glutamate impliqués dans l'hydrolyse de la liaison xylosidique a été identifiée. Le résidu glutamate en position 177 a une fonction d'acide/base et le résidu glutamate en position 87 joue le rôle de nucléophile. Comme la XlnA, la XlnB possède un domaine catalytique et un domaine de fixation au substrat. Le plasmide pIAF935 a été mis au point et code seulement pour le domaine catalytique. De ce vecteur, une protéine de 23 kDa désignée xylanase B₂ (XlnB₂) est produite.

1.7.1.3 Xylanase C

La xylanase C de *Streptomyces lividans* (XlnC) est une enzyme de la famille 11 de type endo-xylanase (Kluepfel *et al.*, 1992). Elle possède un poids moléculaire relatif de 22 kDa et agit sur le xylane de façon similaire à la xylanase B soit en produisant des courtes chaînes d'oligoxylosides. Les deux résidus glutamate du site actif ont été localisés aux positions 177 et 85 et agissent en tant qu'acide/base et nucléophile respectivement. Contrairement aux XlnA et XlnB, la XlnC n'est constituée que d'un seul domaine et est produite à partir du plasmide pIAF936.

1.8 Objectifs du projet

Le but du projet est de déterminer la capacité des xylanases A₂, B₂ et C de *Streptomyces lividans* à synthétiser des oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse. Ce but implique de muter le résidu catalytique nucléophilique des trois enzymes pour ensuite produire et purifier les enzymes mutées. Les objectifs suivants sont de déterminer l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées, de synthétiser le sucre donneur

activé et finalement de tester la capacité des enzymes mutées à synthétiser des oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Souches bactériennes utilisées

2.1.1 *Streptomyces lividans*

La souche IAF10-164 a été utilisée pour la production des enzymes mutées. La particularité de cette souche est de ne plus posséder d'activité xylanasiqne et cellulasiqne. Elle provient de la souche sauvage *S. lividans* 1326 obtenue du Dr. Hopwood de l'institut John Innes, Norwich, Grande-Bretagne. Suite à une mutagenèse à l'aide de l'agent mutagène N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), la souche IAF10-164 a été obtenue de la souche 1326 (Mondou *et al.*, 1986).

2.1.2 *Escherichia coli*

La souche *E. coli* DH11S (mrr-RMS-mcrBC), Δ (lac-proAB), Δ (recA1398), deoR, rpsH, srl⁺, thi⁺/F⁺, proAB⁺, lac I^q Z Δ M15) a été utilisée en tant qu'hôte du phage M13 pour la production d'ADN simple brin servant au séquençage des gènes mutés.

2.2 Plasmides utilisés

2.2.1 Plasmide pC209

Le plasmide à copies multiples pC209 dérivé du plasmide pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) a été utilisé chez *S. lividans*. Il est constitué d'une origine de répliqcation des streptomycètes, d'un gène de résistance au thioestrepton permettant la sélection des transformants ainsi que du promoteur C109 non réprimé par le glucose (communications personnelles, François Shareck).

2.2.2 Plasmides pIAF932, pIAF935 et pIAF936

Les plasmides pIAF932, pIAF935 et pIAF936 ont servi de matrice lors de la mutagenèse dirigée par réaction de polymérisation en chaîne recombinante (PCR). Le plasmide pIAF932 a été utilisé pour l'amplification du gène de la XlnA₂ ainsi que du

peptide signal de la XlnA. Le plasmide pIAF935 a été utilisé pour l'amplification du gène de la XlnB₂ et du peptide signal de la XlnB. Finalement, le plasmide pIAF936 a été utilisé pour l'amplification du gène de la XlnC et du peptide signal naturel de la XlnC .

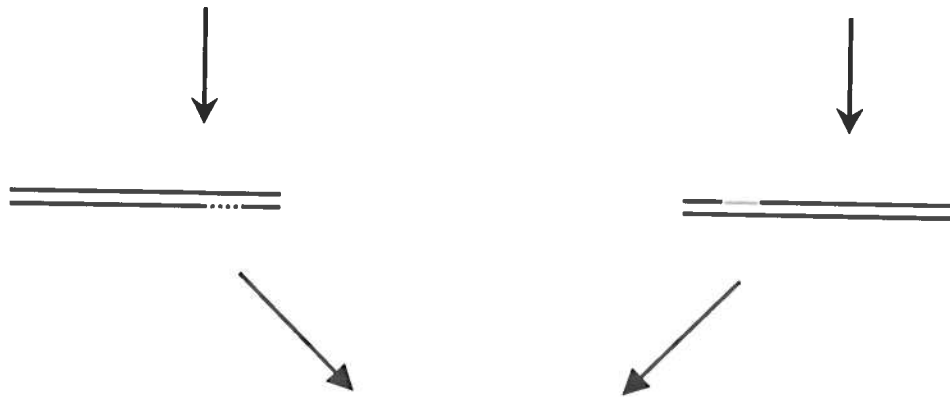
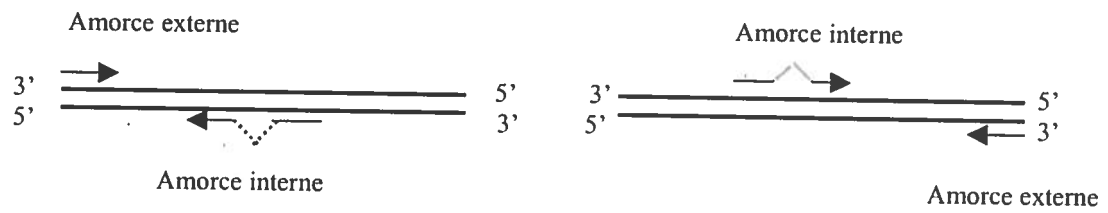
2.3 Conservation des souches

La conservation des souches de *S. lividans* s'effectue sur milieu solide Bennett-thiostrepton (annexe A : 0,1% (p/v) d'extrait de levure, 0,1% (p/v) d'extrait de boeuf, 0,2% (p/v) de NZ amine A, 1% (p/v) de maltose, 2% (p/v) de Bacto-Agar et 0,05% (p/v) de thiostrepton, pH 7,3) à 4°C ou sous forme lyophilisée dans des ampoules de verre, scellées sous vide et conservées à 4°C. La lyophilisation nécessite l'utilisation d'une suspension de spores provenant d'un milieu solide Bennett-thiostrepton. Après 7 jours d'incubation, les spores sont solubilisées dans une solution de lait écrémé 10% (p/v) puis lyophilisées.

2.4 Mutagenèse dirigée par PCR

La substitution du résidu glutamate jouant le rôle de nucléophile par le résidu alanine a été effectué par la mutation du codon glutamate à l'aide de la mutagenèse dirigée par la méthode de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) recombinante. Par cette méthode, le gène à muter est amplifié à l'aide de deux amorces internes comprenant la mutation et deux amorces externes. Tel qu'illustré à la figure 10, un premier PCR nécessitant l'ajout d'une amorce interne comprenant la mutation et d'une amorce externe est d'abord effectué dans la section 3' du gène. Simultanément mais séparément, la section 5' du gène est amplifiée de façon similaire. Les deux produits de PCR sont rassemblés et suite à une série d'hybridations et de dénaturations permettant le bon appariement, la polymérase synthétise à l'aide d'un second PCR le gène en entier avec la mutation à l'endroit désiré.

Les amorces externes et internes d'oligonucléotides ont été synthétisées à l'aide de l'appareil « Gene Assembler 4 Primers » de la compagnie Pharmacia. La liste des

1^{er} PCR2^{ième} PCR

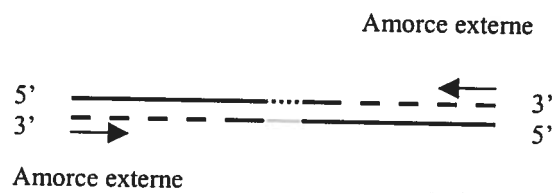
appariement



appariement



bon appariement



Polymérisation par
l'ADN polymérase *Pfu*

Figure 10: Principe de la mutagenèse dirigée par PCR.
(adapté de Innis *et al.*, 1990)

amorces d'oligonucléotides utilisées pour la substitution du résidu glutamate par une alanine des enzymes XlnA₂, XlnB₂ et XlnC est présentée au tableau 4. Dans le cas des amorces internes, le codon GAG (glutamate) a été muté pour GCG (alanine). Pour les amorces externes, une séquence de nucléotides comportant les sites de restriction *Sph*I ou *Sac*I a été ajoutée aux extrémités afin de permettre le clonage ultérieur des gènes mutés. La mutagenèse dirigée lors du premier PCR est effectuée dans un volume de 100 µL. Le milieu réactionnel est constitué du tampon à PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), de 4% (v/v) de propionamide, de 0,05% (v/v) de Tween 20, de 3 mM MgSO₄, de 0,2 mM de chaque désoxyribonucléoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), de 50 pmoles de chaque amorce, de 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* et d'environ 1 ng d'ADN matrice. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes à l'aide de l'appareil Genius Techne. La matrice d'acide désoxyribonucléique (ADN) est dénaturée à 95°C pendant 5 minutes. Il y a ensuite hybridation des amorces d'oligonucléotides à la matrice à 55°C pendant 5 minutes et polymérisation d'un nouveau brin d'ADN à 72°C pendant 3 minutes. L'étape suivante consiste en une dénaturation à 94°C pendant une minute, hybridation à 55°C durant une minute et polymérisation à 72°C pendant 3 minutes. Ce cycle est répété trente fois et finalement la réaction est terminée par une polymérisation à 72°C pendant 7 minutes.

La mutagenèse dirigée lors du second PCR est effectuée dans un volume de 100 µL. Le milieu réactionnel est le même que lors du premier PCR excepté que seules les deux amorces externes sont utilisées et que l'ADN matrice est remplacé par 2,5 µL des deux produits du premier PCR. Les conditions pour l'amplification sont des incubations de 5 minutes à 95°C, de 5 minutes à 55°C et de 3 minutes à 72°C. Ensuite, les mêmes incubations sont effectuées cinq fois mais pour des temps de 1 minute, 1 minute et 3 minutes respectivement. Les amorces externes sont ajoutées et une série de trente cycles des mêmes incubations est effectuée. La réaction est terminée par une incubation à 72°C pendant 7 minutes. Finalement, le produit final de PCR est purifié à l'aide de la trousse de purification « High Pure Product Purification Kit » de Boehringer Mannheim.

Tableau 4: Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée. Les mutations sont indiquées en caractères gras et soulignées.

Enzyme	Oligos	Séquence d'ADN	Mutation
XlnA₂	CD100	5'-GGGGCATGCGCTCCTACGCCCTTCCCAGATCAGG-3'	---
	CD101	5'-ATATAGAGCTCTCAGCCGTTGAGTG-3'	---
	CD137	5'-GGCCATCACC <u>G</u> CGCTGGACATCCAGGGC- 3'	E236A
	CD138	5'-GCCCTGGATGTCCAGC <u>G</u> CGGTGATGGCC- 3'	E236A
XlnB₂	CD300	5'-CGCATGCTGCTGCTCGTCCAGCCGAGGCG- 3'	---
	CD301	5'-CCCGAGCTCTCACCCGCCGACGTTGATGCT- 3'	---
	CD302	5'-CCGCTCGTCG <u>G</u> CTACTACATCGTCG- 3'	E87A
	CD303	5'-CGACGATGTAGTAC <u>G</u> CGACGAGCGG- 3'	E87A
XlnC	CD400	5'-GAACGCATGCAGCAGGACGGCACA- 3'	---
	CD401	5'-GGGGAGCTCTCAACCGCTGACGCTGATGTT- 3'	---
	CD402	5'-CCGCTGGTGG <u>G</u> CTACTACATCGTCG- 3'	E85A
	CD403	5'-CGACGATGTAGTAC <u>G</u> CCACCAGCGG- 3'	E85A

2.5 Sous-clonage des gènes chez *S. lividans*

2.5.1 Digestion avec des enzymes de restriction et électrophorèse

La digestion des plasmides et des produits de PCR se fait dans un volume final de 20 μ L de tampon « One-Phor-All » (10 mM Tris-acétate pH 7,5, 10 mM d'acétate de magnésium et 50 mM d'acétate de potassium) avec les enzymes de restriction appropriées, soit 4 U de l'enzyme *SacI* (Pharmacia) et 2 U de l'enzyme *SphI* (Pharmacia). Suite à la digestion à 37°C pendant 3 heures, les enzymes de restriction sont inactivées par incubation de 15 minutes à 85°C. Un volume de 2 μ L de tampon de chargement 6X est ajouté (0,25% (p/v) bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) de xylène cyanol et 30% (v/v) de glycérol dans une solution aqueuse). Afin d'isoler le plasmide ou le produit de PCR digérés, une migration dans un gel d'agarose 0,7% (p/v) en utilisant du tampon à électrophorèse Tris-Borate à pH 8,0 (TBE ; 89,15 mM Tris HCl, 88,95 mM acide borique et 2 mM EDTA) est effectuée.

2.5.2 Isolement d'ADN à partir d'un gel d'agarose

À l'aide de la trousse « Sephaglas BandPrep » (Pharmacia), un fragment d'ADN peut être isolé d'un gel d'agarose. Tout d'abord, la région du gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt est découpée et dissout par une incubation de dix minutes à 60°C à l'aide d'une solution concentrée d'iodure de sodium. Ensuite, une solution de « Sephaglas » (20% (p/v) de Sephaglas BP suspendu dans de l'eau distillée contenant 0,15% de Kathon CG/ICP biocide) est ajoutée au gel solubilisé afin de trapper l'ADN. Suite à une incubation de cinq minutes à la température de la pièce et d'une centrifugation de trente secondes à 13 000 g à la température de la pièce, le surnageant est enlevé. Le culot, contenant l'ADN trappé au niveau du « Sephaglas », est resuspendu dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 mM NaCl et 70% (v/v) d'éthanol. Après une centrifugation de trente secondes à 13 000 g à la température de la pièce, le surnageant est de nouveau enlevé. Cette étape est répétée deux fois et permet ainsi d'éliminer les contaminants. Finalement, au niveau du culot, l'ADN est élué de la matrice de

« Sephaglas » et récupéré dans un volume de 20 μL à l'aide d'un tampon de faible force ionique, soit le tampon d'élution 10 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM EDTA.

2.5.3 Ligation d'un vecteur et d'un fragment d'ADN

Les conditions réactionnelles suivantes sont utilisées pour la ligation du vecteur pC209 et des fragments digérés et purifiés en gel d'agarose: 1mM d'adénosine triphosphate (ATP), le tampon « One-Phor-All » (10 mM Tris-acétate pH 7,5, 10 mM d'acétate de magnésium, 50 mM d'acétate de potassium) et une unité d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia) dans un volume final de 20 μL . La ligation s'effectue avec 200 à 400 ng de vecteur et environ 0,5 μg d'insertion durant 16 heures à une température de 14°C.

2.6 Manipulations génétiques des souches

2.6.1 *S. lividans* 10-164

2.6.1.1 Transformation des protoplastes et sélection des transformants

Chez *S. lividans*, les protoplastes sont obtenus par la méthode de Hopwood *et al.* (1985). La transformation s'effectue en mélangeant de façon stérile un volume de 5 à 10 μL du produit de ligation avec 50 μL de protoplastes. Un volume de 200 μL d'une solution de polyéthylène glycol (PEG) 1500 est ajouté. Suite à une légère agitation, le mélange est incubé deux minutes à la température de la pièce et les cellules sont étalées sur milieu solide de régénération R5 (annexe B). Après incubation de 16 heures à 34°C, un volume de 1 mL d'une solution de 0,05% de thiostrepton est réparti uniformément sur chacun des pétris R5 et le tout réincubé à 34°C jusqu'à la croissance des colonies (72 heures). Ainsi, seules les cellules de *S. lividans* transformées avec l'ADN ont la capacité de résister au thiostrepton étant donné que le vecteur de clonage pC209 possède le gène de résistance à cet antibiotique.

2.6.1.2 Isolement de plasmides

Chez *S. lividans*, l'isolement de plasmides s'effectue selon la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985) avec quelques modifications apportées au protocole. Un volume de 1 mL d'une culture de 24 heures en milieu 2,75% (p/v) « tryptic soy broth » supplémenté de thiostrepton à 5 mg/mL est recueilli et centrifugé pendant une minute à 13 000 g à la température de la pièce. Le culot est resuspendu dans 500 μ L de la solution I (300 μ M sucrose, 25 mM Tris-HCl et 25 mM EDTA, pH 8,0). Suite à une centrifugation de 20 secondes à 13 000 g à la température de la pièce, les cellules du culot sont lysées par une incubation d'une heure à 37°C dans un volume de 400 μ L de la solution I supplémentée à 2 mg/mL de lysozyme. Ensuite, pour permettre la dénaturation de l'ADN, un volume de 250 μ L d'une solution contenant 300 mM de NaOH et 2% de SDS est ajouté. Le mélange est agité immédiatement au vortex, incubé à 70°C pendant 15 minutes et finalement laissé 30 minutes à la température de la pièce. Un volume de 100 μ L d'une solution phénol/chloroforme (50 g de phénol et 50 mg de 8-hydroxyquinoline dans 50 mL de chloroforme et 10 mL d'eau) est ajouté afin de coaguler les débris de membrane et les protéines. Après centrifugation de 3 minutes à 13 000 g à la température de la pièce, la phase aqueuse est récupérée. Un volume de 70 μ L d'une solution d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et un volume de 700 μ L d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter l'ADN. Mélangée par inversion, la solution est incubée 5 minutes à la température de la pièce et ensuite centrifugée 4 minutes à 13 000 g à la température de la pièce. Le culot asséché est dissous dans 50 μ L de TE (25 mM Tris-HCl pH 8,0 et 2,5 mM EDTA) et afin de dénaturer les protéines, 5 μ L de tampon acétate de sodium 3 M pH à 4,8 et 25 μ L de phénol neutre sont ajoutés. L'ADN de la phase aqueuse est de nouveau précipité avec 50 μ L d'isopropanol pendant 5 minutes à la température de la pièce. Finalement, l'ADN est dissous dans 50 μ L d'eau stérile.

2.6.2 *E. coli*

2.6.2.1 Préparation des cellules compétentes DH11S

Un inoculum de *E. coli* DH11S provenant d'un pétri Simmons-Citrate agar (annexe C : 2,42% (p/v) d'agar Simmons-citrate déshydraté, 0,4% (p/v) de glucose et 0,01% (p/v) de thiamine) est mis en culture dans 2,5 mL de milieu liquide 2xTY (annexe D : 1,6% (p/v) de Bacto-tryptone, 1% (p/v) d'extrait de levure et 0,5% (p/v) de chlorure de sodium) pendant 16 heures à 37°C sous agitation. De cette pré-culture, une culture 1/100 de *E. coli* DH11S est préparée. Cette culture est incubée avec agitation à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit de 0,25 à 0,50. La culture est laissée sur la glace pendant 15 minutes et ensuite centrifugée à 4°C pendant 15 minutes à 750 g. Le culot est resuspendu dans 83 mL de tampon CBI (0,1 M KCl, 60 mM CaCl₂, 30 mM acétate de potassium et 15% (v/v) glycérol, pH 5,8) et laissé sur glace pendant une heure. Suite à une centrifugation de 15 minutes à 4°C à 800 g, le culot est resuspendu dans 10 mL de tampon CBII (10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS et 15% (v/v) glycérol, pH 6,8) et laissé sur glace pendant 15 minutes. Finalement, les cellules compétentes *E. coli* DH11S sont aliquotées dans des tubes Eppendorf stériles, congelées dans la glace sèche et conservées à -80°C.

2.6.2.2 Transformation

Avant de procéder à la transformation de *E. coli*, il est nécessaire de préparer une pré-culture de bactéries *E. coli* DH11S. Deux jours avant la transformation, un inoculum de *E. coli* DH11S provenant d'un pétri Simmons-Citrate agar est donc mis en culture dans 5 mL de milieu liquide 2xTY. Cette pré-culture est incubée avec agitation, à 37°C pendant 16 heures. À partir de la pré-culture de 5 mL réalisée la veille, une culture 1/10 de *E. coli* DH11S est préparée. Cette nouvelle culture est incubée avec agitation à 37°C pendant 3 heures et est utilisée lors de la transformation.

La transformation s'effectue selon la méthode décrite dans Sambrook *et al.*, (1989) à l'aide de bactéries DH11S compétentes. Un volume de 300 µL de bactéries

DH11S compétentes est mélangé avec 10 μL du produit de ligation. Suite à une incubation sur glace durant 40 minutes, le mélange est à nouveau incubé mais à 42°C pendant 2 minutes. Différents volumes du mélange, soit de 50, 100 et 150 μL , sont ajoutés à 3 mL d'un milieu H (annexe E: 1,2% (p/v) d'agar, 1% (p/v) de Bacto-tryptone et 0,8% (p/v) de chlorure de sodium). Ensuite, 300 μL de cellules de fond de *E. coli* (tel que décrit précédemment) sont ajoutés. Enfin, 10 μL d'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) 100 mM et 50 μL de 2% de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) dans du diméthylformamide sont aussi ajoutés. Le mélange est finalement coulé sur des pétris de milieu solide H contenant 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline et incubé à 37°C pendant 16 heures.

2.6.2.3 Isolement de plasmides

La trousse « FlexiPrep » de la compagnie Pharmacia permet l'isolement de plasmides chez *E. coli*. D'une culture de 16 heures à 37°C dans un milieu liquide 2xTY, un volume de 1,5 mL est recueilli et centrifugé pendant 3 minutes à 13 000 g à la température de la pièce. Le culot de bactéries est suspendu dans 200 μL d'une solution isotonique contenant 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM d'EDTA et 400 $\mu\text{g/mL}$ de RNase I. Afin de permettre la lyse des cellules bactériennes ainsi que la dénaturation des protéines et de l'ADN chromosomique, 200 μL d'une solution de 1 M NaOH et de 5,3% (p/v) SDS sont ajoutés. Le mélange est neutralisé par l'ajout de 200 μL de tampon acétate de potassium (3 M de potassium et 5 M d'acétate). Suite à une centrifugation de 5 minutes à 13 000 g à la température de la pièce, l'ADN plasmidique du surnageant est précipité par une incubation de 10 minutes à la température de la pièce suite à l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol.

