

Non nova, sed nove

Non pas des choses nouvelles, mais d'une manière nouvelle.

Université du Québec

Mémoire

présenté à

l'Institut Armand Frappier

comme exigence partielle

de la maîtrise en

microbiologie appliquée

par

Patrick Vincent

Clonage, purification et caractérisation d'une nouvelle  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase  
chez *Streptomyces lividans*.

Août 1996

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>x</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>xii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>2</b>
1.0 LES HÉMICELLULOSES ET LE SUCRE L-ARABINOSE .....	2
2.0 BIODÉGRADATION DES HÉMICELLULOSES .....	4
3.0 LES $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASES (EC.3.2.1.55) .....	6
4.0 ORGANISMES PRODUCTEURS D'UNE $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASE ..	6
4.1 Les bactéries .....	8
4.2 Les champignons et moisissures .....	9
4.3 Les plantes .....	11
5.0 SUBSTRATS DE FERMENTATION .....	12
6.0 SUBSTRATS DE L'ENZYME .....	13

7.0 CLASSIFICATION DES $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASES . . . . .	16
8.0 CLONAGE DU GÈNE . . . . .	17
9.0 DÉPISTAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE . . . . .	20
10.0 PURIFICATION DE L'ENZYME . . . . .	20
11.0 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES . . . . .	24
11.1 Caractéristiques biochimiques . . . . .	24
11.2 Inhibiteurs de l'activité enzymatique . . . . .	25
11.3 Activateurs . . . . .	25
12.0 APPLICATIONS . . . . .	26
13.0 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES . . . . .	27
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .</b>	<b>28</b>
1.0 LISTE DES PRODUITS . . . . .	28
2.0 LISTE DES SUBSTRATS . . . . .	30
3.0 MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET VECTEURS UTILISÉS . . . . .	31
3.1 Souches bactériennes . . . . .	31
3.2 Vecteur plasmidique . . . . .	31
4.0 MILIEUX DE CULTURE . . . . .	32
4.1 Milieu pour la conservation des souches . . . . .	32
4.2 Milieu de détection de l'activité enzymatique . . . . .	32
4.3 Milieu pour la production de l'inoculum . . . . .	34

4.4 Milieu pour la production de l'enzyme . . . . .	34
5.0 SOUS-CLONAGE ET ANALYSE PLASMIDIQUE . . . . .	35
5.1 Amplification de l'ADN par PCR . . . . .	35
5.2 Ligation . . . . .	36
5.3 Transformation . . . . .	36
5.4 Extraction de l'ADN plasmidique . . . . .	37
5.5 Digestion de l'ADN plasmidique . . . . .	38
5.6 Analyse de l'ADN plasmidique . . . . .	38
6.0 FERMENTATION BATCH . . . . .	39
7.0 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE . . . . .	39
7.1 Analyse qualitative de l'activité enzymatique . . . . .	39
7.2 Analyse des sucres par chromatographie . . . . .	40
7.3 Analyse quantitative . . . . .	40
7.4 Dosage des protéines . . . . .	41
7.5 Définition des unités . . . . .	41
8.0 PURIFICATION DE L'ENZYME . . . . .	42
9.0 CARACTÉRISATION DE L'ENZYME . . . . .	43
9.1 Masse moléculaire . . . . .	43
9.2 Point isoélectrique . . . . .	44