L'étape suivante consiste en la purification de l'ADN. Le culot est dissous dans 150 μL d'une solution de « Sephaglas FP » contenant 7 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 10 mM EDTA. L'ADN plasmidique se lie à la matrice de « Sephaglas FP ». Suite à une centrifugation à 13 000 g pendant 15 secondes à la température de la

pièce, le culot (ADN-Sephaglas) est resuspendu dans 200 μL d'une solution contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl et 60% (v/v) d'éthanol afin d'éliminer les contaminants. Le tout est centrifugé à 13 000 g pendant 15 secondes à la température de la pièce. Le culot est resuspendu dans 300 μL d'éthanol 70% (v/v) afin d'éliminer les contaminants résiduels. Enfin, suite à une centrifugation de 15 secondes à 13 000 g à la température de la pièce, l'ajout de 50 μL d'un tampon de faible force ionique 100 mM Tris-HCl pH 7,5 et 10 mM EDTA au niveau du culot permet d'éluer l'ADN plasmidique.

2.7 Criblage des transformants chez *S. lividans*

Suite à la transformation dans *S. lividans*, les transformants obtenus sur milieu R5 sont repiqués sur le milieu solide RBB-xylane (annexe F) supplémenté de thiostrepton à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et le plateau incubé à 34°C pendant 72 heures. La sélection des transformants est basée sur l'absence d'une zone d'éclaircissement. En effet, lorsqu'un transformant possède une activité d'hydrolyse, une zone d'éclaircissement apparaît autour de la colonie. Suite à la mutation, l'activité d'hydrolyse est en théorie complètement inactivée. Ainsi, suite au repiquage sur milieu solide RBB-xylane, seuls les transformants ne possédant pas la capacité d'hydrolyser le xylane, donc ne démontrant aucune zone d'éclaircissement, ont été sélectionnés.

2.8 Séquençage des gènes

2.8.1 Sous-clonage dans M13

Afin de démontrer que seule la mutation désirée est présente, les gènes mutés sont séquencés. Le plasmide est donc digéré à l'aide des enzymes de restriction *SphI* et *SacI* libérant ainsi le gène muté. Après migration sur un gel d'agarose 1% (p/v), la région du gel correspondant au gène muté est découpé et l'ADN est extrait du gel par une purification à l'aide de la trousse « QIAEX II » de Qiagen. L'ADN des phages M13mp18 et M13mp19 est aussi digéré avec les enzymes de restriction *SphI* et *SacI* et les enzymes

inactivées par la suite par une incubation de 20 minutes à 85°C. Finalement, dans un volume de 20 µL de tampon « One-Phor-All » 2X contenant 2 µL d'ATP 10 mM, 1 U d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia), le gène muté est ligué avec l'ADN phagique M13mp18 et M13mp19.

2.8.2 Transfection

Selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989), des cellules compétentes de la souche *E. coli* DH11S sont préparées et transfectées avec 15 µL de la solution de ligation. Ensuite, les cellules transfectées sont mélangées à 3 mL de gélose molle fondue (10 g de Bacto-tryptone, 8 g de NaCl et 8 g d'agar par litre d'eau distillée) contenant 300 µL de cellules d' *E. coli* DH11S provenant d'une culture en phase exponentielle, 10 µL d'IPTG 100 mM et 50 µL de X-Gal 2% (p/v) dans du diméthylformamide (DMF). Après répartition sur une plaque de milieu H solide, le tout est incubé 16 heures à 37°C.

2.8.3 Production et purification de l'ADN simple brin

Les plages de lyse blanches sont repiquées avec des cure-dents stériles dans 1.5 mL de milieu 2xTY alimenté d'un inoculum de 1% (p/v) de cellules DH11S provenant d'une culture de 16 heures. Suite à une incubation à 37°C avec agitation pendant 5 ou 6 heures, la culture est centrifugée 10 minutes à 15 000 g à la température de la pièce. Au surnageant constitué des particules phagiques, 250 µL d'une solution de 20% (p/v) PEG 6000 et 2.5 M NaCl sont ajoutés. Après avoir mélangé par inversion, les échantillons sont incubés à 4°C pendant une heure. Une centrifugation de 10 minutes à 15 000 g à la température de la pièce permet de récupérer les phages au niveau du culot. Le culot est séché à l'air puis resuspendu dans 100 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Un volume de 50 µL d'une solution phénol/chloroforme est ajouté afin d'extraire les protéines et les impuretés. Le tout est agité 10 secondes au vortex et incubé 15 minutes à la température de la pièce. Un volume de 50 µL de chloroforme est ajouté, la solution mélangée et incubée 5 minutes à la température de la pièce. Suite à une

centrifugation de 5 minutes à 15 000 g à la température de la pièce, la phase aqueuse est transférée dans un eppendorf. À la phase aqueuse est ajouté 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95% (v/v). Suite à une incubation de 30 minutes à -20°C et une centrifugation de 15 minutes à 15 000 g à la température de la pièce, le culot est séché et dissous dans 30 µL d'eau distillée.

2.8.4 Protection à la nucléase S1

Un test de protection à la nucléase S1 est effectué afin de vérifier que le fragment *SphI-SacI* est présent au sein de l'ADN simple brin. Un volume de 1 µL d'ADN simple brin issu du sous-clonage dans l'ADN du phage M13mp18 est mis en présence d'un volume de 1 µL du brin complémentaire provenant de l'ADN du phage M13mp19. Un volume de 2 µL de 2 M NaCl est ajouté et le tout complété à 8 µL avec de l'eau distillée. Le tube est par la suite incubé à 90°C pendant trois minutes et lentement refroidi à la température de la pièce. Suite à une centrifugation de 5 secondes à 13 000 g à la température de la pièce, 2 µL d'un tampon S1 5X (0,5 M Acétate de sodium pH 4,6, 45 mM ZnSO₄) et 1 µL de nucléase S1 (1 U/µL) sont ajoutés. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C, un volume de 2 µL d'un tampon de chargement pour électrophorèse est ajouté. En présence de nucléase S1, l'ADN simple brin est digéré tandis que l'ADN double brin reste intact. Ainsi, les fragments complémentaires ayant hybridé sont résistants à la digestion par la nucléase S1 et le résultat est observé sur le gel d'agarose 0.7% (p/v). Finalement, l'ADN simple brin des gènes mutés est séquencé afin de s'assurer que seule la mutation désirée est présente. Le séquençage a été effectué par le service de séquençage de la compagnie Bio S&T (5020 Fairway, Lachenaie, Québec, H8T 1B8).

2.9 Production des enzymes mutées

2.9.1 En erlenmeyers

Les productions des enzymes mutées XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A ont été préalablement effectuées en petits volumes de 12,5 mL. De façon stérile, les spores obtenues sur milieu solide Bennet sont récoltées et inoculées dans 12,5 mL de milieu M15 (annexe G) auquel 1% (p/v) de glucose, 0,03% (p/v) de MgSO₄, 0,03% (p/v) de CaCl₂ et 5 µg/mL d'antibiotique thiostrepton ont été ajoutés. Après incubation à 34°C avec agitation à 240 rpm pendant 48 heures, un volume de 1 mL de la culture est recueilli en vue d'un isolement ultérieur du plasmide (section 2.5.1.2). Le volume restant de culture est centrifugé et une aliquote du surnageant est prélevée pour évaluer la production d'enzyme par SDS-PAGE (Laemmli, 1970) et immunobuvardage de type Western (Towbin *et al.* 1979) (voir les sections 2.10.2 et 2.10.3).

2.9.2 En fermenteurs

Lorsque les clones possédant seulement la mutation désirée et produisant l'enzyme mutée ont été identifiés suite à la production en Erlenmeyers, ils ont été lyophilisés (section 2.2 conservation des souches). De ces souches, des productions en plus grand volume ont été effectuées en fermenteur afin de produire une quantité plus appréciable d'enzymes mutées. Pour chacun des clones, (pIAF932-E236A, pIAF935-E87A et pIAF936-E85A) une ampoule a été utilisée pour ensemercer deux milieux de culture liquide « tryptic soy broth » de 25 mL contenant 5 µg/mL de thiostrepton. Après 24 heures d'incubation à 34°C et sous agitation à 240 rpm, les milieux de culture ont été centrifugés à 6000 g à la température de la pièce pendant dix minutes. Les culots ont été recueillis, lavés deux fois avec du milieu M14 (annexe H) puis resuspendu dans 500 mL du même milieu M14 additionné de 2% (p/v) xylose, 0,3% (p/v) MgSO₄, 0,3% (p/v) CaCl₂ ainsi que 5 µg/mL de thiostrepton. Suite à une incubation de 48 heures à 34°C sous agitation à 240 rpm, la culture a été transvidée dans un fermenteur (Microferm® Fermentor) contenant 7 litres de milieu M14 additionné de 1% (p/v) xylose mais sans

thiostrepton. Une incubation de 72 heures a été effectuée à 34°C sous agitation à 400 rpm avec un volume d'air de 10 Litres/minute.

2.10 Purification des enzymes mutées

2.10.1 Ultrafiltration à débit tangentiel

Suite à la production des enzymes mutées dans un volume de 7 L en fermenteur, le surnageant de culture est filtré sur papier Whatman No. 1 et ensuite sur capsule sartopure de porosité 0,2 μm (Sartorius). Ensuite, une ultrafiltration à débit tangentiel permettant de concentrer le filtrat du surnageant de culture à un volume d'environ 500 mL est effectuée. L'appareil Pellicon® de la compagnie Millipore® constitué d'une cassette d'une surface totale de 5 pieds carrés composée de membranes à ultrafiltration de type OMEGA™ de porosité de 3 kDa est utilisé. Le surnageant de culture est concentré dans un tampon 50 mM de citrate de sodium pH 6,0.

2.10.2 Dialyse

Le surnageant concentré par ultrafiltration à débit tangentiel est dialysé contre 18 litres de tampon acétate 10 mM pH 4,0 pendant 16 heures à 4°C en utilisant des sacs à dialyse SpectraPor (Spectrum) de porosité 3,5 kDa.

2.10.3 Échangeurs d'ions

Suite à la dialyse, une purification par chromatographie échangeuse de cations est effectuée. La colonne carboxyméthyl sépharose AP2 (WATERS) est utilisée avec le système de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) de Waters (Millipore) modèle 625 LC. La colonne est équilibrée dans du tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4,0 à un débit de 48,9 cm/h. Un échantillon préalablement filtré sur une membrane de porosité de 0,2 μm et constitué d'une quantité d'environ 200 mg de protéines est injecté et adsorbé sur la colonne à un débit de 48,9 cm/h. Les protéines ne s'accrochant pas à la colonne sont éluées avec du tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4,0 à un débit de

48,9 cm/h. Par la suite, les protéines adsorbées sont éluées dans le tampon acétate de sodium 50 mM pH 4,0 à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M durant 55 minutes (Tableau 5).

Les fractions ont été récoltées à l'aide d'un collecteur de fractions Frac-300 de Pharmacia Fine Chemicals. L'éluion des protéines a été suivie par absorbance à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV de Waters modèle 484. Les fractions contenant l'enzyme mutée, déterminées par SDS-PAGE et par le profil d'éluion, ont ensuite été réunies et concentrées à environ 15 mg/mL sur une membrane de porosité de 3 kDa de type OMEGA™ de la compagnie Filtron avec le système Amicon modèle 8200.

Tableau 5: Programme d'éluion sur la colonne CM-sépharose AP2 à un débit linéaire de 48,9 cm/h des enzymes mutées XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A.

Temps (min)	% A*	% B*
Initial	100	0
5	100	0
50	50	50
60	0	100
90	0	100
100	100	0
120	100	0

- * A: Tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4,0
B: Tampon A contenant 1M NaCl

2.10.4 Tamis moléculaire

Suite à la chromatographie échangeuse d'ions, une chromatographie sur tamis moléculaire a été effectuée à l'aide d'une colonne Superdex 75 HR de Pharmacia LKB

(2,5 cm x 70 cm) ayant des limites inférieure et supérieure respectives de 3 kDa et de 70 kDa. L'échantillon protéique a été injecté à l'aide de l'injecteur Pharmacia avec un tampon phosphate 100 mM à pH 6,0 comme phase mobile. L'élution a été suivie par absorbance à 280 nm à l'aide d'un détecteur Pharmacia UV-1 et des fractions de 4 mL ont été récoltées avec un collecteur de fractions Pharmacia LKB Frac-100. Les fractions contenant l'enzyme mutée (vérifiées par SDS-PAGE) ont été combinées et concentrées par une filtration sur une membrane Amicon de porosité de 3 kDa. Par la suite, l'échantillon protéique a été dilué dans un volume de 350 mL d'eau Milli-Q et filtré de nouveau sur une membrane Amicon d'une porosité de 3 kDa. Cette étape a été effectuée à trois reprises afin d'éliminer les sels du tampon phosphate. L'échantillon protéique a finalement été lyophilisé afin d'obtenir la protéine sous forme poudreuse.

2.11 Analyse des protéines

2.11.1 Dosage des protéines

La méthode développée par Lowry *et al.* (1951) est utilisée pour le dosage total des protéines. La fraction V de l'albumine de sérum bovin (BSA) a servi de standard.

2.11.2 SDS-PAGE

Les protéines ont été analysées sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12,5% (p/v) à l'aide d'un appareil Mini Protean II (Bio Rad). Les gels de concentration (4%) et de séparation (12,5%) et les échantillons sont préparés selon la méthode de Laemmli (1970) avec quelques modifications. À un volume de 12 μ L de l'échantillon est ajouté un volume de 3 μ L de tampon de chargement 5X (10% (p/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 50% (p/v) glycérol, 20% (v/v) β -mercaptoéthanol, 0,05% (p/v) bleu de bromophénol). Suite à une incubation à 95°C pendant 7 minutes, l'échantillon est chargé sur le gel et la migration effectuée pendant 140Vh.

2.11.3 Immunobuvardage

La méthode développée par Towbin *et al.* (1979) est utilisée pour le transfert électrophorétique de type Western et la détection immunologique. Ainsi, pendant une heure et sous un courant électrique de 100 volts (appareil Mini-transblot de BioRad), les protéines préalablement séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (S&S NC^{MC}, Schleicher et Schuell 45 μ M). Les sites qui ne sont pas occupés par des protéines sur la membrane de nitrocellulose sont bloqués par une incubation de 30 minutes dans un volume de 50 mL d'un tampon TBS (20 mM Tris-HCl et 500 mM NaCl, pH 7,5) contenant 3% (p/v) de gélatine. Suite à trois lavages successifs de 15 minutes avec un tampon TBS contenant 0,05% (v/v) de Tween 80, la membrane est incubée pendant une heure dans ce même tampon auquel a été ajouté les anticorps de lapin anti-XlnA₂ ou anti-XlnB₂ ou anti-XlnC. Suite à trois autres lavages identiques aux précédents, la membrane est incubée pour une période d'une heure dans le tampon TBS contenant 0,05% (p/v) de Tween 80, 0,1% (p/v) de gélatine et les anticorps secondaires (anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline). La membrane est lavée par la même technique précédente, incubée 5 minutes dans le tampon TBS et finalement incubée dans la solution de développement (15 μ L de solution stock de chlorure de nitro bleu tétrazolium/ phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, sel de toluidine (NBT/BCIP) (Boehringer Mannheim) et 10 mL d'une solution contenant 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂ • 6 H₂O et 100 mM NaCl, pH 9,5).

2.12 Détermination de l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées

Suite à la substitution au site actif du résidu nucléophile, l'activité enzymatique d'hydrolyse des enzymes mutées XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A a été évaluée envers deux substrats, le xylopentaose (X5) et le xylane, et comparée avec l'activité d'hydrolyse de l'enzyme sauvage respective. Les tests ont été effectués avec 20 mM de X5 et 4,5 mg/mL de xylane de bouleau dans un tampon citrate de sodium 50 mM pH 6,0 pendant 60 minutes à une température de 60°C et où une concentration de 1X correspond à 14,8 nM d'enzyme. Un échantillon ne contenant pas d'enzyme a servi de témoin. Suite à une dilution appropriée, l'analyse des sucres oligoxylosides produits

de degré de polymérisation de 1 à 9 (X1-X9) a été effectuée par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance.

Un volume de 100 μ L des échantillons a été injecté sur une colonne échangeuse d'anions Dionex CarboPac PA1 (4 x 250mm). Un système Dionex DX-500 équipé d'un détecteur électrochimique (ED40) relié au logiciel PeakNet chromatography Workstation et un auto-échantillonneur AS3500 de Thermo Separation Products a permis l'analyse des sucres produits. Une solution de 200 mM d'hydroxyde de sodium a servi d'éluant. Les différents oligosaccharides ont été séparés à l'aide d'un gradient linéaire d'une solution de 500 mM d'acétate de sodium dans 200 mM d'hydroxyde de sodium. Une courbe standard de sucres purs (X1-X9) obtenue suite à une analyse dans les mêmes conditions a permis d'identifier et de déterminer la concentration d'oligoxylosides produits.

2.13 Préparation du sucre donneur activé

Le sucre donneur activé préparé pour la réaction de glycosynthèse est un sucre fluoré au carbone anomérique (position 1 du sucre) et de configuration α . Le substrat de départ utilisé pour la fluoration est le sucre xylobiose isolé d'un hydrolysat de xylane. Tel qu'illustré à la figure 11, la fluoration comporte trois étapes générales soit la protection des groupements hydroxyles par acétylation (1), la fluoration au carbone anomérique (2) et la désacétylation (3).

2.13.1 Hydrolysat de xylane

À une solution tampon 50 mM phosphate de sodium pH 6,0 contenant 4% (p/v) de xylane de bouleau est ajouté 1000 U de XlnA₂. Après une incubation de 4 jours sous agitation à 37°C, l'hydrolysat de xylane est chauffé pendant 5 minutes à 95°C et déposé sur glace environ une heure. Suite à une centrifugation à 4000 g pendant 30 minutes à la température de la pièce, le surnageant est décanté et lyophilisé. Le xylobiose est séparé et purifié par tamis moléculaire (Bio Gel P2 Fine Biorad, colonne de 2 m de haut x 2,56 cm

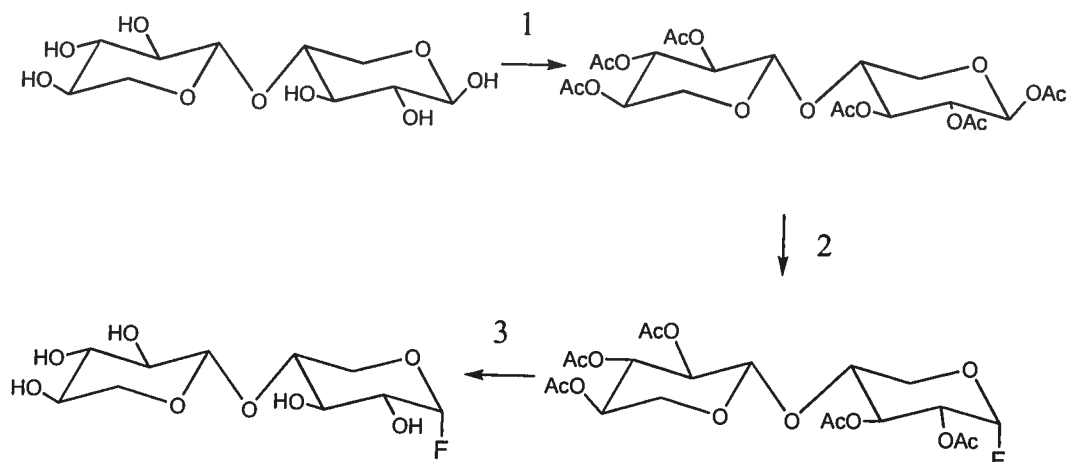


Figure 11: Synthèse du 1- α -fluoroxyllobiose.

Légende: Ac = Groupement acétyl ; F= Fluor

de diamètre, détecteur réfractomètre ALTEX 156, enregistreur Linear instrument, collecteur Retreiver II).

2.13.2 Protection des groupements hydroxyles par acétylation

Les groupements hydroxyles du xylobiose ont été protégés par acétylation. Dans 6 mL de N,N-diméthylformamide (DMF) anhydre est dissout 175 mg de sucre et 700 mg de 4-diméthylaminopyridine servant de catalyseur. Sous atmosphère d'azote, une solution constituée de 4 mL de DMF anhydre et de 520 μ L d'anhydride acétique est ajoutée goutte à goutte. Le suivi de la réaction s'effectue par chromatographie sur couche mince (CCM) avec l'éluant 2 : 1 acétate d'éthyle : hexane. Le révélateur cérique (annexe I: 2% (p/v) molybdate d'ammonium, 0,83% (p/v) sulfate de cerium et 9% (v/v) acide sulfurique) permet de distinguer les distances de migration des différents sucres. Le mélange est

laissé sous agitation à l'aide d'une pile magnétique pendant toute une nuit. Le lendemain, l'absence du composé de départ est vérifiée par CCM.

Une étape d'extraction permet la séparation du produit désiré (sucre acétylé) du produit initial (sucre) et certains autres composés (DMF, acide acétique). Le mélange réactionnel est transvidé dans une ampoule à décantation dans laquelle sont ajoutés 30 mL d'eau milliQ et 20 mL d'acétate d'éthyle. Il y a apparition de deux phases, soit la phase organique contenant le produit désiré (xylobiose acétylé), et la phase aqueuse contenant le xylobiose résiduel, le DMF et l'acide acétique. Après agitation d'une minute et repos jusqu'à séparation des deux phases, les phases organiques et aqueuses sont récupérées séparément. La phase aqueuse est réextraite quatre autres fois avec 20 mL d'acétate d'éthyle. Ensuite, les phases organiques extraites sont combinées et transvidées dans une ampoule à décantation. Un lavage par extraction à l'eau est par la suite effectué deux fois avec 30 mL d'eau milliQ. Une quantité de 5 g de sulfate de sodium est ajoutée et le tout laissé au repos 10 minutes afin de bien déshydrater la solution d'acétate d'éthyle contenant le xylobiose acétylé. Une chromatographie sur couche mince permet de confirmer la disparition du composé de départ.

Ensuite, la solution est filtrée sur du sulfate de sodium dans un ballon rond pré-pesé de 100 mL. La solution est par la suite évaporée au rotavapor jusqu'à l'obtention d'une huile jaune translucide. L'évaporation est terminée à l'aide de la pompe à vide et la quantité du produit de synthèse brut est évalué. Le produit de synthèse brut est finalement solubilisé dans un volume de 5 mL d'un mélange 1:1 acétate d'éthyle: hexane et gardé au congélateur jusqu'à l'étape de purification du produit de synthèse brut.