9.3 pH, température optimaux . . . . .	45
9.4 Cinétique enzymatique . . . . .	46
9.5 Stabilité thermique . . . . .	47
<b>10.0 PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX . . . . .</b>	<b>47</b>
10.1 Immunisation . . . . .	47
10.2 Transfert des protéines sur nitrocellulose . . . . .	48
10.3 Immunodétection . . . . .	48
10.4 Autoradiographie . . . . .	49
<b>11.0 SYNERGISME ENZYMATIQUE . . . . .</b>	<b>49</b>
<b>12.0 GLYCOSYLATION . . . . .</b>	<b>50</b>
<b>III. RÉSULTATS . . . . .</b>	<b>51</b>
1.0 AMPLIFICATION DU GÈNE PAR PCR . . . . .	51
2.0 SOUS-CLONAGE DU GÈNE . . . . .	53
3.0 PRODUCTION DE L'ENZYME . . . . .	55
4.0 PURIFICATION DE L'ENZYME . . . . .	55
4.1 Purification . . . . .	55
4.2 Rendement . . . . .	56

	vi
<b>5.0 CARACTÉRISATION DE L'ENZYME</b> . . . . .	<b>60</b>
5.1 Masse moléculaire, point isoélectrique, et glycosylation . . . . .	60
5.2 Température et pH optimaux . . . . .	62
5.3 Cinétique enzymatique . . . . .	62
5.4 Stabilité thermique . . . . .	66
5.5 Immuno-identification . . . . .	66
5.6 Profils d'hydrolyse . . . . .	69
<b>6.0 SYNERGISME ENZYMATIQUE</b> . . . . .	<b>74</b>
<b>IV. DISCUSSION</b> . . . . .	<b>79</b>
<b>CONCLUSION</b> . . . . .	<b>90</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> . . . . .	<b>92</b>
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES</b> . . . . .	<b>93</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b>	Les $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les bactéries. . . . .	8
<b>Tableau 2:</b>	Les $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les champignons et moisissures. . . . .	10
<b>Tableau 3:</b>	Les $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les plantes. . . . .	11
<b>Tableau 4:</b>	Exemples de purification d'une $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. . . . .	23
<b>Tableau 5:</b>	Propriétés physico-chimiques des $\alpha$ -L-abf. . . . .	24
<b>Tableau 6:</b>	Tableau de purification de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B. . . . .	58
<b>Tableau 7:</b>	Tableau synoptique des Abfs de <i>S. lividans</i> . . . . .	91



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b>	Représentation schématisée d'une molécule d'hétéroxylan avec les sites d'attaque des enzymes du système xylanolytique. . . . .	5
<b>Figure 2:</b>	Configurations probables de l'arabinose sur le $\beta$ -D-1,4-xylan. . .	7
<b>Figure 3:</b>	Hémicelluloses isolées des tissus végétaux et des graines. . . .	15
<b>Figure 4:</b>	Carte de restriction du plasmide pIJ702. . . . .	19
<b>Figure 5:</b>	Substrats synthétiques hydrolysés par une Abf. . . . .	22
<b>Figure 6:</b>	Amplification du gène <i>abfB</i> par PCR. . . . .	52
<b>Figure 7:</b>	Hydrolyse enzymatique du substrat 4-MUA médiée par les surnageants de culture des clones IAF1 et IAF10. . . . .	54
<b>Figure 8:</b>	Hydrolyse du substrat RBB-xylan par XlnA et AbfB. . . . .	57
<b>Figure 9:</b>	Courbe de titration électrophorétique de l'AbfB sur gel de polyacrylamide contenant des ampholites formant un gradient de pH de 3 à 9 (PhastSystem, Pharmacia). Gel coloré au nitrate d'argent. . . . .	59
<b>Figure 10:</b>	Détermination du poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS (PhastSystem, Pharmacia), gel coloré au nitrate d'argent. . .	61
<b>Figure 11:</b>	Effet du pH sur l'activité enzymatique de l'AbfB. . . . .	63

<b>Figure 12:</b>	Effet de la température sur l'activité enzymatique de l'AbfB. .	64
<b>Figure 13:</b>	Courbe de Lineweaver-Burke avec le substrat xylan d'épeautres d'avoine soluble. . . . .	65
<b>Figure 14:</b>	Thermosensibilité de l'AbfB. . . . .	67
<b>Figure 15:</b>	Immunoréaction croisée des anticorps dirigés contre l'AbfB et la XlnA. . . . .	68
<b>Figure 16:</b>	Patrons d'hydrolyse des arabino-oligoxylosides d'un hydrolysat de xylan d'épeautres d'avoine par l'AbfB après 1 heure. . . . .	70
<b>Figure 17:</b>	Patrons d'hydrolyse des arabino-oligoxylosides d'un hydrolysat de xylan d'épeautres d'avoine après 24 h. . . . .	72
<b>Figure 18:</b>	Patrons d'hydrolyse du xylan d'épeautres d'avoine par les xylanases et l'arabinofuranosidase B. . . . .	75
<b>Figure 19:</b>	Patrons d'hydrolyse de l'arabinoxylan de blé par les xylanases et l'arabinofuranosidase B. . . . .	77

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abf	arabinofuranosidase (enzyme)
<i>abf</i>	arabinofuranosidase (gène)
ADN	acide désoxyribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine sérique de bovin
CBD	cellulose binding domain
CM	carboxyméthyl
Da	Dalton(s)
DIG	digoxigenine
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
g	gramme(s)
<i>g</i>	unité gravitationnelle
h	heure(s)
IEF	isoélectrofocalisation
kDa	kiloDalton(s)
kg	kilogramme(s)
ki	constante inhibitrice
kpb	kilo paire de base(s)
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
L	litre(s)
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAHBAH	p-aminohydroxybenzoïque acide hydrazine
PBS	tampon phosphate saline
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pI	point isoélectrique
pNPA	p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside
p/v	poids/volume
M	molaire
M.M.	masse moléculaire
MUA	méthylumbélliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside
min	minute(s)
mg	milligramme(s)
ml	millilitre(s)
mM	millimole(s)
nm	nanomètre(s)
RBB	rémazol bleu brillant

rpm	rotation par minute
s	seconde(s)
SDS	sodium dodécyl sulphate
TBE	tampon Tris-Borate-EDTA
TBS	tampon Tris-Saline
TSB	bouillon de tryptone de soya
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminoéthane
ug	microgramme(s)
U.I.	unité(s) internationale(s)
ul	microlitre(s)
uM	micromole(s)
V <sub>max</sub>	vitesse maximale de l'activité enzymatique en saturation de substrat
XBD	xylan binding domain
Xln	xylanase (enzyme)
<i>xln</i>	xylanase (gène)
Xyl	xylosidase

## SOMMAIRE

L'arabinose est un sucre constitutif des plantes et est retrouvé comme groupement dans plusieurs hémicelluloses dont les arabinoxylans de céréales, mais peu dans les xylans des bois mous ou des bois durs. L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase catalyse l'hydrolyse d'un lien O-glycosidique d'un groupement  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl des arabinoxylans, des arabinans, des arabinogalactans, ainsi que des arabino-oligoxylosides.

Une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfB) a été purifiée chez *Streptomyces lividans*, avec une masse moléculaire de 43 000 Da et un point isoélectrique de 7,4. L'AbfB a libéré l'arabinose comme unique produit d'hydrolyse sur des substrats de haut poids moléculaire tel l'arabinoxylan et également les arabino-oligoxylosides de faible poids moléculaire, mais non sur les substrats synthétiques tel le p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside ou le 4 méthylumbélliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside. La présence d'un site de fixation sur le xylan (XBD) a montré que cette enzyme a eu une affinité envers les  $\beta$ -1,4-xylans. L'enzyme a possédé une activité  $\beta$ -xylosidasique résiduelle sur les arabino-oligoxylosides de faible poids moléculaire. L'AbfB a été une enzyme synergique dont l'activité a augmenté l'activité des xylanases sur les arabinoxylans. Finalement, l'AbfB a eu des caractéristiques biochimiques et une spécificité de substrat très différentes de l'AbfA de *S. lividans*.