La purification du sucre acétylé sous forme brute s'effectue par chromatographie sur gel de silice en utilisant une colonne de silice de 45 cm de haut x 2,2 cm de diamètre et une matrice de silice de 200-425 mesh. Avec une pression d'azote de 1 PSI, un volume de 100 mL d'un mélange 1:1 acétate d'éthyle et hexane est tout d'abord passé sur la colonne et éluée jusqu'à un niveau d'environ 2 mm au-dessus du sable. La solution de 5 mL constituée du produit de synthèse brut (section 2.12.2.2) est par la suite transvidée sur

la colonne et éluée jusqu'à un niveau de 2 mm au-dessus du sable avec une pression d'un PSI d'azote. Un volume de 5 mL d'acétate d'éthyle et d'hexane (1:1) est ajoutée ensuite sans perturber le sable et éluée jusqu'à un niveau de 2 mm au-dessus du sable. Afin que le produit de synthèse brut s'infilte correctement dans la silice, cette étape est répétée quatre autres fois. L'élution s'effectue avec 100 mL d'acétate d'éthyle et d'hexane (1:1), 300 mL d'acétate d'éthyle et d'hexane (2:1) et enfin 200 mL d'acétate d'éthyle. Des volumes de 15 mL sont récoltés dans des éprouvettes lors de l'élution. La présence du produit de synthèse purifié au niveau des différentes éprouvettes est déterminé par CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2:1). La révélation s'effectue avec le révélateur cérrique. Les fractions contenant le produit de synthèse purifié sont transvidées dans un ballon rond pré-pesé de 100 mL. L'évaporation sous vide permet d'obtenir le sucre acétylé pur sous forme solide. Le pourcentage de rendement est déterminé.

2.13.3 Fluoration au carbone anomérique

La fluoration au carbone anomérique et sous une configuration α du xylobiose acétylé s'effectue en mettant en système fermé le sucre acétylé en présence d'un mélange (7: 3) de fluorure d'hydrogène et de pyridine (Malet et Planas, 1998). Après une période déterminée (8 ou 24 heures), la pyridine est évaporée et le sucre acétylé fluoré dissout dans le dichlorométhane. Le sel de pyridine insoluble est éliminé par filtration sur entonnoir fritté. Une chromatographie sur couche mince avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2:1) permet d'identifier les différents produits de synthèse. Le sucre acétylé fluoré est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant une colonne de silice de 45 cm de haut x 2,2 cm de diamètre et une matrice de silice de 200-425 mesh avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (3:1). Par CCM avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (3 :1), les fractions contenant le sucre acétylé fluoré sont identifiées et rassemblées dans un ballon pré-pesé. Suite à l'évaporation, le pourcentage de rendement de la réaction est déterminé.

2.13.4 Déprotection des groupements hydroxyles par désacétylation

Le sucre fluoré est obtenu par désacétylation des groupements hydroxyles du sucre acétylé fluoré. Le sucre acétylé fluoré est dissout dans un volume de 20 mL de méthanol anhydre. La solution est mise en présence d'un faible débit d'ammoniaque. Après 20 minutes, une CCM avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (1: 2) permet de confirmer la disparition du composé de départ. En effet, le produit de synthèse ne migre pas dans ces conditions ($R_f=0$). Le mélange est laissé sous agitation à l'aide d'une pile magnétique pendant dix minutes. La solution est ensuite évaporée et 10 mL de méthanol est ajouté. Une CCM à l'aide de l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle (4:3:10) avec comme référence le sucre sous forme non fluoré (X2) permet d'identifier le sucre fluoré. Le méthanol est ensuite évaporé presque à sec au rotavapor afin d'éliminer les dernières traces d'ammoniaque et d'acide acétique. Le rendement final est déterminé.

2.13.5 Purification par chromatographie préparative sur couche mince du sucre donneur activé fluoré

Le xylobiose fluoré obtenu suite à la déprotection des groupements hydroxyles par désacétylation a été utilisé pour les tests de glycosynthèse (section 2.14.1). Ce sucre donneur activé a été désigné comme le xylobiose fluoré sous forme brute. Cependant, lors d'une seconde synthèse du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose, une étape supplémentaire de purification, soit une purification par chromatographie préparative sur couche mince (plaque de verre de 20 cm x 20 cm constituée d'un gel de silice 60 F254 d'une épaisseur de 1 mm) a par la suite permis d'obtenir le xylobiose fluoré sous une forme beaucoup plus pure. L'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle (4: 3: 10) a été utilisé pour la migration. Une partie de la couche mince (1cm de largeur x 20 cm de longueur) a été révélée avec le révélateur cérrique afin d'identifier la distance de migration du xylobiose fluoré. Cette mesure a permis d'aller récupérer au niveau de la couche mince la silice constituée du xylobiose fluoré. Ensuite, le xylobiose fluoré a pu être récupéré au niveau de la silice par une élution à l'aide de méthanol.

2.14 Analyse du sucre donneur activé

Les méthodes de chromatographie échangeuse d'anions à haute performance, chromatographie sur couche mince et l'analyse par spectre de masse ont été utilisées pour déterminer la pureté du sucre donneur activé et aussi afin de vérifier si le produit est du 1-fluoroxylobiose.

2.14.1 Chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC)

La pureté du sucre donneur activé a été évaluée par HPEAC. Le système Dionex DX-500 équipé d'un détecteur électrochimique (ED40) relié au logiciel PeakNet chromatography Workstation et un auto-échantillonneur AS3500 de Thermo Separation Products a permis l'analyse. Le sucre 1- α -fluoroxylobiose n'étant pas disponible commercialement, aucun contrôle positif n'a pu être utilisé. Le xylobiose et le xylose ont été utilisés comme référence. Un volume de 100 μ L constitué de 500 μ M de sucre a été injecté pour chaque échantillon sur la colonne échangeuse d'anions Dionex CarboPac PA1 (4 x 250mm). De l'eau milliQ et une solution d'hydroxyde de sodium 200 mM ont servi d'éluants. Le profil d'élution, tel qu'illustré au tableau 6, a été utilisé.

Tableau 6: Profil d'élution par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC) à un débit linéaire de 4,77 cm/h de l'analyse du sucre donneur activé purifié.

Temps (minutes)	NaOH 200 mM	Eau
Initial	3%	97%
10	3%	97%
15	97%	3%
40	97%	3%
40,5	3%	97%
60	3%	97%

2.14.2 Chromatographie sur couche mince

La pureté du sucre donneur activé a aussi été déterminée par chromatographie sur couche mince. Le mélange méthanol, eau et acétate d'éthyle (4: 3: 10) a été utilisé comme éluant pour la migration des différents produits. Le xylose et le xylobiose ont été utilisés comme référence. Une quantité d'environ 10 mM de sucre a été déposée sur la couche mince. Une coloration au révélateur cérrique a permis la révélation des produits.

2.14.2 Spectre de masse

L'analyse au spectre de masse a permis d'évaluer la masse du sucre donneur activé purifié et ainsi d'identifier si ce dernier est du 1-fluoroxylbiose. Le système Quattro II de Micromass a permis l'analyse des échantillons. L'injection des échantillons a été effectuée manuellement en electrospray et mode négatif. Le sucre donneur activé a été analysé à une concentration de 1 mM dans une solution 4 mM d'acétonitrile. Une solution 4 mM d'acétonitrile a été utilisé comme témoin.

2.15 Test de glycosynthèse

Les enzymes mutées ont été soumises au test de glycosynthèse avec le sucre donneur activé 1-fluoroxylbiose et différents sucre accepteurs, soit le ρ -nitrophénol α -glycopyranosyl, le ρ -nitrophénol β -glycopyranosyl, le xylobiose et le xylotriose. Deux séries de tests de glycosynthèse ont été effectuées. Dans un premier temps, la réaction de glycosynthèse a été testée avec la forme brute du xylobiose fluoré obtenue suite à la première synthèse du sucre donneur activé. Ensuite, la seconde série de tests de glycosynthèse a été réalisée avec le xylobiose fluoré sous forme pratiquement pure obtenue suite à la deuxième synthèse du sucre donneur activé.

2.15.1 Xylobiose fluoré sous forme brute

Lorsque le xylobiose fluoré sous forme brute a été utilisé comme sucre donneur activé, les tests enzymatiques ont été effectués à une température de 30°C ou à la

température de la pièce dans un volume de 100 μL d'un tampon 50 mM citrate de sodium à pH 6,0. Les protéines mutées, à une concentration de 30 μM , ont été mises en présence de 10 mM de sucre accepteur et de 5 mM de sucre donneur activé. En parallèle, des tubes de composition identiques mais ne contenant pas les protéines mutées ont servi de témoin. Des aliquotes ont été prélevées aux temps 1, 4, 8, 24 et 48 heures. La réaction enzymatique a été arrêtée par une incubation de 5 minutes à 95°C. L'efficacité de la réaction de glycosynthèse des trois enzymes mutées envers ces substrats a été analysée par (HPEAC) selon les mêmes conditions qu'utilisées pour l'analyse de la pureté du sucre donneur activé (section 2.13.1).

2.15.2 Xylobiose fluoré purifié

Ayant démontré les résultats les plus prometteurs lors des tests de glycosynthèse avec le xylobiose fluoré brut, les protéines mutées XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A ont été sélectionnées pour la seconde série de tests de glycosynthèse avec le xylobiose fluoré purifié. Le sucre donneur activé étant en quantité très limitée, les tests enzymatiques ont été effectués dans un volume de 50 μL de tampon citrate de sodium 50 mM pH à 6,0 et à une température de 30°C. Les deux protéines mutées (XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A), à une concentration de 75 μM , ont été mises en présence de 5 mM de sucre donneur activé et de 10 mM de sucre accepteur. En parallèle, des tubes de compositions identiques mais ne contenant pas d'enzymes ont servi de témoins. Des aliquotes de 9 μL ont été prélevées aux temps d'incubation de 4, 8, 24, 32 et 48 heures et diluées 35X dans de l'eau. Ensuite, la réaction enzymatique a été arrêtée par une incubation de 5 minutes à 95°C. L'efficacité de la réaction de glycosynthèse envers ces substrats a été analysée HPEAC selon les mêmes conditions qu'utilisées pour l'analyse de la pureté du sucre donneur activé (section 2.13.1).

RÉSULTATS

3.1 Mutagenèse dirigée par PCR

La substitution du résidu nucléophile glutamate par le résidu alanine a été effectuée à l'aide de la mutagenèse dirigée par PCR. Trois protéines mutées ont été préparées, soit la XlnA₂-E236A, la XlnB₂-E87A et la XlnC-E85A. La matrice pIAF932, les amorces internes CD137 et CD138 comportant la mutation ainsi que les amorces externes CD100 et CD101 ont permis l'amplification du gène de la XlnA₂-E236A. Tel qu'attendu, un amplicon de 1.1 kpb correspondant au gène de la XlnA₂-E236A a été obtenu. Le gène de la XlnB₂-E87A a été amplifié à l'aide de la matrice pIAF935, les amorces internes CD302 et CD303 comportant la mutation et les amorces externes CD300 et CD301. Tel que prévu, une bande de 750 pb a été obtenue sur gel d'agarose 0.7% (p/v) suite à l'amplification. De même pour le gène de la XlnC-E85A, tel qu'escompté, une bande de 800 pb a été obtenue après amplification à l'aide de la matrice pIAF936, les amorces internes CD400 et CD401 comportant la mutation et les amorces externes CD402 et CD403.

3.2 Digestion et ligation dans le vecteur pC209

Les amorces externes d'oligonucléotides utilisées pour la mutagenèse dirigée par PCR comportent les sites de restriction pour les enzymes *SphI* et *SacI*. Ainsi, les amplicons ont été digérés avec *SphI* et *SacI*. Cette digestion a permis ensuite le clonage des amplicons digérés dans le vecteur plasmidique pC209 de *S. lividans*, lequel a aussi été digéré préalablement par les mêmes enzymes de restriction. Tel que schématisé à la figure 12, ces ligations devaient permettre de générer trois plasmides, soit pIAF932-E236A, pIAF935-E87A et pIAF936-E85A.

3.3 Transformation dans *S. lividans* et criblage des transformants

Les milieux de ligation ont été utilisés pour transformer des protoplastes de la souche 10-164 de *S. lividans*. En présence de thiostrepton, seuls les transformants contenant le gène de résistance à cet antibiotique ont pu croître sur milieu solide Bennet-thiostrepton. Parmi les transformants obtenus, cinquante ont été repiqués sur milieu solide RBB-xylane

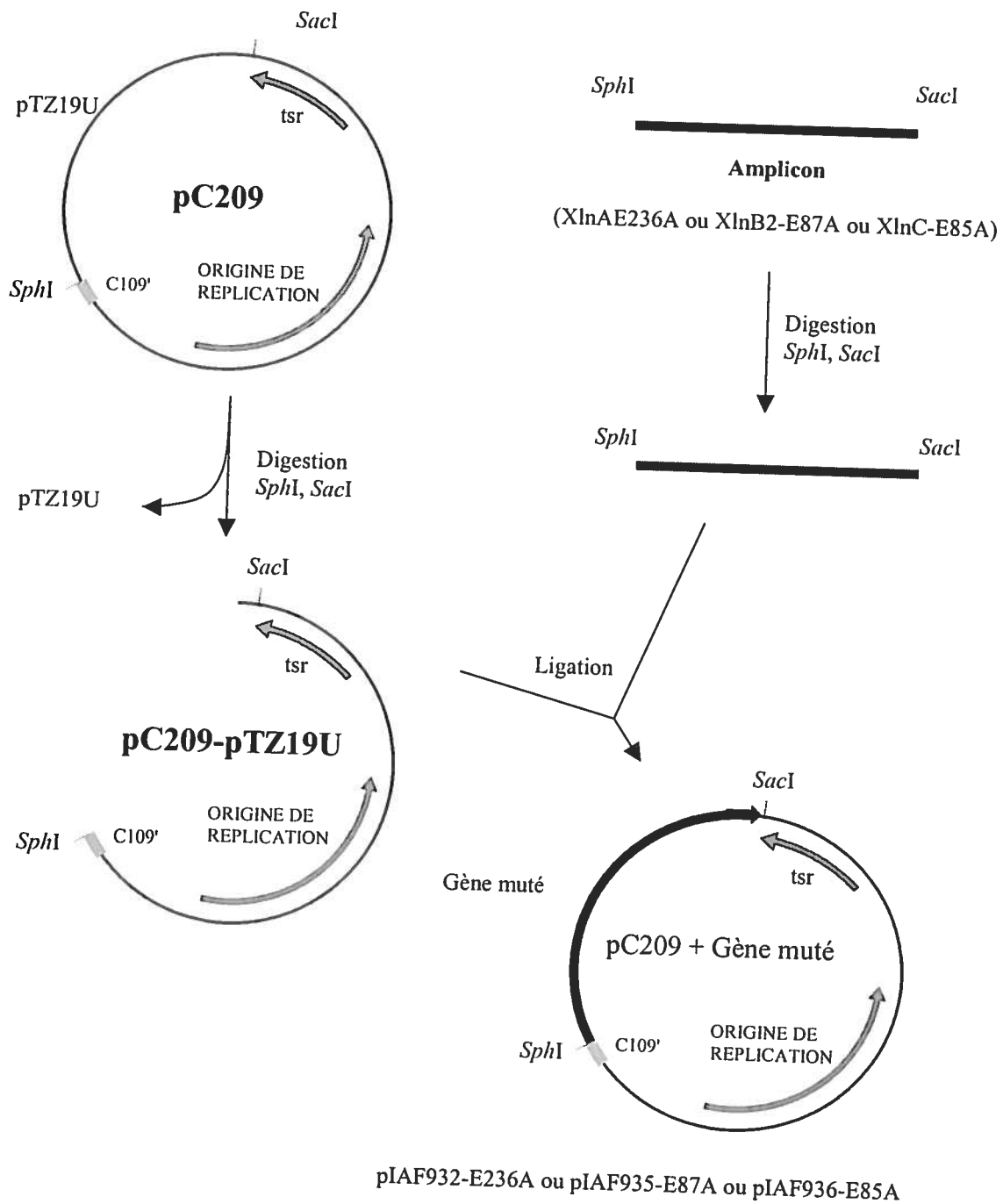


Figure 12: Schéma de la construction des plasmides pIAF932-E236A, pIAF935-E87A et pIAF936-E85A à partir du plasmide pC209 de *S. lividans* et des amplicons obtenus par PCR.

afin de cribler les transformants ne possédant aucune activité xylanasiq. Le RBB-xylane est un substrat chromogénique soluble de couleur bleue utilisé pour déterminer de façon qualitative l'activité enzymatique d'hydrolyse du xylane par les enzymes de la famille des endo-1,4-xylanases. Ainsi, après incubation à 34°C durant 72 heures, la présence d'une activité d'hydrolyse du xylane s'observe sur le milieu solide bleu RBB-xylane par l'apparition d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie. La souche 10-164 a la particularité de ne posséder aucune activité xylanasiq. Par ailleurs, suite à la mutation, l'activité d'hydrolyse est théoriquement inactivée. Ainsi, quatre clones ne présentant aucune zone d'hydrolyse du xylane ont été sélectionnés parmi les transformants repiqués et inoculés en milieu liquide.

3.4 Production des enzymes mutées en Erlenmeyers

Des productions en petits volumes des enzymes mutées (section 2.8.1) ont été préalablement effectuées avec les quatre clones sélectionnés. Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) dénaturant, la production des protéines au niveau du surnageant de culture a été évaluée. Par ailleurs, la capacité des clones à produire l'enzyme mutée a aussi été confirmée à l'aide d'un immunobuvardage de type Western avec les anticorps spécifiques de l'enzyme sauvage respective. On observe selon les résultats aux figures 13a et 14a que parmi les quatre clones de pIAF932-E236A inoculés en culture liquide, seul le clone #2 démontre par SDS-PAGE la production de l'enzyme XlnA₂-E236A. En effet, une bande majoritaire d'un poids d'environ 32 kDa apparaît sur gel SDS-PAGE et correspond à la XlnA₂ selon le témoin positif (figure 13a). De plus, l'immunobuvardage de type Western avec les anticorps spécifiques anti-XlnA confirme l'identité de cette bande comme une XlnA (figure 14a). Étrangement, aucune protéine ne semble être produite par les clones #1, 3 et 4 de pIAF932-E236A. Il est possible que la quantité de protéines dans les surnageants de culture était trop faible pour être visualisée sur gel SDS-PAGE. Il aurait donc été préférable pour ces clones de concentrer les surnageants de culture. Dans le cas des clones pIAF936-E85A, les résultats SDS-PAGE avec le témoin positif de la XlnC et l'immunobuvardage Western avec l'anticorps anti-XlnC démontrent que les quatre clones produisent l'enzyme XlnC-E85A d'un poids

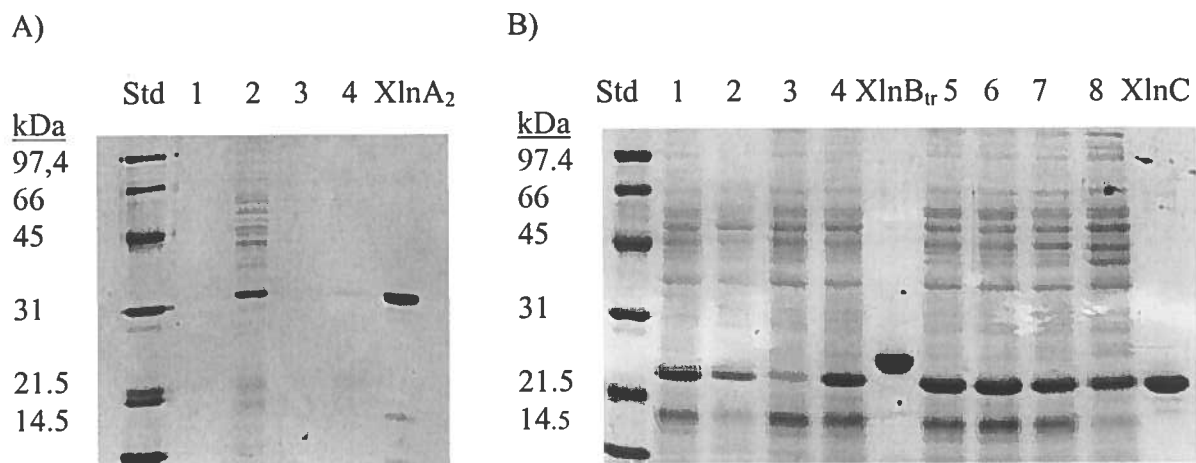


Figure 13: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS des protéines sécrétées au niveau des surnageants de culture des productions de 48 heures en milieu liquide M15 contenant 1% (p/v) de glucose et supplémenté de thiostrepton de quatre clones chacun des transformants pIAF932-E236A (A, puits 1-4), pIAF935-E87A (B, puits 1-4) et pIAF936-E85A (B, puits 5-8).

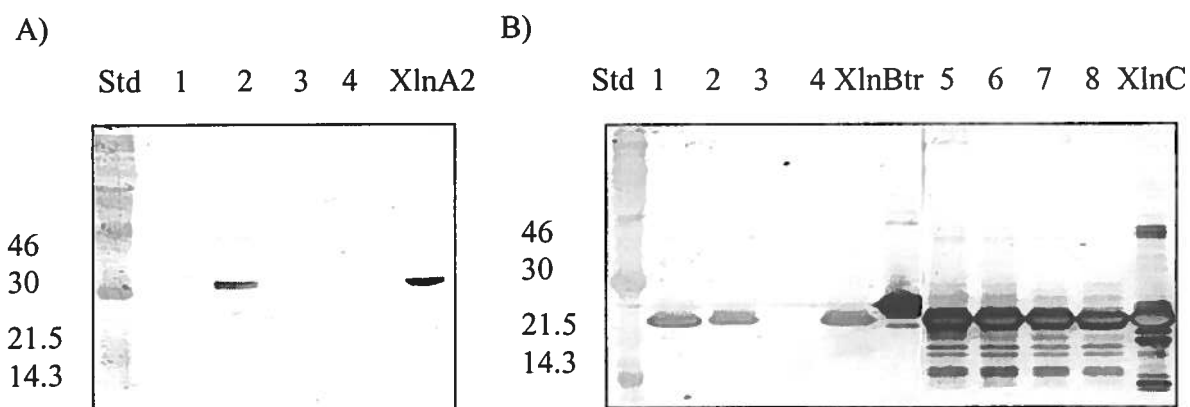


Figure 14: Immunobuvardage de type Western des protéines sécrétées au niveau des surnageants de culture des productions de 48 heures en milieu liquide M15 contenant 1% (p/v) de glucose et supplémenté de thiostrepton de quatre clones chacun des transformants pIAF932-E236A (A, puits 1-4), pIAF935-E87A (B, puits 1-4) et pIAF936-E85A (B, puits 5-8) avec les anticorps anti-XlnA, anti-XlnB et anti-XlnC.

moléculaire d'environ 22 kDa (figure 13b et 14b). Pour les clones pIAF935-E87A, les clones #1, 2 et 4 produisent l'enzyme XlnB₂-E87A d'un poids moléculaire d'environ 23 kDa selon le SDS-PAGE et l'immunobuvardage Western. La XlnBtr (xylanase B tronquée) a été utilisée comme témoin positif. La XlnBtr possède quelques acides aminés de plus que la XlnB₂ d'où l'explication du poids moléculaire plus élevé pour le témoin positif comparativement aux enzymes mutées. La XlnB₂ aurait dû être utilisée comme témoin. Finalement, pour chaque enzyme mutée, un clone producteur a été sélectionné.

Par la suite, les plasmides présents au niveau du mycélium des clones sélectionnés ont été extraits, digérés et les gènes mutés sous-clonés dans le phage M13 afin d'obtenir de l'ADN simple brin pour le séquençage. Les résultats du séquençage ont démontré que les gènes ne comportaient pas d'autre mutation que celle désirée. Les trois clones sélectionnés ont donc été lyophilisés. Ensuite, pour chaque clone, une ampoule lyophilisée a été utilisée afin d'effectuer une production à plus grande échelle, soit en fermenteur.

3.5 Production des enzymes mutées en fermenteur

Une production en fermenteur a été effectuée afin de produire une quantité plus appréciable d'enzymes mutées. Les productions, d'un volume de 7 litres, ont été effectuées pendant 72 heures dans un milieu M14 - 2% (p/v) xylose. La quantité de protéines totales retrouvées dans le surnageant concentré a été évaluée suite à l'étape d'ultrafiltration à débit tangentiel. Au niveau du surnageant concentré d'un volume de 350 mL de la production de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A, une concentration protéique de 1,442 mg/mL a été déterminée pour un total de 505 mg de protéines produites. Dans le cas du surnageant concentré d'un volume de 350 mL de la production de l'enzyme mutée XlnB₂-E87A, la concentration protéique a été évaluée à 1,942 mg/mL pour un total de 680 mg de protéines produites. Quant au surnageant concentré d'un volume de 400 mL de la production de l'enzyme mutée XlnC-E85A, une concentration protéique de 3,618 mg/mL a été déterminée pour un total de 1,45 g de protéines produites.

Finalement, les protéines retrouvées au niveau des surnageants concentrés des trois productions d'enzymes mutées ont été visualisées sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12% (figure 15). Pour le surnageant concentré de la production de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A (figure 15a), on observe le gel une seule bande correspondant à l'enzyme mutée XlnA₂-E236A. L'enzyme mutée XlnA₂-E236A est donc la protéine majeure sécrétée par le clone. Dans le cas de la production de l'enzyme mutée XlnB₂-E87A (figure 15b), différentes protéines sont sécrétées au niveau du surnageant. Cependant, on observe que l'enzyme mutée XlnB₂-E87A, d'un poids moléculaire d'environ 23 kDa, est la protéine la plus abondante. Pour la production de l'enzyme mutée XlnC-E85A, différentes protéines sont aussi retrouvées au niveau du surnageant. Deux protéines sont sécrétées en abondance : une protéine d'un poids moléculaire d'environ 22 kDa correspondant à la XlnC-E85A lorsque comparé au témoin positif XlnC et une protéine d'un poids moléculaire d'environ 44 kDa non identifiée.

3.6 Purification des enzymes mutées

Les enzymes mutées ont été purifiées par un premier passage sur une colonne échangeuse de cations et puis par tamis moléculaire. Une quantité initiale de 250 mg de protéines des surnageants concentrés a été utilisé pour la purification des enzymes mutées. Suite aux deux étapes de purification, la quantité de protéines récupérées et le rendement ont été évalués (Tableau 7). Pour l'enzyme XlnA₂-E236A, la quantité de protéines récupérées a été de 25 mg avec un rendement de 10%. Dans le cas de l'enzyme XlnB₂-E87A, 95 mg de protéines ont été récupérées suite aux deux étapes de purification avec un rendement de 38%. Moins efficace, la purification de l'enzyme XlnC-E85A a permis de récupérer 10,8 mg de protéines, soit un rendement de 4,3%. Par ces deux méthodes de purification, les protéines mutées ont été purifiées jusqu'à homogénéité tel que démontré aux figures 16a et b.

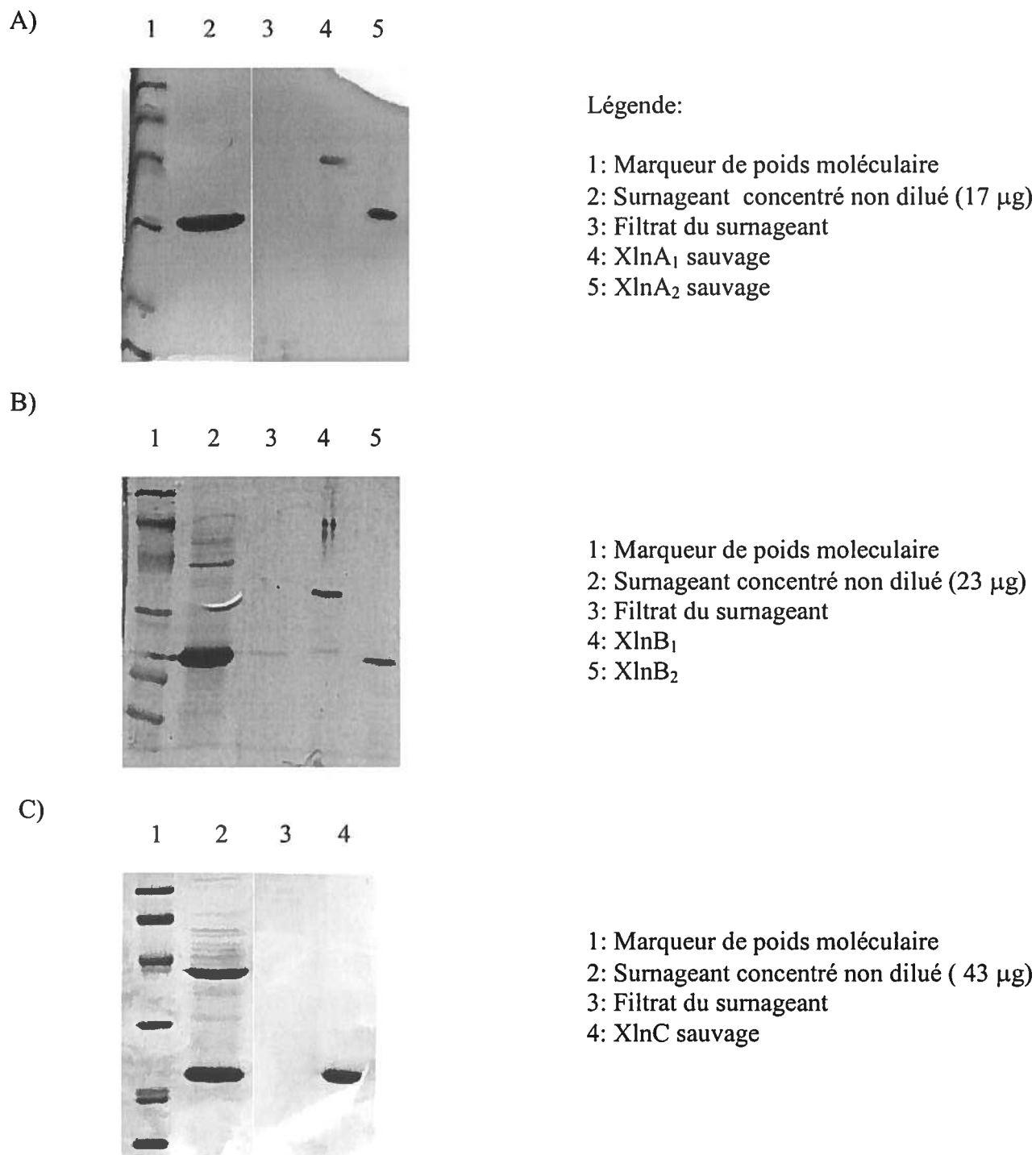
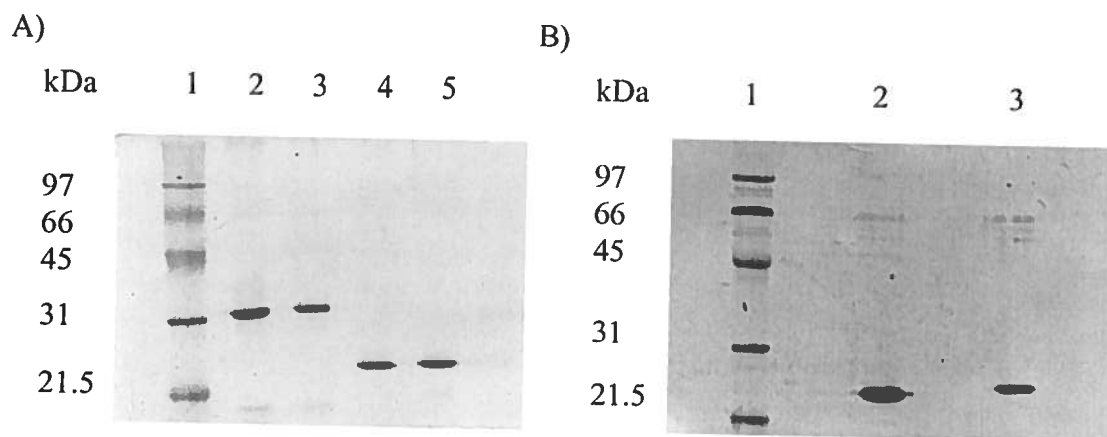


Figure 15: Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS des protéines du surnageant concentré des trois productions en fermenteur des enzymes mutées XlnA₂-E236A (A), XlnB₂-E87 (B) et XlnC-E85A (C).

Tableau 7: Pourcentage de récupération des protéines totales lors de la purification des protéines mutées sur colonne échangeuse de cations et tamis moléculaire.

Protéines mutées	Quantités initiales de protéines (mg)	Quantités récupérées suite aux deux étapes de purification (mg)	Rendement (%)
XlnA ₂ -E236A	250	25,0	10
XlnB ₂ -E87A	250	95,0	38
XlnC-E85A	250	10,8	4,3



Légende:

A)

- 1: Marqueur de poids moléculaire
- 2: Protéine mutée XlnA₂-E236A
- 3: XlnA₂ sauvage
- 4: Protéine mutée XlnB₂-E87A
- 5: XlnB₂ sauvage

B)

- 1: Marqueur de poids moléculaire
- 2: Protéine mutée XlnC-E85A
- 3: XlnC sauvage

Figure 16: Détermination du degré de purification des protéines mutées (XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) avec SDS (A, puits 2-5, 3 µg de protéines; B, puits 2 et 3, 3 µg de protéines).

3.7 Détermination de l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées

Suite à la substitution au site actif du résidu nucléophile par une alanine, l'activité enzymatique d'hydrolyse des enzymes XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A devrait être inactivée. Ainsi, suite aux étapes de purification, l'activité résiduelle d'hydrolyse de chacune des enzymes mutées a été déterminée et comparée à l'activité enzymatique d'hydrolyse de leur enzyme sauvage respective. Pour ce faire, le xylopentaose (X5) et le xylane ont été utilisés comme substrats. L'analyse a été effectuée par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC). La somme des concentrations des différents sucres X1-X9 produits a été calculée. Les valeurs obtenues ont été utilisées pour déterminer le pourcentage d'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées comparativement aux enzymes sauvages pour lesquelles cette valeur a été déterminée à 100%. Par ailleurs, des concentrations de 10X, 100X et 1000X plus élevées que l'enzyme sauvage ont été testées pour les enzymes mutées afin de vérifier s'il y a une activité d'hydrolyse détectable. Au tableau 8, les pourcentages indiqués pour les concentrations 10X, 100X et 1000X ont été corrigés à 1X afin de faciliter la comparaison avec l'enzyme sauvage.

On observe, au tableau 8, que les trois enzymes mutées présentent une activité d'hydrolyse lorsqu'elles sont mises en présence de xylane ou de xylopentaose comme substrat. Parmi les trois enzymes mutées, la XlnA₂-E236A est l'enzyme possédant l'activité résiduelle d'hydrolyse la plus faible. Envers le xylane, aucune activité d'hydrolyse n'a été détectée pour des concentrations de 10X et 100X lorsque comparé à l'enzyme sauvage. À une concentration de 1000X, une valeur de 0,02% a été obtenue comme activité d'hydrolyse. En présence du substrat X5, chacune des concentrations a démontré la présence d'une activité d'hydrolyse. Très faibles, ces valeurs, lorsque comparé à l'enzyme sauvage, se situent à 0,02, 0,07 et 0,05% pour les concentrations de 10X, 100X et 1000X respectivement. Ainsi, bien que la capacité d'hydrolyse de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A soit toujours présente, on constate cependant d'après les résultats que son activité d'hydrolyse est pratiquement nulle. La mutation semble donc avoir entraîné une perte presque totale de l'activité enzymatique d'hydrolyse.

Tableau 8: Détermination du pourcentage d'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées envers le xylane et le xylopentaose en comparaison avec leur enzyme de type sauvage respective.

Enzyme	Concentration Enzyme		Activité d'hydrolyse (%)	
	NM		Xylane	X5
Type Sauvage XlnA₂	14,8	1X	100	100
Mutant XlnA₂-E236A	148	10X	0,00	0,02
	1480	100X	0,00	0,07
	14800	1000X	0,02	0,05
Type Sauvage XlnB₂	14,8	1X	100	100
Mutant XlnB₂-E87A	148	10X	0,00	7,60
	1480	100X	5,78	11,9
	14800	1000X	1,93	2,59
Type Sauvage XlnC	14,8	1X	100	100
Mutant XlnC-E85A	148	10X	0,00	0,00
	1480	100X	0,21	0,29
	14800	1000X	0,10	0,18

Dans le cas de l'enzyme mutée XlnB₂-E87A, l'activité d'hydrolyse est beaucoup plus élevée. En présence de xylane, l'enzyme mutée n'a démontré aucune activité d'hydrolyse pour une concentration de 10X. Cependant, aux concentrations de 100X et 1000X, des valeurs plutôt élevées, soit de 5,78% et 1,93%, ont été obtenues. L'activité d'hydrolyse s'est démontrée encore plus élevée en présence de X5. Aux concentrations 10X, 100X et 1000X, des valeurs respectives de 7,60%, 11,9% et 2,59% ont été obtenues comparativement à la valeur de 100% pour l'enzyme sauvage. Malgré le fait étrange que les valeurs diffèrent d'une concentration de l'enzyme mutée à l'autre (10X, 100X et 1000X) et selon le substrat utilisé, les résultats démontrent clairement que cette enzyme mutée possède une activité d'hydrolyse résiduelle plutôt appréciable.

Pour l'enzyme mutée XlnC-E85A, un faible pourcentage d'activité d'hydrolyse a été détecté. Mis en présence du xylane comme substrat, l'enzyme mutée à une concentration de 10X n'a démontré aucune activité d'hydrolyse. Aux concentrations de 100X et 1000X, l'activité d'hydrolyse est de 0,21% et 0,10% lorsque comparé à l'enzyme sauvage. En présence de X5, les valeurs d'activité d'hydrolyse ont été semblables à celles obtenues pour le xylane. En effet, aucune activité d'hydrolyse n'a été détectée à une concentration de 10X et aux concentrations de 100X et 1000X, des valeurs de 0,29% et 0,18% ont été obtenues. Bien qu'elle soit faible, ces résultats démontrent que l'enzyme mutée XlnC-E85A possède encore une activité d'hydrolyse.

3.8 Phénomène de transglycosylation de l'enzyme sauvage XlnA₂ et de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A en présence de xylopentaose.

Une réaction de transglycosylation a été observée pour l'enzyme sauvage XlnA₂ et la protéine mutée XlnA₂-E236A lorsque le substrat X5 est utilisé. En effet, en plus des sucres de degré de polymérisation X1 à X4 générés par la réaction d'hydrolyse, des sucres oligoxylosides de degré de polymérisation X6 à X9 ont aussi été détectés par HPEAC. Ces résultats démontrent qu'il y a eu synthèse de sucres puisque des oligosaccharides de degré de polymérisation plus élevé que X5 ont été produits. Suite à la détermination par HPEAC de la concentration des sucres oligoxylosides, le phénomène

de transglycosylation s'est avéré plus prononcé pour l'enzyme mutée XlnA₂-E236A comparativement à l'enzyme sauvage. Si on observe au tableau 9, parmi les 28,5 mM initial de substrat X5, une quantité de 15,5 mM a été consommée par l'enzyme sauvage lors de la réaction. Cette valeur est de 10,5 mM pour l'enzyme mutée à une concentration 1000X et de 3,72 mM à une concentration de 100X. De cette quantité de X5 consommé, une certaine proportion a servi à la synthèse des sucres X6, X7, X8 et X9. Au tableau 8, on observe le pourcentage de X5 utilisé pour synthétiser les sucres X6 à X9. On remarque qu'une quantité plus élevée du X5 consommé est utilisée par la protéine mutée comparativement à l'enzyme sauvage pour synthétiser les sucres X6-X9. Au total, 44,8% du X5 consommé a servi à la synthèse des sucres X6-X9 pour l'enzyme sauvage comparativement à 54,9% et 63,9% pour l'enzyme mutée à des concentrations de 1000X et 100X. L'enzyme mutée possède donc une activité plus élevée pour la réaction de transglycosylation comparativement à l'enzyme sauvage.

3.9 Synthèse du sucre donneur activé

La synthèse du sucre donneur activé fluoré a été effectuée à partir du β -xylobiose. Le β -xylobiose a été obtenu d'un hydrolysat de xylane. Trois étapes ont été nécessaires afin d'obtenir le sucre fluoré à partir du β -xylobiose, soit les étapes d'acétylation, de fluoration et de désacétylation.

3.9.1 Préparation du β -xylobiose

À partir du xylane de bouleau et à l'aide de l'enzyme XlnA₁, un hydrolysat de xylane a été préparé. L'hydrolysat de xylane a été analysé par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (Figure 17b). En comparant avec les standards d'oligoxylosides X1 à X9 (figure 17a), on remarque que l'hydrolysat de xylane est constitué de différents oligosaccharides, soit de β -xylose (X1), de β -xylotriose (X3) et principalement de β -xylobiose (X2) (figure 17b). De l'hydrolysat de xylane, le

Tableau 9: Comparaison entre l'enzyme sauvage XlnA₂ et l'enzyme mutée XlnA₂-E236A du phénomène de transglycosylation en présence de xylopentaose. (Concentration des sucres déterminée par HPEAC)

	WT	Mutant 1000X	Mutant 100X
Concentration Substrat initial X5	28,5 mM		
Quantité X5 consommé	15,5 mM	10,5 mM	3,72 mM
Pourcentage du X5 consommé utilisé pour la transglycosylation (synthèse des sucres X6 à X9)	44,8 %	54,9 %	63,9 %

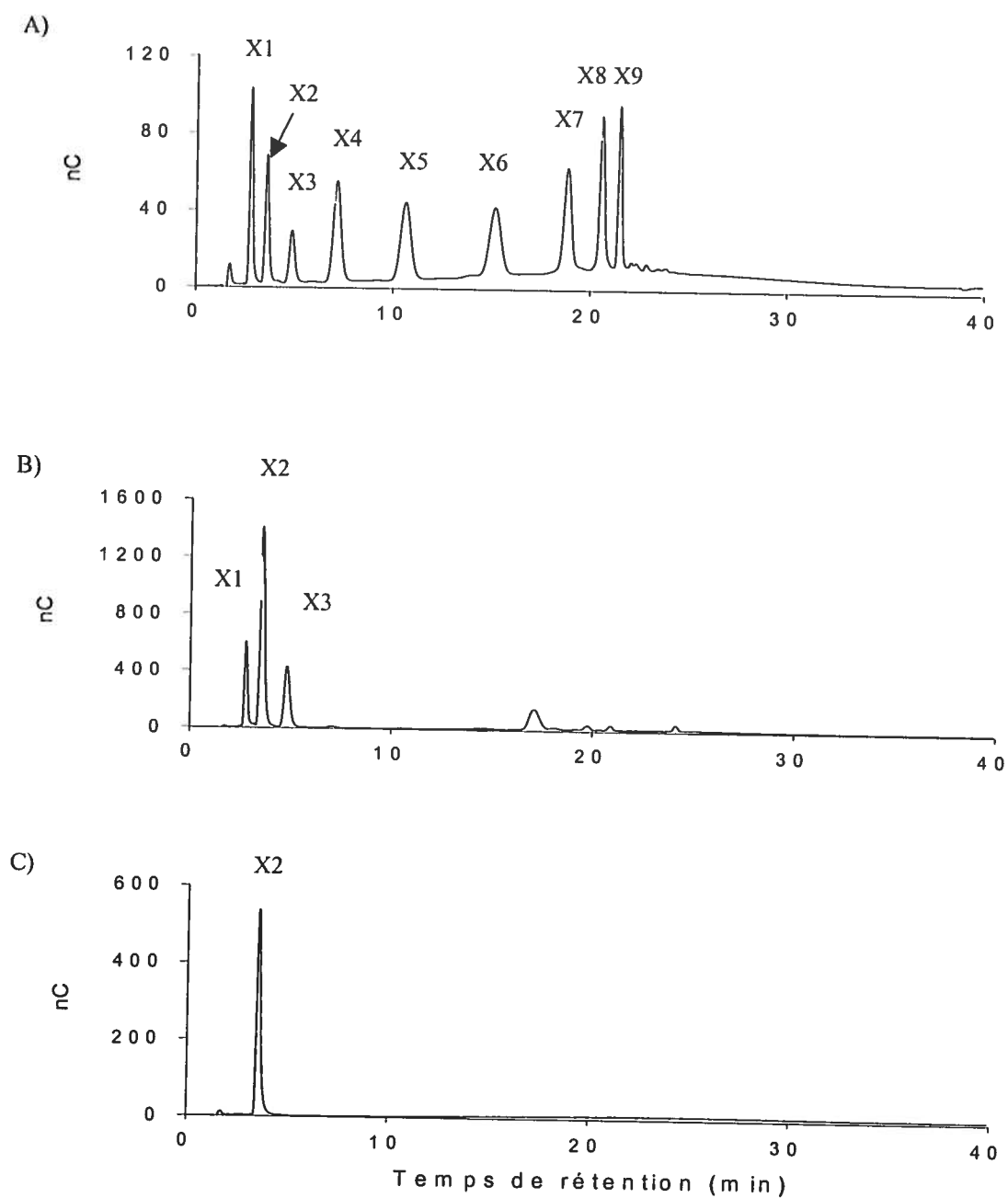


Figure 17: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPEAC) de la purification du β -xylobiose sur tamis moléculaire à partir d'un hydrolysate de xylane. A) Standard d'oligoxylosides X1 à X9 B) hydrolysate de xylane C) β -xylobiose purifié sur tamis moléculaire.