## INTRODUCTION

Les streptomycètes sont des micro-organismes procaryotes de la famille des actinomycètes. Ces bactéries filamenteuses Gram + sont retrouvées principalement dans le sol. Les streptomycètes possèdent toutes les enzymes nécessaires à la dégradation complète des composantes de la biomasse lignocellulosique. De plus, l'une des caractéristiques de ces bactéries est leurs grande capacité de produire plusieurs enzymes extracellulaires ainsi que des antibiotiques lors du métabolisme secondaire.

Des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases ont été caractérisées chez plusieurs micro-organismes dont *Aspergillus niger* (Kaji et Tagawa, 1970), *Trichoderma reesei* (Poutanen, 1988) et *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hespell et O'Bryan, 1992). Par ailleurs, la bactérie *Streptomyces diastaticus* synthétise deux  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases différentes (Tajana et al., 1992). *Streptomyces lividans* produit une arabinofuranosidase (AbfA) intracellulaire de poids moléculaire élevé. L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase catalyse l'hydrolyse du lien  $\alpha$ -L-1,2-,  $\alpha$ -L-1,3-, ou  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl substitué au xylan, au galactan, ou tout autre polysaccharide contenant le sucre L-arabinose. Le L-arabinose est un sucre constitutif des plantes et des arbres (Kaji, 1984). Ce sucre est associé aux hétéroxylans dans les bois mous ainsi que les graminées. Les applications potentielles de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase sont nombreuses. Par exemple, le traitement des grains de céréales de la moulée animale avec cette enzyme pourrait contribuer à une augmentation de la digestibilité des fibres végétales.

La présente étude portera sur le clonage et l'expression de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dans un système homologue ainsi que la purification et la caractérisation biochimique de l'enzyme.

## I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.0 LES HÉMICELLULOSES ET LE SUCRE L-ARABINOSE

La biomasse végétale est composée d'environ 40 % de cellulose, 23 % de lignine et 33 % des hémicelluloses; conséquemment, les hémicelluloses représentent un tiers de la biomasse par poids sec et sont le deuxième composé le plus abondant dans la biosphère après la cellulose. Les hémicelluloses sont localisées dans la matrice de la paroi cellulaire végétale, par ailleurs, certains de ces polysaccharides représentent des sucres de réserve de la graine ou du fruit. Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides. Ces polysaccharides sont constitués de polymères linéaires de D-xylose, D-mannose, D-glucose, ou D-galactose pouvant contenir des résidus branchés L-arabinose, acétyl ou acide D-glucuronique. Ces différents sucres peuvent être acétylés ou bien méthylés. La plupart des hémicelluloses contiennent de deux à six de ces différents sucres. Les xylans ont un squelette constitué de D-xylose liés par des liens  $\beta$ -1,4, ou bien  $\beta$ -1,3 pour les hémicelluloses isolées des algues marines (Coughlan et Hazlewood, 1993).

Les  $\beta$ -1,4 xylans sont les principales hémicelluloses et sont retrouvés dans les bois mous, les bois durs ainsi que les graminées (Coughlan et Hazlewood, 1993). Le sucre arabinose se trouve généralement associé au xylan dans les bois mous et les graminées. Le xylan est très complexe, la composition et la structure de ce polysaccharide peut varier d'une plante à l'autre ainsi que d'un tissu à un autre (Biely, 1985).