β -xylobiose (X2) a par la suite été purifié sur tamis moléculaire (section 3.13.1) et obtenu sous forme relativement pure tel que démontré à la figure 17c.

3.9.2 Acétylation du xylobiose

Les différents groupements hydroxyles du β -xylobiose ont été protégés par acétylation (figure 18A). La réaction, d'une durée de 24 heures et à la température de la pièce, s'effectue en présence d'anhydride acétique dans le diméthylformamide. L'apparition du produit de synthèse a été déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM). On remarque à la figure 18B l'apparition d'un composé moins polaire d'un R_f de 0,6 suite à la réaction d'acétylation. Ce composé correspond au β -xylobiose acétylé.

3.9.3 Fluoration du β -xylobiose acétylé

La seconde étape de la synthèse du sucre donneur activé fluoré a consisté en la fluoration du β -xylobiose acétylé afin d'obtenir le 1- α -fluoroxylobiose acétylé (figure 19A). À la figure 19B, on observe le résultat de la fluoration du β -xylobiose acétylé sur CCM quatre heures (CCM1) et 10 jours (CCM2) après la réaction. On observe sur la CCM1 que la fluoration du β -xylobiose acétylé (colonne 1, $R_f = 0,61$) fournit différents produits de synthèse (colonne 2, 3, 4 ou 5). Cependant, suite à l'entreposage à -20°C pendant 10 jours, on observe sur la CCM 2 que certains composés instables se sont dégradés et seulement deux sont restés intacts soit les produits correspondant aux bandes d'un R_f de 0,57 et 0,30. Par ailleurs, on observe que l'intensité de ces bandes diffère de la CCM1 à la CCM2. On observe une dégradation du produit d'un R_f de 0,57 et une augmentation du produit d'un R_f de 0,30. Ces deux composés ont donc été purifiés par une chromatographie sur colonne de silice et ont subi par la suite une désacétylation afin de vérifier par chromatographie échangeuse d'anion à haute performance lequel des deux composés correspond au 1- α -fluoroxylobiose.

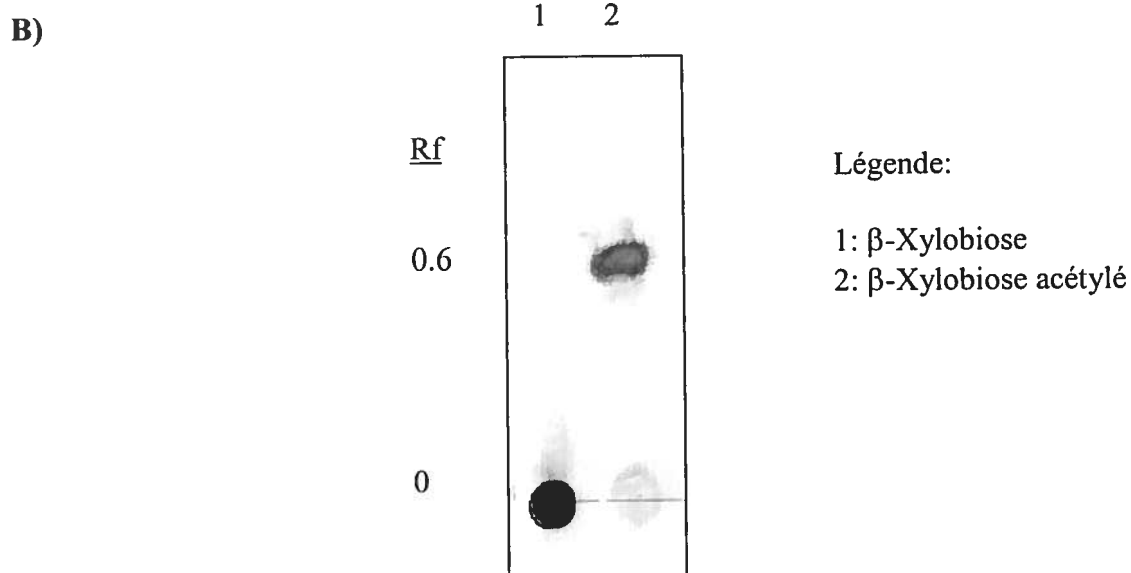
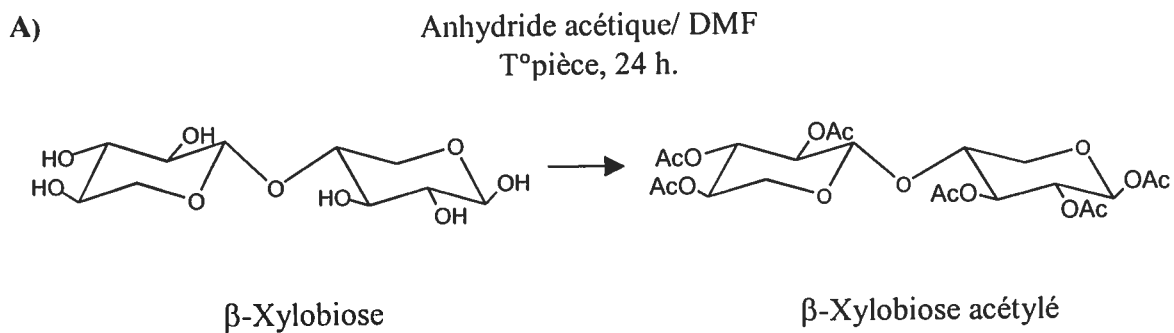
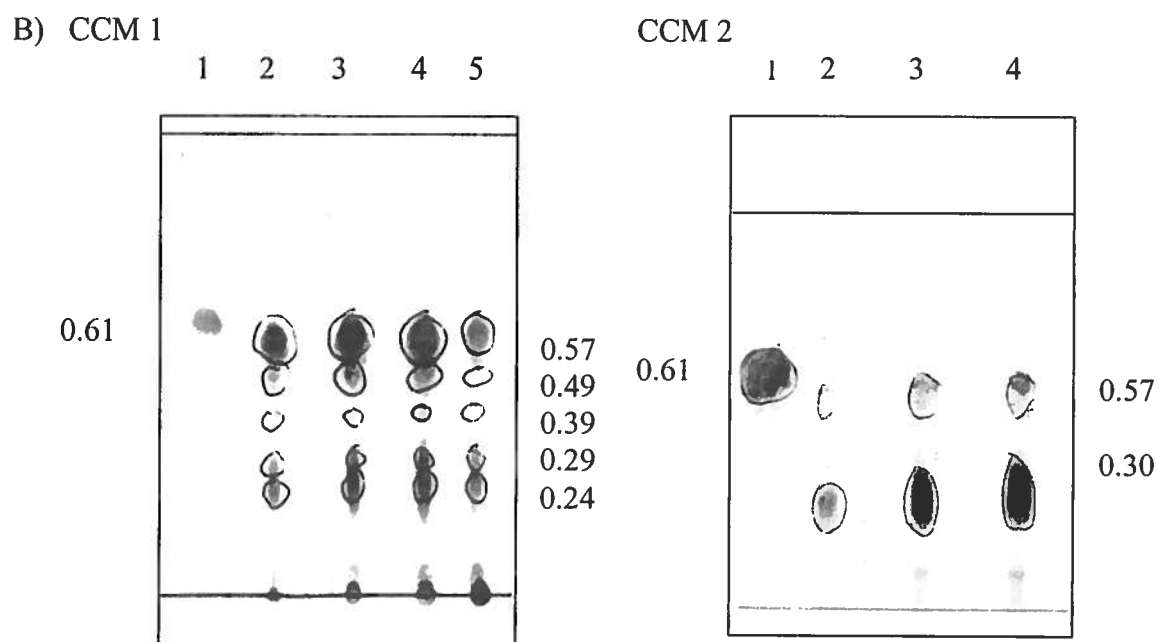
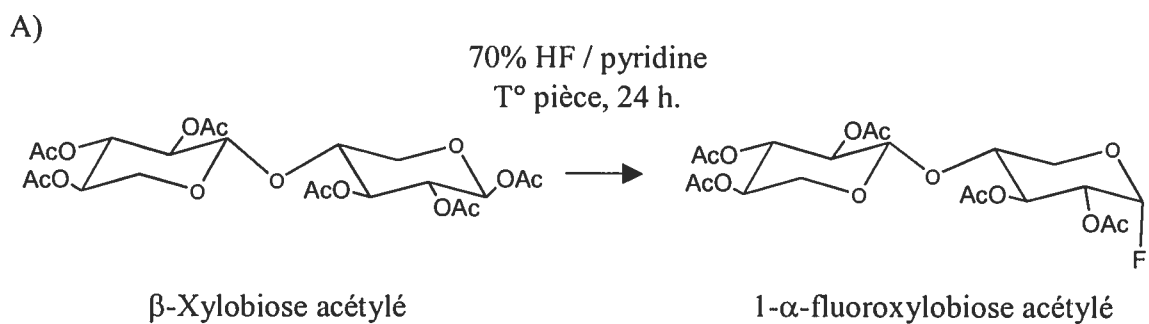


Figure 18: Acétylation du β -xylobiose A) Schéma de l'acétylation du β -xylobiose B) Analyse par CCM de l'acétylation du β -xylobiose avec l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1).

Légende: Ac = groupement acétyle



Légende:

1: β -Xylobiose acétylé
2, 3, 4 et 5: 1-fluoroxylobiose acétylé

1: β -Xylobiose acétylé
2, 3 et 4: 1-fluoroxylobiose acétylé

Figure 19: Synthèse du 1- α -fluoroxylobiose acétylé à partir du β -xylobiose acétylé. A) Schéma de la synthèse B) Analyse de la synthèse par CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1), CCM 1) 4 heures après la réaction, CCM 2) 10 jours après la réaction.

3.9.4 Désacétylation

La désacétylation s'effectue pendant une heure en présence d'ammoniaque (figure 20A). Suite à cette réaction, aucune bande n'a pu être observée sur CCM pour le composé d'un Rf de 0,30. Ce composé n'est donc pas le 1- α -fluoroxylbiose. Par contre, une bande d'un Rf de 0 a été obtenue sur CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle: hexane (2:1) pour le composé d'un Rf de 0,57 suite à sa désacétylation (figure 20B). Ce résultat correspond aux valeurs attendues pour le 1- α -fluoroxylbiose puisque ce dernier est un composé polaire et ne doit donc pas migrer dans ces conditions. De son côté, le composé d'un Rf de 0,30 pourrait possiblement être un sous-produit de dégradation du produit d'un Rf de 0,57.

Une CCM a par la suite été effectuée avec l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle dans un ratio (4:3:10) avec le produit étant possiblement le 1- α -fluoroxylbiose. Le β -xylobiose a été utilisé comme référence afin de s'assurer que le produit récupéré n'est pas du β -xylobiose. Dans ces conditions, on observe à la figure 21 qu'une bande d'un Rf de 0,49 apparaît pour le β -xylobiose. Dans le cas du produit obtenu, deux bandes possédant des Rf plus élevés que le β -xylobiose (0,58 et 0,72) peuvent être distinguées. Ce résultat démontre que l'échantillon n'est pas pur et qu'il ne contient pas du β -xylobiose.

L'échantillon a par ailleurs été analysé par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (figure 22). Plus un sucre est constitué de groupements hydroxyles, plus son temps de rétention est élevé. Le sucre 1- α -fluoroxylbiose devrait en théorie posséder ainsi un temps de rétention plus élevé que le β -xylose puisqu'il possède un nombre plus élevé de groupements hydroxyles. Par contre, le 1- α -fluoroxylbiose devrait posséder un temps de rétention plus bas que le β -xylobiose en raison d'un groupement hydroxyle en moins. En observant le profil du chromatogramme, on aperçoit que le produit l'échantillon n'est pas pur. Il semble contenir trois produits. Tout d'abord, lorsque comparé avec des standards, le pic au temps de rétention de 14,3 minutes

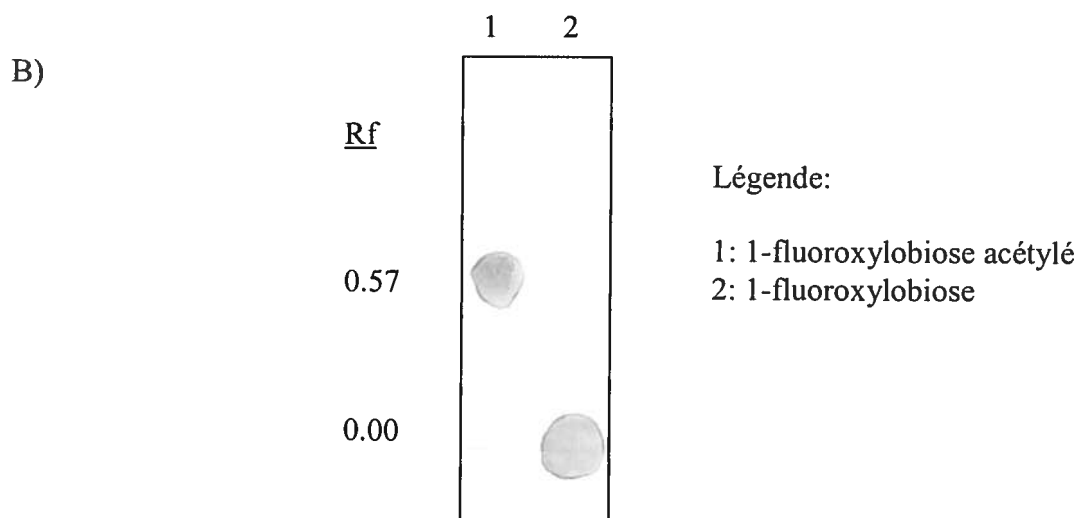
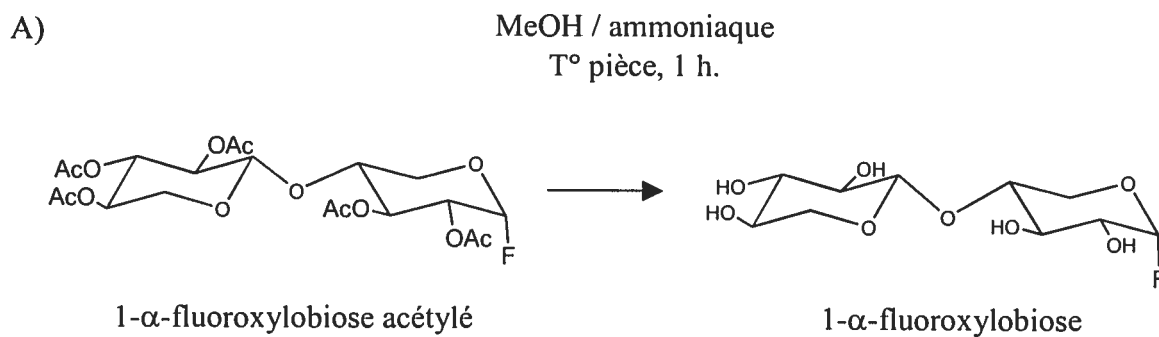
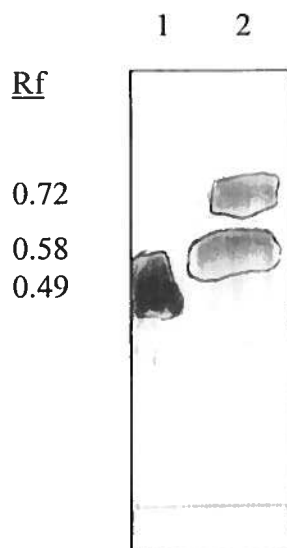


Figure 20: Synthèse par désacétylation du 1- α -fluoroxylbiose à partir du 1- α -fluoroxylbiose acétylé. A) schéma de la réaction de désacétylation B) Analyse de la synthèse par CCM à l'aide de l'éluant acétate d'éthyle et hexane (2 :1).



Légende:

- 1: β -Xylobiose
- 2: 1-fluoroxylobiose

Figure 21: CCM avec l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle (4: 3: 10) du 1-fluoroxylobiose en comparaison avec le xylobiose.

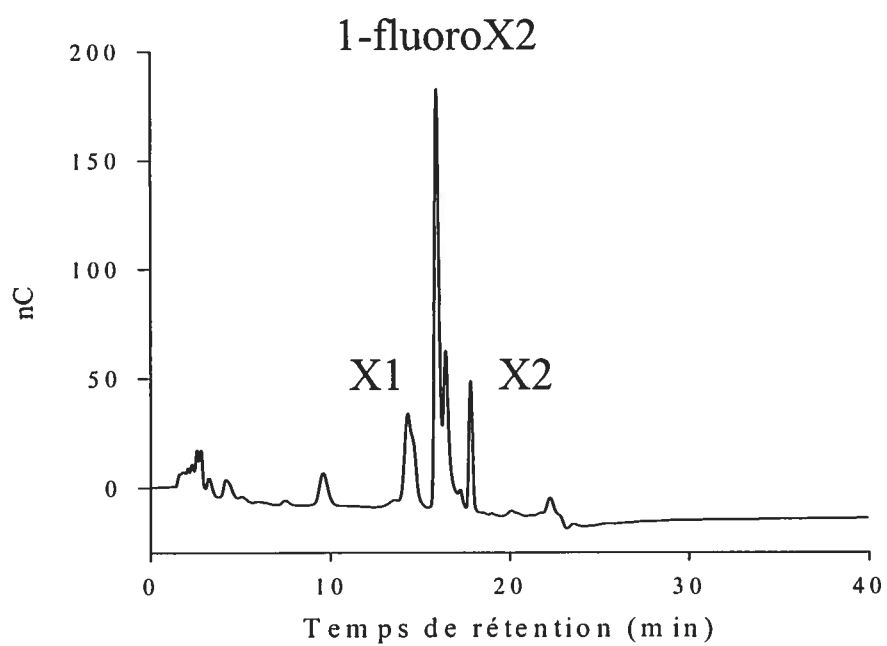


Figure 22: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du 1-fluoroxylbiose.

correspond au β -xylose tandis que le pic au temps de rétention de 17,8 minutes correspond au β -xylobiose. Étrangement, l'analyse par CCM n'avait démontré aucune présence de β -xylobiose. Cependant, l'analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance a été effectuée après l'analyse par CCM, soit environ une à deux semaines plus tard. Il est donc possible qu'une partie du sucre fluoré se soit dégradé en β -xylobiose durant cette période. Finalement, le pic le plus élevé, soit celui du centre se situant entre le β -xylose et le β -xylobiose au temps de rétention de 16,4 minutes, correspondrait au produit désiré soit le sucre fluoré. Ce pic est majoritaire, cependant il est chevauché par un autre petit pic à un temps de rétention plus élevé. Bien que la fluoration soit supposée être stéréospécifique pour la configuration α , ce résultat pourrait s'expliquer par la présence des deux formes possibles du sucre 1-fluoroxyllobiose, soit β et α .

Finalement, afin de s'assurer d'être en présence du bon composé, soit le sucre 1-fluoroxyllobiose, l'échantillon a été analysé par spectrométrie de masse (figure 23). Malgré l'équilibration de l'appareil, des différences de 1 à 2 Daltons ont été observés. Tel qu'observé par CCM et par HPAEC, les résultats ont démontré la présence de xylose avec une masse sur la charge de l'ion analysé (m/z) de 149,0 (m/z théorique = 150,1, résultats non présentés). La présence du sucre donneur activé 1-fluoroxyllobiose a aussi été détectée avec une m/z de 282,3 (m/z théorique = 284,2). Enfin, un composé avec une m/z de 280,4 a aussi été détecté au niveau de l'échantillon et identifié comme du xylobiose (m/z théorique = 282,2).