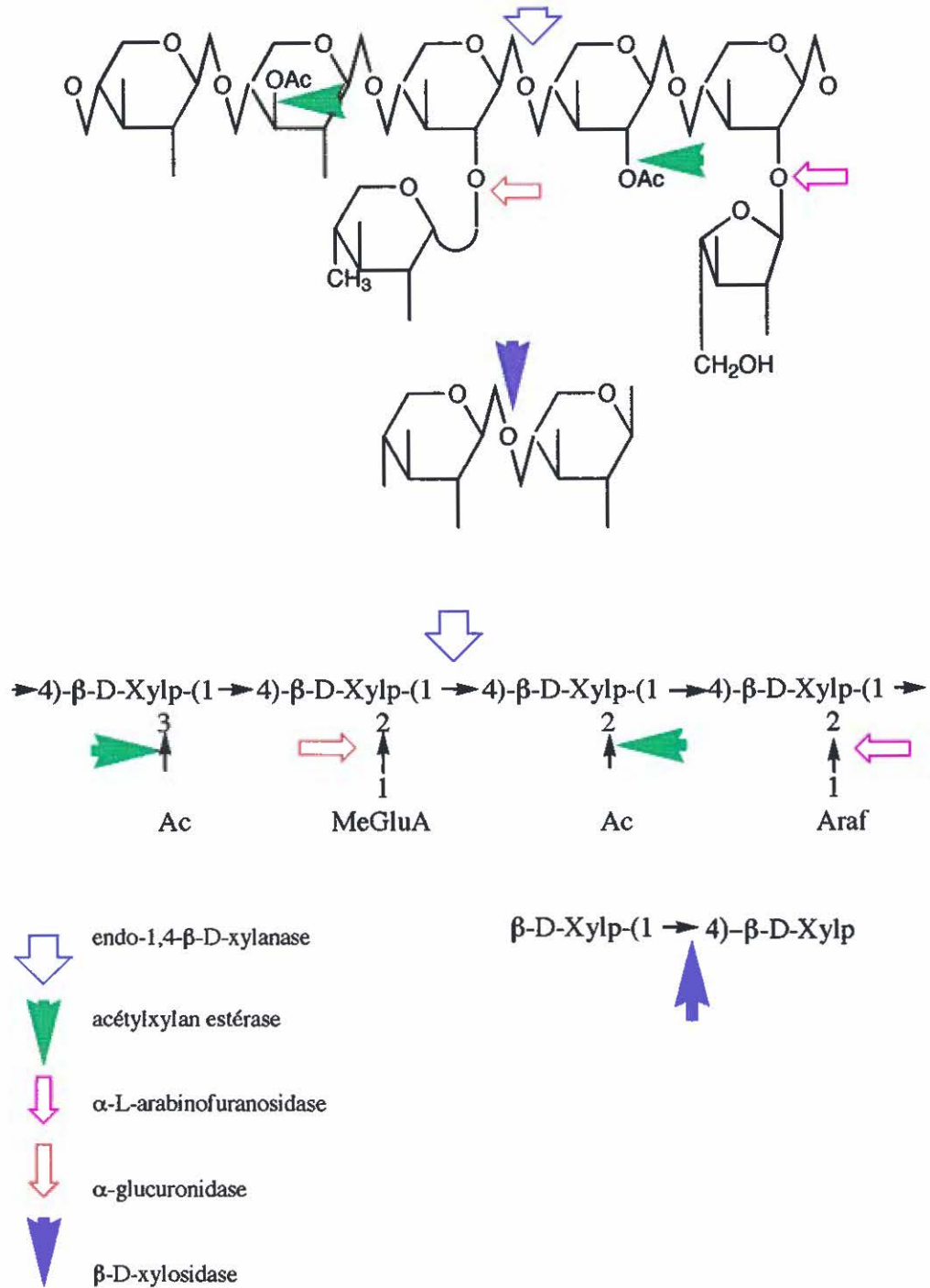
L'arabino-4-O-méthylglucuronoxylan est la principale hémicellulose retrouvée dans les graminées et est composé de  $\beta$ -D-xylopyranose, de l'acide 4-O-méthylglucuronique et le L-arabinofuranose dans un ratio 100:20:13. Par contre, les bois durs sont acétylés et ne contiennent pas ou très peu d'arabinose. L'acétyl-4-O-méthylglucuronoxylan constitue 10 à 35 % du poids sec des bois durs et est composé de  $\beta$ -D-xylopyranose, de l'acide 4-O-méthylglucuronique et de résidus acétyl (Coughlan et Hazlewood, 1993).