3.10 Test de glycosynthèse avec le 1-fluoroxyllobiose sous forme brute

Bien que le sucre 1-fluoroxyllobiose obtenu contienne du xylose et du xylobiose et semble aussi être un mélange racémique, des tests préliminaires de la réaction de glycosynthèse ont quand même été effectués avec cette forme brute. Différents sucres accepteurs ont été testés soit le p -nitrophénol- α -xylanopyranosyl, le

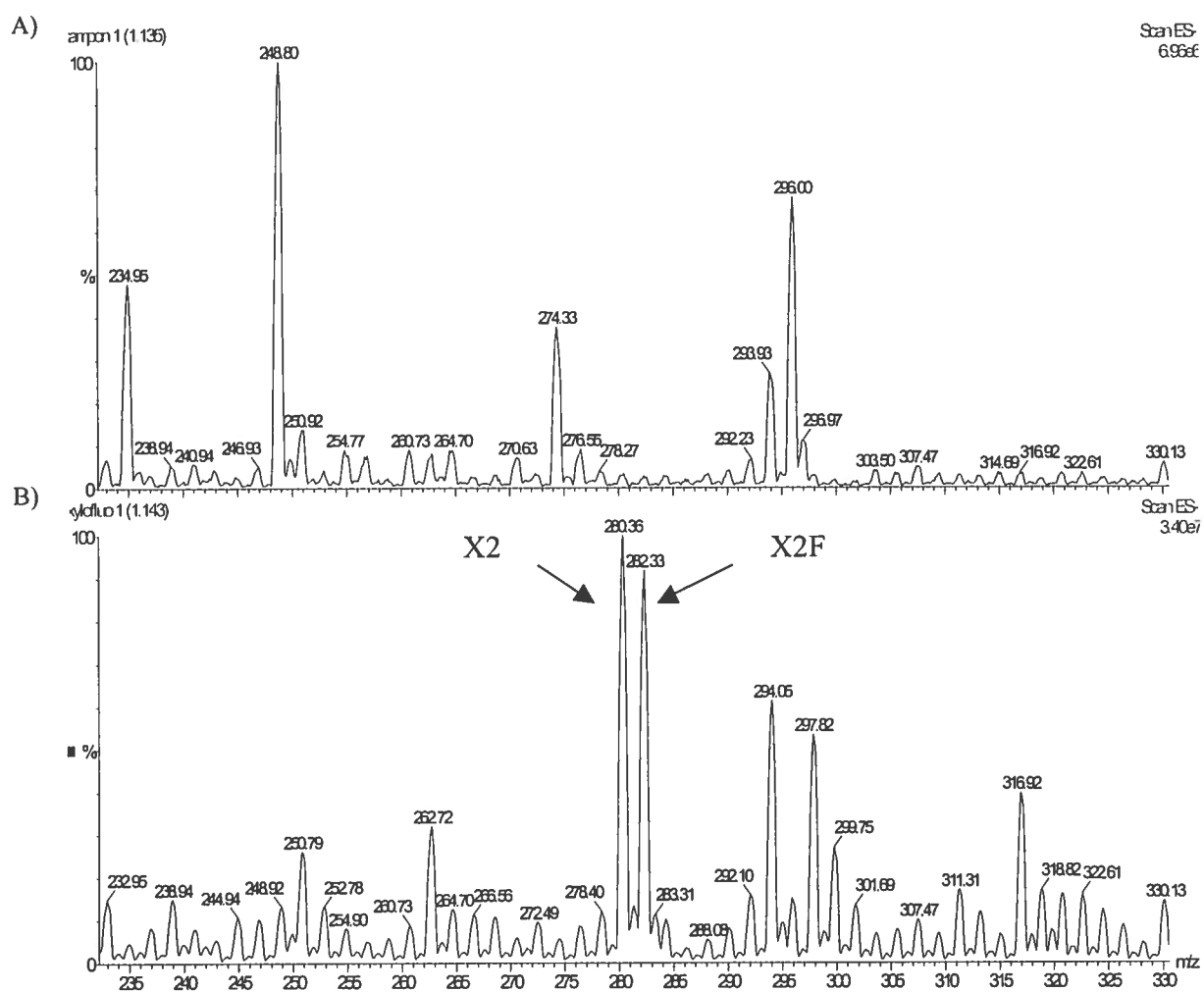


Figure 23: Spectre de masse m/z A) Tampon acétonitrile 4mM B) Tampon acétonitrile 4 mM contenant 1mM du sucre 1-fluoroxylbiose.

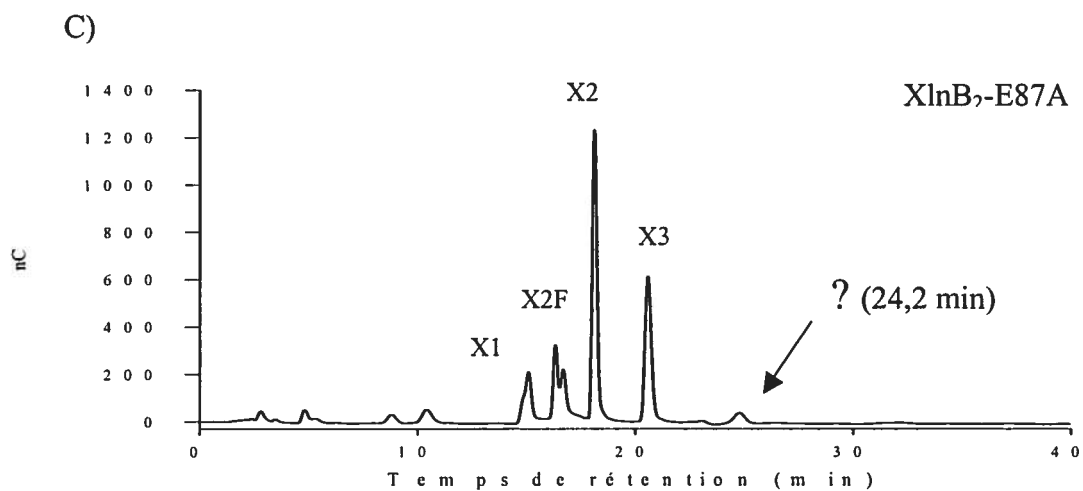
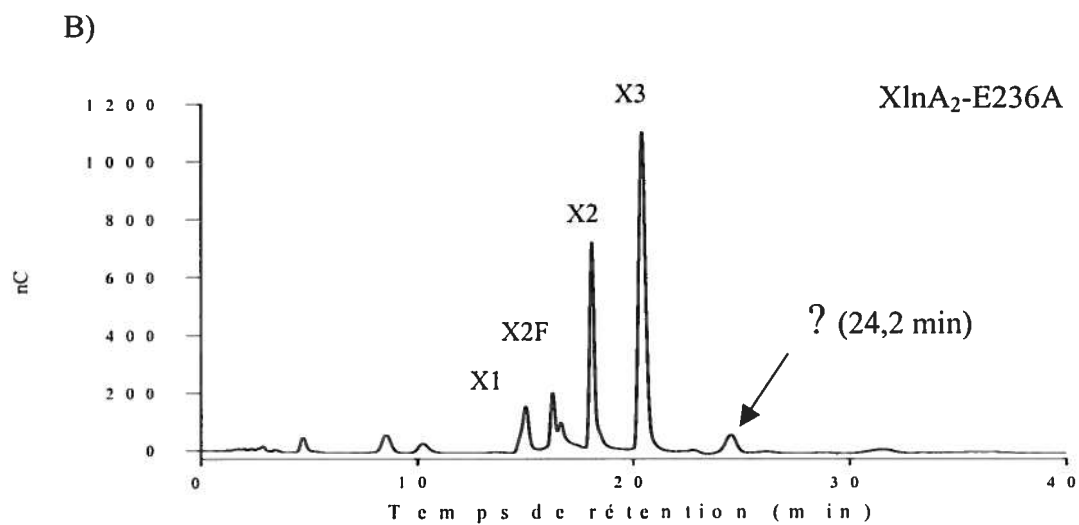
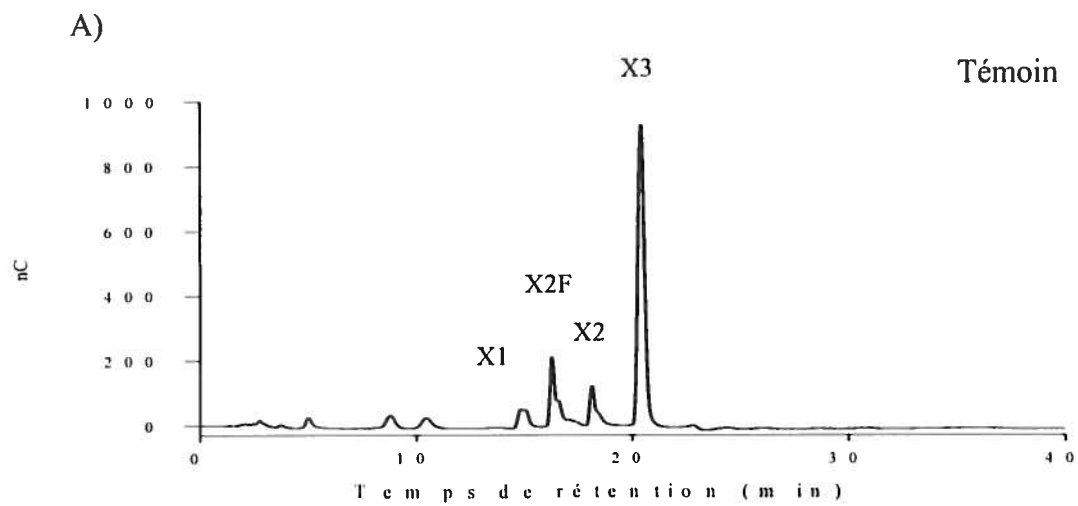
ρ -nitrophénol- β -xylanopyranosyl, le β -xylobiose et le β -xylotriose. Chaque enzyme mutée (XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A) à une concentration de 30 μ M a été mise en présence de 5 mM de sucre donneur activé et de 10 mM de sucre accepteur. La réaction a été testée à la température de la pièce dans un tampon citrate de sodium 50 mM. L'enzyme mutée XlnA₂-E236A a aussi été testée à une température de 30°C afin de vérifier l'effet d'une température plus élevée. Des aliquotes ont été prélevées aux temps d'incubation de 60, 120, 240 et 960 minutes. Suite à une dilution appropriée, la synthèse d'oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse a été vérifiée par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance.

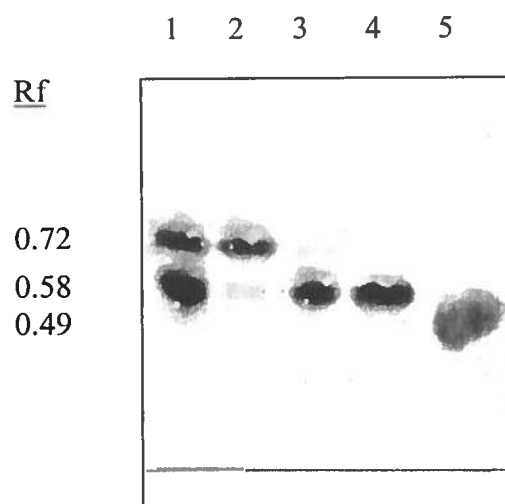
L'analyse qualitative a démontré que seules la XlnA₂-E236A à une température de 30°C et la XlnB₂-E87A à la température de la pièce possèdent la capacité de synthétiser des sucres dans ces conditions. Cette synthèse qui s'est avérée plutôt faible n'a été possible que lorsque ces deux enzymes ont été mises en présence du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose (X2F) sous forme brute et le sucre accepteur xylotriose (X3). Tel qu'illustré aux chromatogrammes de la figure 24, un pic supplémentaire apparaît au temps de rétention de 24,2 minutes pour les enzymes XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A lorsque comparé au témoin.

3.11 Seconde synthèse du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose.

Une seconde synthèse du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose a été entreprise par la suite. Certains paramètres ont été modifiés afin d'en obtenir une quantité plus importante. Tout d'abord, un temps d'incubation de 24 heures au lieu de 8 heures a été utilisé pour la réaction de fluoration. Par ailleurs, l'échantillon a été traité suite à la fluoration par des lavages avec une solution de NaHCO₃ afin de diminuer le pH. Enfin, l'échantillon a toute de suite été purifié suite à la réaction de fluoration contrairement à la première synthèse où l'échantillon avait été traité dix jours plus tard. Suite à l'étape de désacétylation, une CCM avec l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle dans un ratio 4:3:10 a été effectuée. Des standards de β -xylose et de β -xylobiose ont de même été utilisés. Selon la figure 25, on observe en

Figure 24: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du test de glycosynthèse après un temps d'incubation de 240 minutes dans un tampon 50 mM de citrate de sodium lorsque le sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose sous forme brute (5 mM) et le sucre accepteur β -xylotriose (10 mM) sont utilisés A) Témoin B) En présence de 30 μ M de l'enzyme mutée XlnA₂-E236A à une température de 30°C C) En présence de 30 μ M de l'enzyme mutée XlnB₂-E87A à la température de la pièce.





- Légende:
- 1: 1-fluoroxylobiose sous forme brute
 - 2: 1-fluoroxylobiose purifié
 - 3: Xylose purifié du 1-fluoroxylobiose brute
 - 4: Standard de xylose
 - 5: Standard de xylobiose

Figure 25: CCM à l'aide de l'éluant méthanol, eau, acétate d'éthyle (4: 3: 10) de la seconde synthèse du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose.

position 1 que la composition de l'échantillon récupéré est la même que celle obtenue lors de la première synthèse. En effet, il y a présence de deux composés avec des Rf identiques à ceux obtenus lors de la première synthèse du sucre donneur activé. Comme lors de la première synthèse, un des composés avec son Rf de 0.58 est du xylose. L'autre composé, avec un Rf de 0.72, est le 1-fluoroxylobiose.

L'échantillon a de même été analysé par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance. Le chromatogramme à la figure 26A démontre que l'échantillon, lorsque comparé à des standards, est constitué en faible proportion de xylose correspondant au pic au temps de rétention de 15,3 minutes. L'autre composé majoritaire fournissant le pic au temps de rétention de 16,7 minutes est le produit désiré soit le 1-fluoroxylobiose. Cette fois-ci, avant d'effectuer des tests de glycosynthèse, une étape de purification supplémentaire a été effectuée soit une purification par chromatographie préparative sur couche mince (section 2.12.5). On remarque sur la CCM à la figure 25 que suite à cette étape de purification le xylose et le 1-fluoroxylobiose ont presque totalement été séparés (colonne 2 et 3). Ces résultats ont aussi été observés suite à l'analyse par HPEAC (figure 26B).

3.12 Test de glycosynthèse avec le 1-fluoroxylobiose purifié

Des tests de glycosynthèse ont été effectués avec la forme purifiée du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose. Ayant démontré les résultats les plus prometteurs lors des premiers tests de glycosynthèse, seules les enzymes mutées XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A ont été testées. Les enzymes mutées ont été utilisées à des concentrations plus élevées soit de 75 µM au lieu de 30 µM. Elles ont été mise en présence de 5 mM de sucre donneur activé et de 10 mM de différents sucres accepteurs (p-nitrophénol-α-xylanopyranosyl, p-nitrophénol-β-xylanopyranosyl, β-xylobiose et β-xylotriose). L'analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance n'a démontré aucune phénomène de synthèse. Contrairement au premier test de glycosynthèse, l'analyse n'a révélé aucune synthèse même lorsque les enzymes mutées sont mises en présence du sucre donneur activé et du sucre accepteur β-xylotriose.

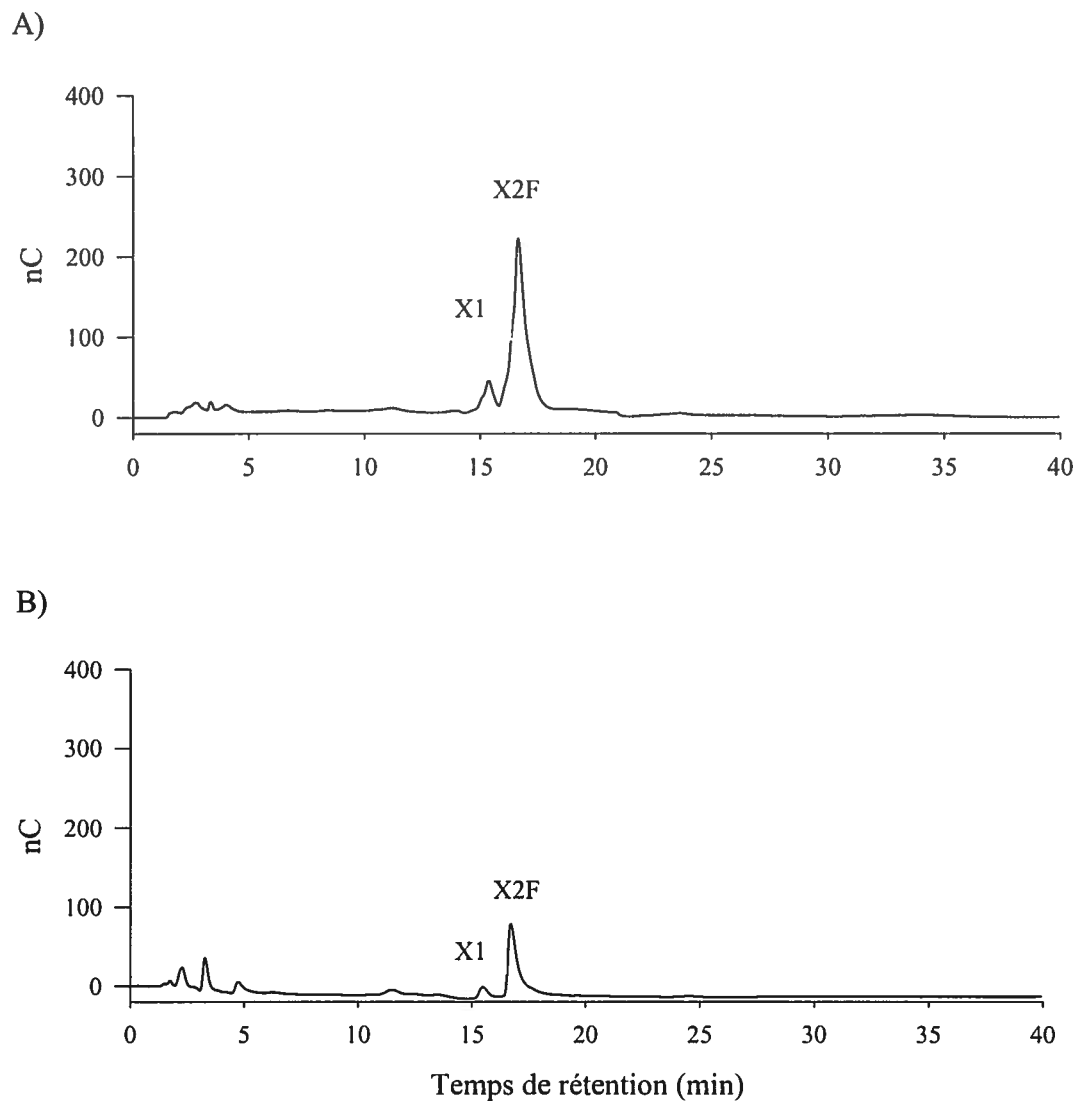


Figure 26: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance de la pureté du sucre donneur activé 1-fluoroxylbiose A) suite à la deuxième synthèse B) après purification par chromatographie préparative sur couche mince.

DISCUSSION

4.1 Activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées

Suite à la purification des enzymes mutées, l'activité résiduelle d'hydrolyse a été évaluée. Les résultats ont démontré que chacune des enzymes mutées possédait dans des proportions différentes une activité résiduelle d'hydrolyse. Il est difficile d'évaluer si cette activité est due à une faible, mais significative, activité de l'enzyme mutée ou si encore elle est due à un autre facteur. En effet, même purifiées, les enzymes mutées peuvent contenir certaines impuretés pouvant être responsables de l'activité résiduelle. Différents facteurs peuvent être à l'origine de cette activité.

Tout d'abord, certains organismes hôtes produisent des glycosidases qui peuvent générer une activité significative qui est difficile, même dans certains cas impossible, à éliminer (Schulein, 2000). Dans notre cas, la souche hôte 10-164 de *S. lividans* a été utilisée pour la production des enzymes mutées. Cette souche a la particularité de ne posséder aucune activité xylanase et cellulase. Par précaution, cette caractéristique a été préalablement vérifiée afin de s'assurer qu'aucune enzyme xylanase sauvage ne soit produite. En effet, ces enzymes, même produites en très faibles quantités, auraient pu être co-purifiées avec les protéines mutées et ainsi générer cette activité résiduelle d'hydrolyse. Ainsi, tout juste avant la production en fermenteur des enzymes mutées avec la souche 10-164, une production en fermenteur de la souche 10-164 non transformée a été effectuée selon les mêmes conditions. Au niveau du surnageant, la production des enzymes sauvages xylanase A2, B2 et C a été vérifiée par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western avec les anticorps spécifiques à ces enzymes. Selon les résultats présentés à la figure 27, on observe que la souche 10-164 utilisée ne produit aucune de ces enzymes sauvages xylanases aux différents temps d'incubation. Ainsi, suite à ces résultats, l'hypothèse de cette activité contaminante des enzymes sauvages XlnA, B et C dû à la souche 10-164 a été éliminée. On observe une réaction croisée des anticorps anti-XlnC pour la XlnB₂ et la XlnB à la figure 27D. La XlnB est une enzyme de la même famille que la XlnC. La XlnB possède ainsi certaines séquences en acides aminés identiques à la XlnC ce qui explique cette réaction croisée.

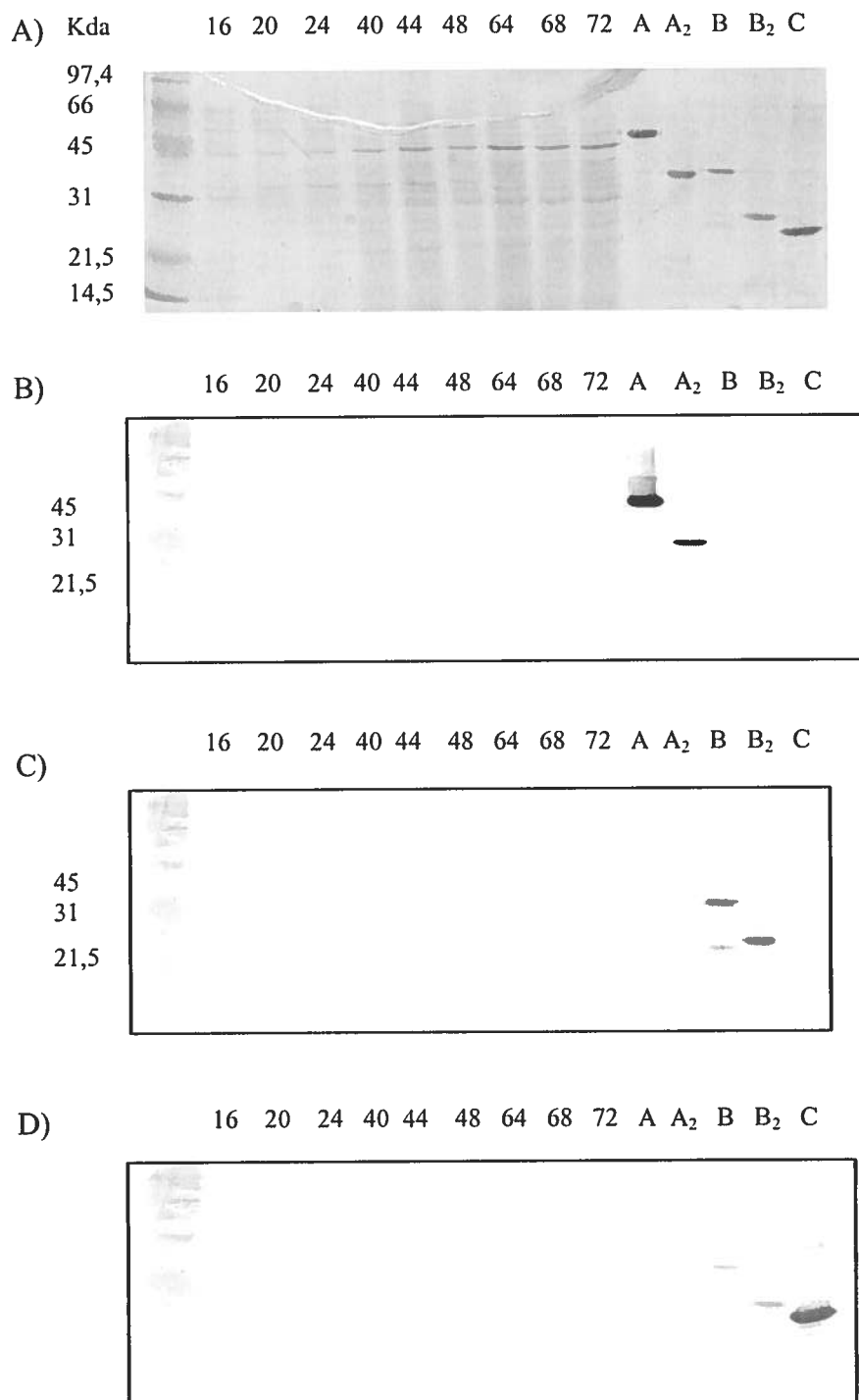


Figure 27: Analyse à différents temps d'incubation du surnageant de culture de la production en fermenteur de la souche 10-164 de *S. lividans* A) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) avec SDS et par immunobuvardage de type Western avec les anticorps B) anti-XlnA C) anti-XlnB D) anti-XlnC. (A= XlnA, A₂= XlnA₂, B= XlnB, B₂= XlnB₂, C= XlnC).

Par ailleurs, un autre facteur important pouvant expliquer la présence d'activité résiduelle d'hydrolyse chez les enzymes mutées est le fait d'avoir utilisé des colonnes ayant préalablement servi à la purification d'enzymes actives. En effet, il a été cité que la purification d'enzymes mutées inactives sur des colonnes ayant servi à la purification d'enzymes sauvages actives peut amener une contamination de l'enzyme mutée par l'enzyme sauvage et ainsi générer jusqu'à 1% d'activité résiduelle (Ly and Whitters, 1999; Wang *et al.*, 1994). Pour la purification des enzymes mutées, l'utilisation de colonnes fraîchement préparées et propre à chaque enzyme mutée aurait donc été préférable.

Une autre raison expliquant cette présence d'activité résiduelle d'hydrolyse chez les protéines purifiées pourrait être associée à une activité contaminante provenant d'un phénomène d'incorporation erroné lors du processus de traduction. En effet, lors de la traduction, il arrive parfois, même jusqu'à plus de 1%, que l'acide aminé du type sauvage soit incorporé au lieu de l'acide aminé désiré. Ce phénomène d'incorporation erroné lors de la traduction est un problème possible et fréquemment ignoré (Schimmel, 1989). Afin d'éviter ce problème, il est suggéré d'utiliser le codon le plus différent du codon de l'enzyme sauvage. Dans le cas des enzymes mutées XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A, le codon GAG a été modifié pour le codon GCG afin d'obtenir un résidu alanine au lieu d'un résidu glutamate. L'utilisation du codon GCC, qui code aussi pour une alanine et est constitué de deux bases différant du codon sauvage, aurait donc été préférable au codon GCG qui ne diffère que par une seule base.

Enfin, le tampon utilisé aurait pu aussi contribuer à la présence de l'activité résiduelle d'hydrolyse chez les enzymes mutées. En effet, il est possible, lors de la substitution d'un résidu glutamate ou aspartate par une alanine, que l'activité nucléophile soit régénérée par la présence de groupements carboxyliques dû à l'utilisation d'un tampon acétate ou formate (Schulein, 2000; Ly and Whitters, 1999). Dans notre cas, le tampon acétate a été utilisé pour les tests de mesure de l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées. L'utilisation d'un tel tampon aurait donc dû être fait avec précaution. Le choix d'un tampon phosphate, aussi couramment utilisé pour

les tests enzymatiques des xylanases de *Streptomyces lividans*, aurait ainsi été préférable au tampon acétate.

Finalement, les différents facteurs mentionnés précédemment ont donc pu contribuer à la présence de l'activité résiduelle d'hydrolyse mesurée chez les enzymes mutées. Il est ainsi difficile d'évaluer la cause exacte de cette activité. Cependant, différents tests pourraient être effectués ultérieurement afin d'en déterminer la cause. Tout d'abord, les expérimentations pourraient être reprises mais avec un tampon phosphate afin d'évaluer si le tampon acétate utilisé est responsable de l'activité. Ensuite, afin de déterminer si l'activité est due à une contamination par la présence d'enzymes sauvages, des tests pourraient être effectués en présence d'un inhibiteur rapide du résidu nucléophile tel que le 2-deoxy-2-fluoroxylbiose. N'étant pas disponible commercialement, cet inhibiteur devrait être synthétisé. Étant spécifique au résidu nucléophile, l'inhibiteur ne pourrait donc pas agir sur les enzymes mutées où le résidu nucléophile a été substitué pour une alanine. Une absence d'activité indiquerait donc la présence d'enzymes sauvages qui ont été inactivées par l'inhibiteur. D'un autre côté, une mesure semblable à celle déjà calculée supposerait donc l'absence d'enzymes sauvages et une capacité des enzymes mutées à hydrolyser les sucres ou encore la présence d'un autre facteur non mentionné précédemment.

4.2 Synthèse du sucre donneur activé

Bien qu'inattendue, l'étape de la synthèse du sucre donneur activé s'est révélée la plus longue et la plus ardue du projet. Plusieurs mois ont été nécessaires afin d'obtenir, et ce malheureusement en faible quantité, le sucre donneur activé. Initialement, la synthèse de deux sucres donneurs activés comportant des groupes partants différents a été ciblée, soit la synthèse du 1- α -bromoxylbiose et du 1- α -fluoroxylbiose.

Le 1- α -bromoxylbiose a été le premier sucre à avoir été synthétisé. Cependant, ce sucre s'est révélé instable. En effet, il a été observé que le 1- α -bromoxylbiose se dégradait rapidement en présence de lumière et aussi en présence d'une faible taux

d'humidité. Cette instabilité aurait donc grandement compliqué les tests de glycosynthèse effectués en milieu aqueux et ainsi diminué les rendements de synthèse. L'utilisation de ce sucre pour la réaction de glycosynthèse a donc été mise de côté.

Par la suite, une collaboration a permis de disposer de l'équipement nécessaire afin d'effectuer la fluoration de sucre qui requiert l'utilisation de HF, un composé très réactif et corrosif. L'utilisation de sucres fluorés comme sucres donneurs activés présentent certains avantages. Tout d'abord, parmi les sucres halogénés, ce sont les seuls possédant une assez bonne stabilité pour être déprotégés et dissout dans des tampons aqueux sans qu'il y ait un ratio appréciable d'hydrolyse spontanée (Williams et Withers, 2000). L'instabilité du sucre donneur bromé synthétisé précédemment s'expliquerait donc. Aussi, les sucres fluorés sont d'un point de vue synthétique facilement accessibles autant sous une configuration α que β , la configuration α se présentant comme la forme la plus stable (Williams et Withers, 2000; Yokoyama, 2000).

Ainsi, la synthèse du sucre donneur 1- α -fluoroxylbiose a été entreprise à partir du β -xylobiose, lequel a été préalablement préparé en laboratoire. Trois étapes ont été nécessaires afin d'obtenir le sucre donneur fluoré soit les étapes d'acétylation, de fluoration et de désacétylation. Suite à la synthèse du sucre donneur fluoré, les analyses par CCM, HPEAC et MS ont confirmé la présence de 1-fluoroxylbiose. Par contre, des impuretés saccharidiques ont aussi été détectées au sein de l'échantillon de sucre fluoré. En effet, parmi les deux synthèses effectuées du sucre donneur fluoré, la présence de xylose et de xylobiose a été déterminée suite à la première synthèse et la présence seule de xylose en faible proportion a été observée suite à la deuxième synthèse. Selon les résultats obtenus, la réaction de désacétylation semble responsable de la présence du xylose. En effet, avant d'être désacétylé, le xylobiose fluoré acétylé s'est révélé être pur après analyse par CCM (figure 20). Cependant, suite à sa désacétylation, l'analyse par CCM, à l'aide de l'éluant méthanol, eau et acétate d'éthyle (4: 3: 10), a démontré, en plus de la présence du sucre fluoré, la présence de xylose (figure 25). Les conditions utilisées pour la réaction de désacétylation ne seraient donc pas adéquates et feraient ainsi en sorte qu'une partie du sucre donneur activé 1-fluoroxylbiose soit dégradée en xylose.

De son côté, la présence du xylobiose détectée lors de la première synthèse serait plutôt due à une dégradation du xylobiose fluoré au cours du temps et non causée par la réaction de désacétylation. En effet, aucune présence de xylobiose n'a été détectée sur CCM suite à la désacétylation (figure 21). Cependant, les analyses par HPEAC et SM effectuées beaucoup plus tard ont révélé la présence de xylobiose au sein de l'échantillon constitué du xylobiose fluoré (figure 22 et 23). Il est difficile par contre d'expliquer pourquoi aucune présence de xylobiose n'a été observée au cours du temps lors de la deuxième synthèse du 1-fluoroxyllobiose.

Par ailleurs, bien que la littérature stipule que la configuration α soit privilégiée selon les conditions ayant été utilisées pour la fluoration, il aurait été préférable de s'assurer par RMN de la bonne configuration du fluor au carbone anomérique. Cependant, l'analyse du F^{19} par RMN n'a pu être effectuée à cause des quantités trop faibles de sucre synthétisé. En effet, il a été préférable d'utiliser cette faible quantité de sucre donneur fluoré pour les tests de glycosynthèse. On peut observer, au tableau 10, le rendement de chacune des étapes ainsi que le faible rendement total obtenu lors des deux synthèses. On observe qu'une étape supplémentaire de purification a été effectuée lors de la deuxième synthèse. Cette étape additionnelle a permis de recueillir le sucre fluoré sous une forme pure comparativement à la première synthèse où une forme brute a été obtenue.

On observe que l'étape d'acétylation a très bien fonctionné dans le cas des deux synthèses. En effet, des rendements au-dessus de 80% ont été obtenus. L'étape de fluoration qui a suivi a cependant été moins efficace. Des rendements de 8% et de 29% ont été obtenus lors de la première et de la seconde synthèse, respectivement. On observe cependant une augmentation de 21% du rendement lors de la seconde synthèse. Certains paramètres peuvent expliquer cette amélioration. Premièrement, lors de la deuxième synthèse, un temps d'incubation de 24 heures a été utilisé au lieu de 8 heures pour la réaction de fluoration ce qui a pu contribuer à un meilleur rendement. Deuxièmement, suite à sa dilution dans le dichlorométhane après 24 heures d'incubation, l'échantillon, constitué du sucre fluoré, a été traité par des lavages avec une solution de $NaHCO_3$

Tableau 10: Rendements des deux synthèses du sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose à partir du β -xylobiose.

Réaction de synthèse	Rendement (%)	
	1 ^{er} synthèse	2 ^e synthèse
Acétylation β -xylobiose \rightarrow β -xylobiose acétylé	83 %	84 %
Fluoration β -xylobiose acétylé \rightarrow 1-fluoroxylobiose acétylé	8 %	29 %
Désacétylation 1-fluoroxylobiose acétylé \rightarrow 1-fluoroxylobiose brut	20 %	22 %
Purification par chromatographie sur couche épaisse 1-fluoroxylobiose brut \rightarrow 1-fluoroxylobiose pure	---	21 %
Rendement Total	1,3 %	1,1 %

(Junneman *et al.*, 1993) ce qui a permis d'augmenter le pH de la solution. Cette étape n'a pas été effectuée lors de la première synthèse. Ainsi, cette augmentation de pH a donc pu contribuer à éviter la dégradation du sucre fluoré qui aurait pu survenir à un pH acide. Enfin, contrairement à la première synthèse où la dégradation d'une partie du composé fluoré avait été observée 10 jours après la réaction de fluoration, l'échantillon obtenu suite à la deuxième synthèse a donc tout de suite été purifié augmentant ainsi possiblement le rendement de synthèse.

L'étape de fluoration du sucre β -xylobiose hexaacétate a été basée sur le protocole de la fluoration du sucre α -laminaribiose octaacétate, issu de l'article sur la glycosynthèse avec l'enzyme mutée 1,3-1,4- β -glucanase (Malet et Planas, 1998). Le rendement de 29% obtenu pour la fluoration de l' β -xylobiose hexaacétate lors de la deuxième synthèse se rapproche donc du rendement de 33% obtenu dans l'article pour la fluoration de l' α -laminaribiose octaacétate. Par ailleurs, on retrouve aussi dans la littérature, des rendements de fluoration de certains autres sucres disaccharidiques fluorés acétylés. La fluoration de ces sucres acétylés a été effectuée selon le même protocole de synthèse. Cependant, des rendements plus élevés ont été obtenus pour ces sucres. Par exemple, la fluoration des sucres α -lactosyl octaacétate, β -maltosyl octaacétate, α -cellobiosyl octaacétate, β -gentiobiosyl octaacétate ainsi que α -isomaltosyl octaacétate a fourni des rendements de 94%, 68%, 64%, 75% et 74% respectivement (Junneman *et al.*, 1993). Il est difficile d'expliquer les rendements de deux à trois fois plus élevés pour la fluoration de ces disaccharides acétylés. Les sucres possèdent des conformations différentes dépendamment du nombre, de la position ainsi que de la configuration axiale ou équatoriale des groupements hydroxyles les constituants. Cette conformation est déterminante pour la réactivité des sucres, ce qui pourrait expliquer les différents rendements lors de la fluoration de ces sucres.

Enfin, tel que présenté au tableau 10, la dernière étape qu'est la désacétylation a fourni des rendements plus ou moins appréciables, soit de 20% lors de la première synthèse et de 22% lors de la seconde synthèse. L'étape supplémentaire de purification par chromatographie préparative sur couche mince, qui a permis de séparer pratiquement

tout le xylose présent au sein de l'échantillon de sucre fluoré, a donné un rendement de seulement 21%. On constate donc qu'un rendement final très pauvre a été obtenu suite à l'ensemble de toutes ces étapes. Dans le cas de la première synthèse, où une forme brute du sucre donneur fluoré a été obtenue, les 255 mg de β -xylobiose utilisés au départ ont fourni seulement 3,4 mg de sucre donneur activé 1- α -fluoroxylobiose pour un rendement total de 1,3%. Pour la seconde synthèse, les 100 mg de β -xylobiose utilisés initialement ont fourni 1,1 mg de sucre donneur activé 1-fluoroxylobiose. Un rendement total de 1,1% a donc été obtenu lors de cette synthèse. Finalement, il est ainsi évident que ces faibles rendements de synthèse ont donc grandement limité la quantité de tests de glycosynthèse pouvant être effectués. Bien que le sucre fluoré ait été obtenu, le protocole de synthèse du 1- α -fluoroxylobiose à partir du β -xylobiose reste encore à être mis au point afin d'obtenir de meilleurs rendements.

4.3 Test de glycosynthèse

Les tests de glycosynthèse ont été effectués deux fois. Dans un premier temps, la réaction de glycosynthèse a été testée avec le sucre donneur fluoré obtenu sous forme brute issu de la première synthèse. Les enzymes XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A ont donc été mises en présence de ce sucre activé fluoré sous forme brute et différents sucres accepteurs (section 2.14.1). Seule la XlnA₂-E236A et la XlnB₂-E87A ont démontré un phénomène de glycosynthèse. Cette glycosynthèse a été possible seulement lorsque les deux enzymes mutées ont été mises en présence du sucre donneur fluoré sous forme brute et du sucre accepteur β -xylotriose (section 3.9). Par ailleurs, ce phénomène de glycosynthèse s'est avéré malheureusement extrêmement faible. Par la suite, étant donné un manque de matériel au niveau du substrat fluoré, une seconde synthèse du sucre donneur fluoré a été entreprise. Ce sucre fluoré, obtenu sous une forme beaucoup plus pure, a été utilisé pour une seconde série de tests de glycosynthèse. Cependant, les résultats obtenus lors du premier test de glycosynthèse n'ont pu être reproduits. En effet, aucun phénomène de glycosynthèse n'a été observé. Certains facteurs peuvent expliquer ces résultats obtenus lors de ces deux tests de glycosynthèse.

Tout d'abord, l'un des facteurs les plus importants expliquant ces rendements de glycosynthèse très faibles ou nuls obtenus, est la présence de l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées. En effet, il a été déterminé précédemment que chaque enzyme mutée possédait, dans des proportions différentes, une activité résiduelle d'hydrolyse (section 3.6). Par ailleurs, bien que cette activité résiduelle d'hydrolyse se soit démontrée très faible pour certaines enzymes mutées, sa présence est tout de même très significative a pu nuire grandement à la réaction de glycosynthèse. En effet, étant donné cette présence d'activité d'hydrolyse au sein des enzymes mutées purifiées, au moment où il y a synthèse d'oligosaccharides, le sucre nouvellement formé peut évidemment être hydrolysé. Cette activité résiduelle d'hydrolyse serait donc fort possiblement responsable du rendement de glycosynthèse nul ou extrêmement faible obtenu lors des tests. Tel que mentionné précédemment (section 4.1) il serait primordial de déterminer l'origine de cette faible mais significative activité résiduelle d'hydrolyse.

Ensuite, la dégradation du sucre fluoré générant des impuretés au sein de l'échantillon pourrait être un autre facteur ayant contribué aux rendements de synthèse très faibles ou nuls obtenus lors des tests de glycosynthèse. En effet, suite à la première synthèse du sucre donneur activé, les analyses par HPEAC et MS ont révélé la présence d'impuretés saccharidiques au sein de l'échantillon de sucre fluoré, soit du xylose et du xylobiose (figure 22 et 23). Ces impuretés ont donc pu être nuisibles à la réaction de glycosynthèse. Une hypothèse est que le xylose n'étant pas un sucre utilisé par les enzymes mutées, puisque ce sont des endoxylanases, aurait pu, par compétition au site actif avec le sucre donneur fluoré, empêcher le bon fonctionnement de la réaction de glycosynthèse. Dans le cas du sucre donneur activé issu de la seconde synthèse, seul le xylose, mais en très faibles proportions, a été détecté en tant qu'impureté (figure 25 et 26). Cependant, ce sucre fluoré semble s'être dégradé au cours du temps. En effet, tout juste avant son utilisation pour les seconds tests de glycosynthèse, le sucre donneur fluoré, issu pratiquement pur de la seconde synthèse, a été analysé par HPEAC (figure 28B). Lorsque comparé au résultat de son analyse par HPEAC quelques semaines auparavant, soit suite à sa synthèse, on observe au temps de rétention de 12 minutes (figure 28A) l'apparition d'une impureté au sein de l'échantillon qui n'a pu être

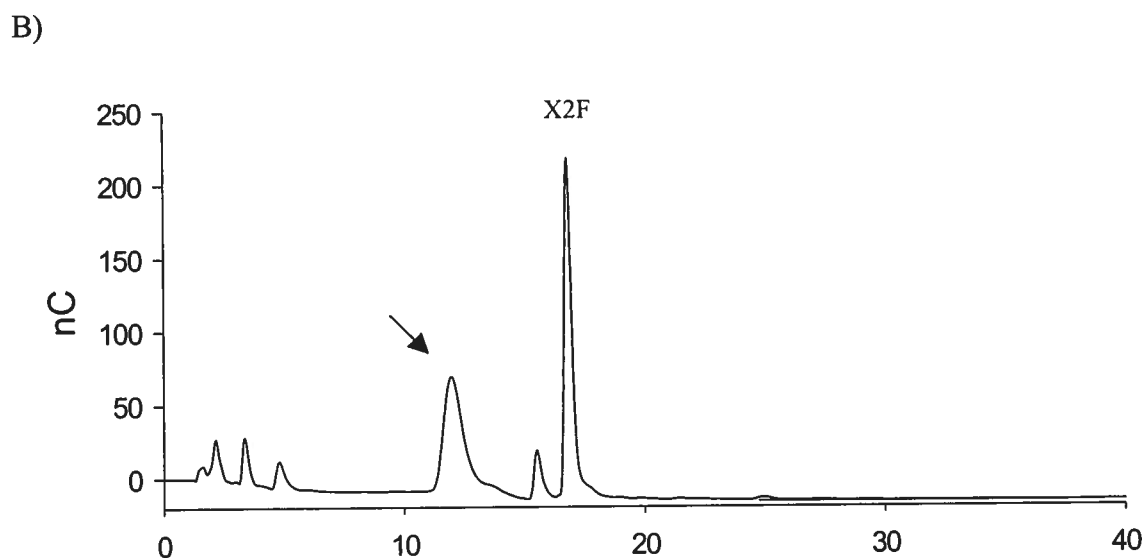
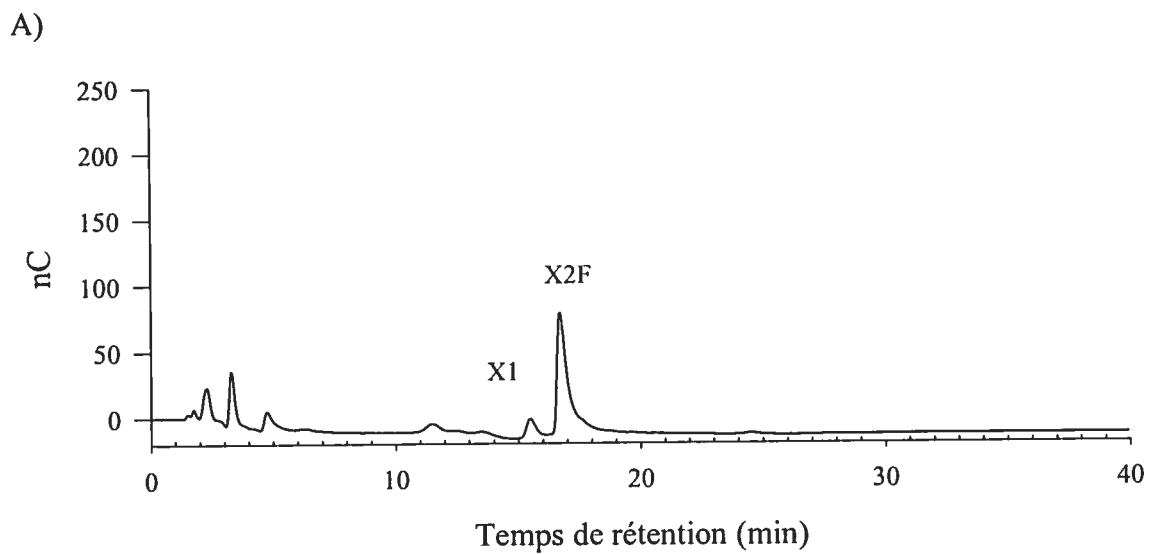


Figure 28: Analyse par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance du sucre donneur 1-fluoroxyllobiose obtenu sous forme pratiquement pure A) suite à sa synthèse B) au moment de son utilisation pour la réaction de glycosynthèse.

identifiée. Il semblerait donc que le sucre fluoré se soit dégradé au cours du temps, expliquant ainsi les résultats non reproductibles lors des seconds tests de glycosynthèse.