Le L-arabinose est un sucre largement distribué dans les hétéropolysaccharides et les glycoconjugués dont les arabinogalactans liées aux protéines (AGP). Cependant, la quantité de L-arabinose dans les tissus végétaux est relativement faible (Kaji, 1984). Malgré ce fait, ce résidu diminue l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses par les xylanases (Biely, 1985). Ce phénomène a été cité dans la littérature par de nombreux auteurs.



## 2.0 BIODÉGRADATION DES HÉMICELLULOSES

Les hémicelluloses sont dégradées par des hémicellulases (glycan hydrolases, EC 3.2.1.). Les  $\beta$ -D-galactanases, les  $\beta$ -D-mannanases et les  $\beta$ -D-xylanases sont les principales hémicellulases et dégradent les galactans, les mannans et les xylans respectivement. L'hydrolyse complète des hémicelluloses est effective grâce à un synergisme enzymatique entre une panoplie d'enzymes. La  $\beta$ -D-xylosidase, l'acétyl-xylan estérase, la 4-O-méthyl glucuronidase, ainsi que l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase sont des enzymes à action synergique (voir figure 1). Ces enzymes composent le système xylanolytique (Biely, 1985). Les glycan hydrolases effectuent la dépolymérisation de la chaîne principale linéaire du polysaccharide, composée de monomères de sucre tel le  $\beta$ -D-xylopyranose, au niveau des liaisons  $\beta$ -1,4. Une endo-xylanase clive le lien  $\beta$ -1,4 à l'intérieur de la chaîne alors qu'une exo-xylanase clive la chaîne à l'extrémité de celle-ci. Les glycans hydrolases clivent le lien glycosidique au hasard sur la chaîne ou à des endroits spécifiques. Selon la littérature, il semble que certaines enzymes vont cliver la chaîne du polysaccharide à proximité d'un résidu tel l'arabinose ou l'acide glucuronique (Coughlan et Hazlewood, 1993). Les différents oligomères libérés lors de la dégradation sont par la suite dégradés par des glycosidases spécifiques. Ces glycosidases hydrolysent les résidus branchés au polysaccharide ainsi que les oligomères libérés lors de la dégradation du polysaccharide. Les oligomères sont par la suite dégradés en monomères ou dimères pouvant pénétrer à l'intérieur de la cellule par des mécanismes de transport actif. Le xylose, le xylobiose et l'arabinose sont métabolisés.



**Figure 1:** Représentation schématisée d'une molécule d'hétéroxylan avec les sites d'attaque des enzymes du système xylanolytique.

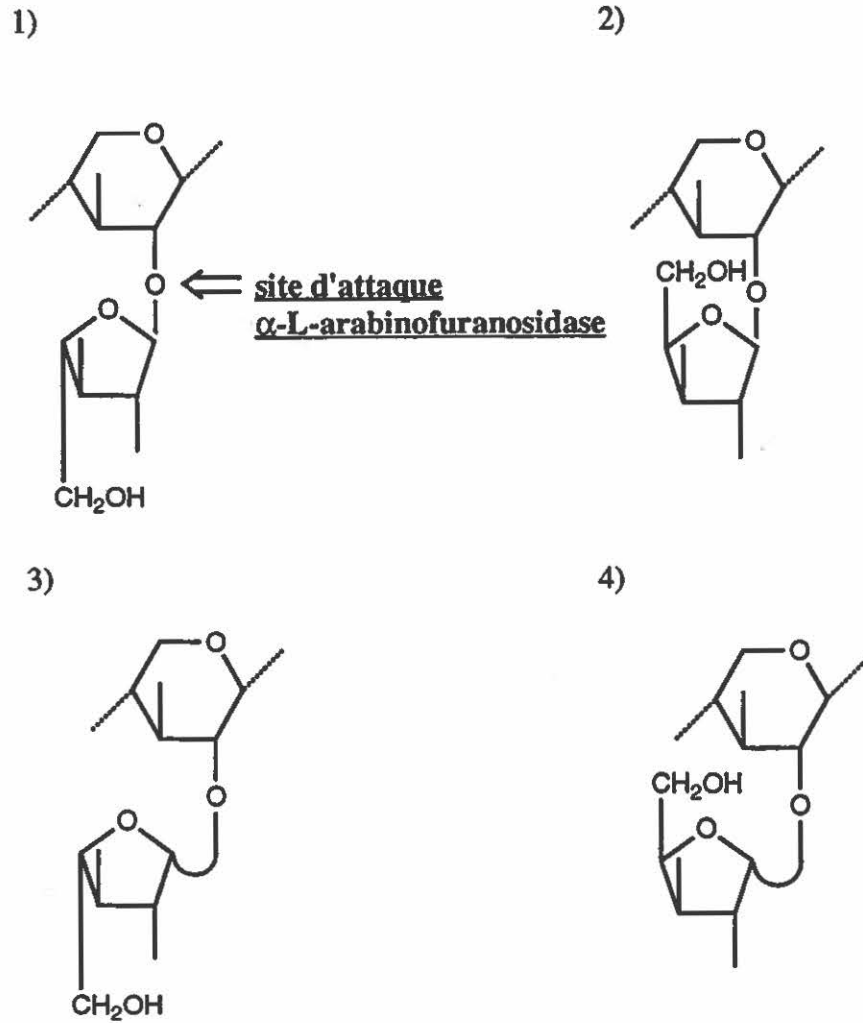
### 3.0 LES $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASES (EC 3.2.1.55)