Enfin, les faibles rendements de synthèse du 1-fluoroxylbiose ont fait en sorte que très peu de sucres donneurs fluorés ont pu être récupérés. Cette faible quantité de sucres fluorés disponibles a grandement limité les tests de glycosynthèse pouvant être effectués. Ainsi, les chances de déterminer les meilleures conditions pour une synthèse optimale ont largement été diminuées.

CONCLUSION

Étant donné leurs implications dans plusieurs processus biologiques et leurs potentiels en tant qu'agents thérapeutiques, l'intérêt pour la synthèse d'oligosaccharides s'est accentué ces dernières années. Différentes méthodes ont été mises à profit, soit la synthèse chimique et la synthèse enzymatique via les glycosyles transférases et les glycosidases par le mode de transglycosylation. Bien qu'exploitées, ces méthodes de synthèse ne se sont pas avérées efficaces pour une production à grande échelle.

Une nouvelle méthode prometteuse pour la synthèse d'oligosaccharides a été développée dernièrement (Mackenzie *et al.*, 1998). Cette méthode utilise des glycosidases de rétention spécifiquement mutées. Il a été démontré, parmi les deux résidus du site actif responsables de l'activité d'hydrolyse, que la mutation du résidu nucléophile par une alanine entraîne une perte de l'activité glycosidique de l'enzyme et rend possible du même coup la synthèse d'oligosaccharides. En conjonction avec un sucre donneur activé de configuration anomérique opposée au substrat normal et en présence d'un sucre accepteur approprié, l'enzyme mutée peut efficacement effectuer la synthèse d'oligosaccharides avec des rendements de plus de 90% (Withers *et al.*, 1998; Malet et Planas, 1998).

Streptomyces lividans est une bactérie qui produit des glycosidases de rétention dont entre autres les xylanases A (XlnA), B (XlnB) et C (XlnC). L'objectif général de ce projet était donc de déterminer la capacité de ces glycosyles hydrolases à synthétiser des oligosaccharides par cette nouvelle réaction appelée glycosynthèse. Les objectifs spécifiques étaient donc de muter le résidu catalytique nucléophile de ces trois enzymes, produire et purifier les enzymes mutées, déterminer l'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées, synthétiser le sucre donneur activé nécessaire à la réaction de glycosynthèse et tester la capacité des enzymes mutées à faire la synthèse d'oligosaccharides par glycosynthèse en utilisant un sucre donneur activé et différents sucres accepteurs.

Les enzymes mutées XlnA₂-E236A, XlnB₂-E87A et XlnC-E85A ont donc été obtenues à l'aide de la mutagenèse dirigée par PCR. Les productions en fermenteur des

enzymes mutées ont été effectuées et les procédures de purification mises au point pour les récupérer sous une forme pure. L'activité résiduelle d'hydrolyse des enzymes mutées a aussi été déterminée par la suite. Bien que l'on s'attendait que la mutation inactive complètement l'activité d'hydrolyse, une activité résiduelle d'hydrolyse a été détectée pour chacune des enzymes mutées. La XlnA2-E236A a présenté l'activité résiduelle d'hydrolyse la plus faible parmi les trois enzymes mutées avec une valeur moyenne de 0,02% lorsque comparé à l'enzyme sauvage correspondante. De son côté, la XlnC-E85A a démontré une valeur moyenne d'activité résiduelle d'hydrolyse de 0,20%. Quant à la XlnB2-E87A, des valeurs beaucoup plus élevées, jusqu'à 11,9%, ont été obtenues. L'utilisation de colonnes ayant préalablement servi à la purification d'enzymes actives, l'utilisation d'un tampon pouvant régénérer l'activité nucléophile par la présence de groupements carboxyliques ou encore la présence d'une activité contaminante dû au phénomène d'incorporation erroné lors du processus de traduction sont tous des facteurs ayant pu contribuer à la présence de cette activité résiduelle d'hydrolyse.

La synthèse du sucre donneur activé fluoré nécessaire à la réaction de glycosynthèse a aussi été effectuée. Parmi les nombreuses synthèses entreprises, seulement deux ont permis de récupérer le sucre donneur activé désiré. Cependant, de très faibles rendements ont été obtenus. La première synthèse d'un rendement de 1,3% a fournit le sucre fluoré sous une forme brute. La seconde synthèse d'un rendement de 1,1% a permis de récupérer, grâce à une étape de purification supplémentaire, le sucre fluoré sous une forme pure. Bien que certains paramètres aient été améliorés lors des différentes synthèses, le protocole de synthèse du sucre donneur 1- α -fluoroxyllobiose nécessite encore une mise au point afin d'obtenir de meilleurs rendements.

Enfin, les faibles quantités disponibles de sucre donneur fluoré ont évidemment grandement limité les tests de glycosynthèse pouvant être effectués. Deux séries de tests de glycosynthèse ont pu être entrepris. La première série utilisant le sucre donneur fluoré sous une forme brute a démontré que seules les enzymes mutées XlnA₂-E236A et XlnB₂-E87A, en présence du sucre accepteur xylotriose, possèdent la capacité de synthétiser des oligosaccharides. Cependant, une très faible synthèse a été observée. Par ailleurs, ces

résultats n'ont malheureusement pas pu être reproduits lors des seconds tests de glycosynthèse avec le sucre fluoré sous forme pure, probablement en raison d'une dégradation du sucre donneur fluoré au cours du temps.

Enfin, différentes publications sur la glycosynthèse avec d'autres glycosidases de rétention ont fait parution au cours de ce projet. L'enzyme mutée thermophile β -glycosidase-E387G de *Sulfolobus solfataricus* (Trincone *et al.*, 2000) ainsi que l'enzyme mutée cellulase endoglucanase I de *Humicola insolens* (Fort *et al.*, 2000) se sont vu conférer la capacité de synthétiser des oligosaccharides par la réaction de glycosynthèse. Par ailleurs, lors d'une seconde publication sur la glycosynthèse avec l'enzyme β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium* (Abg), une nouvelle enzyme mutée, soit l'enzyme mutée Abg-E358S a fourni un rendement de synthèse plus élevé par rapport à la première enzyme mutée Abg-E358A utilisée précédemment (Mayer *et al.*, 2000). Il est ainsi difficile de croire, selon ces publications, que la réaction de glycosynthèse ne puisse s'appliquer aux enzymes mutées générées au cours de ce projet. Pour une continuité du projet, il serait ainsi intéressant de déterminer l'origine de cette activité résiduelle d'hydrolyse qui est en grande partie responsable du résultat faible ou nul de synthèse obtenu. Ayant démontré des rendements de synthèse plus élevés, il serait aussi intéressant de préparer de nouvelles enzymes mutées constituées d'une sérine au lieu d'une alanine. De plus, afin d'éviter le problème d'activité résiduelle d'hydrolyse, il serait plus avantageux d'utiliser un codon le plus différent du codon sauvage pour la mutagenèse dirigée, d'utiliser des colonnes fraîchement préparées et propre à chaque enzyme mutée lors de la purification et d'utiliser un tampon autre que le tampon acétate. Enfin, le protocole de synthèse du sucre donneur fluoré devrait être amélioré. De meilleurs rendements permettraient d'effectuer plusieurs tests de glycosynthèse et aussi d'analyser par RMN la configuration axiale ou équatoriale du fluor sur le sucre donneur activé. Par ailleurs, un sucre donneur fluoré obtenu sous forme pure augmenterait les chances de succès pour la réaction de glycosynthèse de ces différentes enzymes mutées.

BIBLIOGRAPHIE

- BEVILACQUA, M.P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M.A., SEED, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **243** : 1160-1165.
- BIELY, P., KLUEPFEL, D., MOROSOLI, R., SHARECK, F. 1993. Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1162** : 246-254.
- CHANDRASEKARAN, E.V., JAIN, R.K., LARSEN, R.D., WLASICHUK, K., MATTA, K.L. 1995. Selectin ligands and tumor-associated carbohydrate structures: specificities of alpha 2,3-sialyltransferases in the assembly of 3'-sialyl-6-sialyl/sulfo Lewis a and x, 3'-sialyl-6'-sulfo Lewis x, and 3'-sialyl-6-sialyl/sulfo blood group T-hapten. *Biochemistry*, **34** : 2925-36.
- COOPER, D.K., KOREN, E., ORIOL, R. 1994. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol. Rev.*, **141** : 31-58.
- DAIGNEAULT-SYLVESTRE, N., KLUEPFEL, D. 1979. Method for rapid screening of cellulolytic *Streptomyces* and their mutants. *Can. J. Microbiol.*, **25** : 858-860.
- DAY, A.G., WHITERS, S.G. 1986. The purification and characterization of a beta-glucosidase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochem. Cell. Biol.*, **64** : 914-22.
- DEREWENDA, U., SWENSON, L., GREEN, R.R., WEI, Y., MOROSOLI, R., SHARECK, F., KLUEPFEL, D., 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.
- FORT, S., BOYER, V., GREFFE, L., DAVIES, G.J., MOROZ, O., CHRISTIANSEN, L., SCHÜLEIN, M., COTTAZ, S., DRIGUEZ, H. 2000. Highly Efficient Synthesis of β (1 \rightarrow 4)-Oligo- and Polysaccharides Using a Mutant Cellulase. *J. Am. Chem. Soc.*, **122** : 5429-5437.
- GALILI, U., BUEHLER, J., SHOHET, S.B., MACHER, B.A. 1987. The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J. Exp. Med.*, **165** : 693-704.
- GALILI, U., MACHER, B.A., BUEHLER, J., SHOHET, S.B. 1985. Human natural anti-alpha-galactosyl igG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, **162** : 573-582.
- HEMMERICH, S., BERTOZZI, C.R., LEFFLER, H., ROSEN, S.D. 1994. Identification of the sulfated monosaccharides of GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *Biochemistry*, **33** : 4820-9.

HEMMERICH, S., ROSEN, S.D. 1994. 6'-sulfated sialyl Lewis x is a major capping group of GlyCAM-1. *Biochemistry*, **33** : 4830-5.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. 1993. New families in the classification of glycosyls hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293** : 781-788.

HOPWOOD, D.A., BIBB, M.J., CHATER, K.F., KIESER, T., BRUTON, C.J., KIESER, H.M., LYDIATE, D.J., SMITH, C.P., WARD, J.M., SCHREMPF, H., Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual : The John Innes Foundation; 1985.

INNIS, M.A., DAVID, H.G., GELFAND, J.S., THOMAS, J.W. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. 1990.

JOHNSTON, G.I., COOK, R.G., MCEVER, R.P. 1989. Cloning of GMP-140, agranule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell*, **56** : 1033-1044.

JUNCOSA, M., PONS, J., DOT, T., QUEROL, E., PLANAS, A. 1994. Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **269** : 14530-5.

JÜNNEMAN, J., THIEM, J., PEDERSEN, C. 1993. Facile synthesis of acetylated glycosyl fluorides derived from di- and tri-saccharides. *Carbohydr. Res.*, **249** : 91-94.

KATZ, E., THOMPSON, C.J., HOPWOOD, D.A. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.*, **129** : 2703-2714.

KEMPTON, J.B., WHITERS, S.G. 1992. Mechanism of *Agrobacterium* beta-glucosidase: kinetic studies. *Biochemistry*, **31** : 9961-9.

KLUEPFEL, D., DAIGNEAULT, N., MOROSOLI, R., SHARECK, F. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36** : 626-631.

KLUEPFEL, D., VATS-MEHTA, S., AUMONT, F., SHARECK, F., MOROSOLI, R. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.*, **267** : 45-50.

KOBATA, A. 1993. Glycobiology : An Expanding Research Area in Carbohydrate Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **26** : 319-324.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-85.

LASKY, L.A., SINGER, M.S., YEDNOCK, T.A., DOWBENKO, D., FENNIE, C., RODRIGUEZ, H., NGUYEN, T., STACHEL, S., ROSEN, S.D. 1989. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell*, **56** : 1045-1055.

LAWSON, J.H., PLATT, J.L. 1996. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation*, **62** : 303-310.

LOWE, J.B., STOOLMAN, L.M., NAIR, R.P., LARSEN, R.D., BERHEND, T.L., MARKS, R.M. 1990. ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell*, **63** : 475-84.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.

LY, H.D., WITHERS, S.G. 1999. Mutagenesis of Glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.*, **68** : 487-522.

MACKENZIE, L.F., WANG, Q., WARREN, R.A.J., WHITERS, S.G. 1998. Glycosynthases : Mutant Glycosidase for Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **120** : 5583-5584.

MALET, C., PLANAS, A. 1998. From β -glucanase to β -glucansynthase : glycosyl transfer to α -glycosyl fluorodes catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Letters*, **440** : 208-212.

MALET, C., JIMENEZ-BARBERO, J., BERNABE, M., BROSA, C., PLANAS, A. 1993. Stereochemical course and structure of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Biochem. J.*, **296** : 753-8.

MAYER, C., ZECHEL, D.L., REID, S.P., ANTONY, R., WARREN, J., WITHERS, S.G. 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Letters*, **466** : 40-44.

MONDOU, F., SHARECK, F., MOROSOLI, R., KLUEPFEL, D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene*, **48** : 323-329.

MOREAU, A., ROBERGE, M., MANIN, C., SHARECK, F., KLUEPFEL, D., MOROSOLI, R. 1994. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Biochem J.*, **302** : 291-295.

NEETHLING, F.A., KOREN, E., YE, Y., RICHARDS, S.V., KUJUNDZIC, M., ORIOL, R., COOPER, D.K. 1994. Protection of pig kidney (PK15) cells from the cytotoxic effect of anti-pig antibodies by alpha-galactosyl oligosaccharides. *Transplantation*, **57** : 959-963.

- NILSSON, K.G.I. 1988. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Tibtech.*, **6** : 256.
- PHILLIPS, M.L., NUDELMAN, E., GAETA, F.C., PEREZ, M., SINGHAL, A.K., HAKOMORI, S., PAULSON, J.C. 1990. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science*, **250** : 1130-2.
- POLLEY, M.J., PHILLIPS, M.L., WAYNER, E., NUDELMAN, E., SINGHAL, A.K., HAKOMORI, S., PAULSON, J.C. 1991. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88** : 6224-8.
- POTHOULAKIS, C., GALILI, U., CASTAGLIUOLO, I., KELLY, C.P., NIKULASSON, S., DUDEJA, P.K., BRASITUS, T.A., LAMONT, J.T. 1996. A human antibody binds to alpha-galactose receptors and mimics the effects of *Clostridium difficile* toxin A in rat colon. *Gastroenterology*, **110** : 1704-1712.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIAKIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- SAMUELSSON, B.E., RYDBERG, L., BREIMER, M.E., BACKER, A., GUSTAVSSON, M., HOLGERSSON, J., KARLSSON, E., UYTERWAAL, A.C., CAIRNS, T., WELSH, K. 1994. Natural antibodies and human xenotransplantation. *Immunol. Rev.*, **141** : 151-168.
- SEARS, P. et WONG, C.H. 1996. Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 12086-12093.
- SCHIMMEL., P. 1989. Hazards of Deducing Enzyme Structure-Activity Relationships on the Basis of Chemical Application of Molecular Biology. *Acc. Chem. Res.*, **22** : 232-233.
- SCHÜLEIN, M. 2000. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1543** : 239-252.
- SIEGELMAN, M.H., VAN DE RIJN, M., WEISSMAN, I.L. 1989. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interactions domains. 1989. *Science*, **243** : 1165-1172.
- SIMON, P.M. 1996. Pharmaceutical oligosaccharides. *Drug Discovery Today*, **1** : 522-528.
- THIEM, J. 1995. Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16** : 193-211.

- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76** : 4350-4354.
- TRINCONE, A., PERUGINO, G., ROSSI, M., MORACCI, M. 2000. A Novel Thermophilic Glycosynthase That Effects Branching Glycosylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10** : 365-368.
- VARKI, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides : all of the theories are correct. *Glycobiology*, **3** : 97-130.
- WALZ, G., ARUFFO, A., KOLANUS, W., BEVILACQUA, M., SEED, B. 1990. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, **250** : 1132-5.
- WANG, Q., GRAHAM, R. W., TRIMBUR, D., WARREN, R. A. J., WHITERS, S. G. 1994. Changing Enzymatic Reaction Mechanisms by Mutagenesis : Conversion of a Retaining Glucosidase to an Inverting Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **116** : 11594-11595.
- WHITERS, S. G., RUPITZ, K., TRIMBUR, D., WARREN, R. A. J. 1992. Mechanistic Consequence of Mutation of the Active Site Nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β -Glucosidase. *Biochemistry*, **31** : 9919-9985.
- WILLIAMS, S.J., WITHERS, S.G. 2000. Glycosyl fluorides in enzymatic reactions. *Carbohydr. Res.*, **327** : 27-46.
- WONG, C.H., HALCOMB, R. L., ICHIKAWA, Y., KAJIMOTO, T. 1995. Enzymes in Organic Synthesis : Application to the Problems of Carbohydrates Recognition (Part 2). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34** : 521-546.
- YOKOYAMA, M. 2000. Methods of synthesis of glycosyl fluorides. *Carbohydr. Res.*, **327** : 5-14.
- ZHOU, Q., MOORE, K.L., SMITH, D.F., VARKI, A., MCEVER, R.P., CUMMING, R.D. 1991. The selectin GMP-140 binds to sialylated, fucosylated lactosaminoglycans on both myeloid and nonmyeloid cells. *J. Cell. Biol.*, **115** : 557-64.
- ZOPF, D., ROTH, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *The Lancet*, **347** : 1017-21.

ANNEXES

Annexe A : Milieu solide de sporulation Bennett-thiostrepton

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

Ajuster le pH à 7,3 avec du NaOH

Bacto-Agar	20,0 g
------------	--------

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes

Laisser refroidir jusqu'à ce que la température soit à 55°C

Ajouter aseptiquement 1 mL d'une solution de thiostrepton 50 mg/mL

Annexe B : Milieu solide de régénération R5

Agar	22,0 g
Casamino acid	100,0 mg
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	10,0 g
K ₂ SO ₄	250,0 mg
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	10,12 g
Sucrose	103,0 g
Tampon TES	5,73 g
Solution élément trace	2,0 mL

(Volume final de la solution : 1 litre)

La solution est autoclavée (95 kPa à 121°C pendant 15 minutes) et les solutions suivantes stérilisées préalablement par filtration (0,22 µm) sont ajoutées aseptiquement.

KH ₂ PO ₄ 0,5% (p/v)	10,0 mL
CaCl ₂ 5M	4,0 mL
L-proline 20% (p/v)	15,0 mL
CuSO ₄ 5 mg/mL	1,0 mL
Méthionine 1% (p/v)	10,0 mL
Tyrosine (40% (p/v) dans NaOH 1N)	5,0 mL

Un volume de 20 mL est versé par plaque de pétri. Le tout est laissé séché à 85% du poids original (environ 5 jours à la température de la pièce).

Annexe B (suite)

Solution élément trace

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ • 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ • 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O	10 mg

Annexe C : Milieu Simmons-Citrate agar

Simmons-citrate agar déshydraté	24,2 g
Glucose	4,0 g
Thyamine	0,1 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillé.

Autoclaver: 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe D : Milieu liquide 2xTY

Bacto-tryptone	16,0 g
Extrait de levure	10,0 g
NaCl	5,0 g

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Pour le milieu solide, ajouter 15 g d'agar par litre de milieu

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe E : Milieu H

Agar	12,0 g
Bacto-tryptone	10,0 g
NaCl	8,0 g

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Autoclaver (95 kPa à 121°C pendant 15 minutes) et répartir 20 mL par plaque de Pétri

Annexe F : Milieu solide RBB-Xylane (Daigneault-Sylvestre et Kluepfel, 1979)

RBB-xylane	1,50 g
Bacto-agar	17,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
Extrait de levure	0,50 g
KCl	0,50 g

Ajuster le pH à 7,2

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes

Ajouter stérilement un volume de 10 mL d'une solution de MgSO₄ 5% (p/v) stérilisée préalablement par filtration (0,22µm)

Annexe G : Milieu M15

K ₂ HPO ₄	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
NaNO ₃	1,40 g
Tween 80	2,0 mL
Solution de sels minéraux (Sels de Mandels)	1,0 mL

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Ajuster le pH à 7,4

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes

Ajouter stérilement :

MgSO ₄ (solution 5% (p/v) autoclavée)	6,0 mL
CaCl ₂ (solution 3% (p/v) autoclavée)	10,0 mL

Sels de Mandels

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	140 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	160 mg
FeSO ₄ • H ₂ O	500 mg
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	200 mg

Dans 10 mL d'eau distillée

Annexe H : Milieu M14

K ₂ HPO ₄	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40 g
Tween 80	2,0 mL
Solution de sels minéraux (Sels de Mandels)	1,0 mL

Compléter à un litre avec de l'eau distillée

Ajuster le pH à 7,4

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 minutes

Ajouter stérilement :

MgSO ₄ (solution 5% (p/v) autoclavée)	6,0 mL
CaCl ₂ (solution 3% (p/v) autoclavée)	10,0 mL

Sels de Mandels

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	140 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	160 mg
FeSO ₄ • H ₂ O	500 mg
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	200 mg

Dans 10 mL d'eau distillée

Annexe I : Révélateur cérique

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	20,0 g
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8,3 g
Eau milliQ	750,0 mL
H_2SO_4 18 N	90,0 mL

Compléter à 1 litre avec de l'eau milli-Q