L'  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase est une glycosidase (EC 3.2.1.55) qui hydrolyse le lien O-glycosyl à l'extrémité non-réductrice de divers arabinosides. L'enzyme agit sur les  $\alpha$ -L-arabino-oligosaccharides, les L-arabinan contenant des liens  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,5, les arabinoxylans et les arabinogalactans (Webb, 1984).

Cette enzyme peut hydrolyser différents substrats naturels contenant le L-arabinose, ainsi que les substrats synthétiques tel le p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside et le 4-méthylumbélliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside. Le produit d'hydrolyse libéré lors de la catalyse enzymatique est le L-arabinose. L'enzyme est très spécifique envers la configuration  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Effectivement, l'enzyme est incapable d'hydrolyser la liaison  $\alpha$ -D-,  $\beta$ -L-, ou  $\beta$ -D-arabinofuranosyl (voir figure 2). De plus, l'enzyme est inactive envers la configuration arabinopyranose. L'arabinanase (EC 3.2.1.99) est une enzyme spécifique à l'arabinan. Contrairement à l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, celle-ci hydrolyse le lien  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl seulement (Webb, 1984).

### 4.0 ORGANISMES PRODUCTEURS D'UNE $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASE

Des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases ont été étudiées chez plusieurs micro-organismes. Ces enzymes ont été purifiées et caractérisées à partir des bactéries, des actinomycètes, des champignons, des moisissures, de la levure ainsi que des plantes à partir des tissus végétaux et des graines.



1) sucre  $\alpha$ -L-arabinofuranose en position 2 du sucre  $\beta$ -D-xylopyranose sur une chaîne de  $\beta$ -D-1,4-xylan.

2)  $\alpha$ -D-arabinofuranose.

3)  $\beta$ -L-arabinofuranose.

4)  $\beta$ -D-arabinofuranose.

**Figure 2:** Configurations probables de l'arabinose sur le  $\beta$ -D-1,4-xylan

**Tableau 1:** Les  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les bactéries.

micro-organisme	référence
<i>Bacillus subtilis</i>	Weinstein et Albersheim (1979)
<i>Bacillus</i> sp.	Karimi et Ward (1988)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Gilead et Shoham (1995)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Lee et Forsberg (1987)
<i>Clostridium stercorarium</i>	Schwarz et al. (1995)
<i>Ruminococcus albus</i> 8	Greve et al. (1984)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Hespell et O'Bryan (1992)
<i>Streptomyces</i> sp. 17-1	Kaji et al. (1981)
<i>Streptomyces purpurascens</i>	Komae et al. (1982)
<i>Streptomyces diastaticus</i>	Tajana et al. (1992)
<i>Streptomyces lividans</i> 66	Manin et al. (1994)

#### 4.1 Les bactéries

Les bactéries fermentaires sont des organismes symbiotiques. Ces bactéries effectuent la dégradation des aliments riches en hémicelluloses provenant de l'alimentation. Ces bactéries ont été isolés du tractus gastro-intestinal. Les bactéries du genre *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, et *Bacteroides* ont une activité enzymatique arabinofuranosidase qui est inductible en réponse à la variation de la composition du contenu intestinal des animaux (Karimi et Ward, 1988). *Bacillus subtilis* est capable de dépolymériser complètement ces polysaccharides complexes.

Plusieurs Abfs ont été étudiées chez les streptomycètes. Une arabinofuranosidase (AbfA) a été caractérisée chez *S. lividans*. L'AbfA est une enzyme intracellulaire possédant un poids moléculaire de 385 kDa. L'enzyme est multimérique, elle est constituée de plusieurs sous-unités identiques. L'enzyme dégrade les arabino-oligosaccharides de faible poids moléculaire tel l'arabino-xylobiose et l'arabino-xylotriose et le substrat pNPA (Manin et al., 1994).

#### 4.2 Les champignons et moisissures

Plusieurs de ces micro-organismes sont des pathogènes des plantes. Les champignons et les moisissures jouent un rôle important dans la dégradation de la paroi cellulaire des plantes. Le genre *Sclerotinia* est un parasite des plantes, il est un producteur et sécrèteur de nombreuses enzymes dont la pectine méthyl-estérase, l'endo- et l'exo-1,4- $\beta$ -xylanase, la cellulase et l'arabinosidase (Ward et Moo-Young, 1989). La dégradation de la paroi cellulaire par ces enzymes cause une nécrose des tissus et occasionne plusieurs maladies.

**Tableau 2:** Les  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les champignons et moisissures.

micro-organisme	référence
<i>Aspergillus niger</i>	Kaji et Tagawa (1970)
<i>Aspergillus awamori</i>	Kormelink et al. (1991)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Fernandez-Espinar et al. (1994)
<i>Corticium rolfsii</i>	Kaji et Yoshihara (1970)
<i>Dichomitus squalens</i>	Brillouet et Moulin (1985)
<i>Penicillium capsulatum</i>	Filho et al. (1995)
<i>Sclerotinia fructigena</i>	Laborda et al. (1973)
<i>Trichoderma reesei</i>	Poutanen (1988)

La levure *Rhodotorula flava* produit également une enzyme arabinosidase. Une enzyme a été purifiée et caractérisée chez ce micro-organisme eucaryote (Uesaka et al., 1978).

### 4.3 Les plantes

Les glycan hydrolases et les glycosidases sont des enzymes produites par les plantes durant différentes périodes du développement, tel la maturation du fruit, la germination des graines ou bien dans le processus d'extension de la paroi cellulaire végétale lors de la croissance (Ward et Moo-Young, 1989). Au quatrième jour de la germination, une arabinofuranosidase a été isolée et caractérisée dans les graines de soya. Cette enzyme est nécessaire à la dégradation des polysaccharides de l'endosperme. Au cours de la germination des graines, les polysaccharides de réserve sont utilisés pour favoriser la croissance rapide du plantule. Par conséquent, l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase est activée à ce moment du développement de la plante.

**Tableau 3:** Les  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases chez les plantes.

organisme	référence
<i>Lupinus luteus</i>	Matheson et Saini (1977)
<i>Scopolia japonica</i>	Tanaka et Uchida (1978)
fèves de soya germées	Hatanaka et al. (1991)
feuilles d'épinard	Hirano et al. (1994)
graines de radis	Hata et al. (1992)
légumineuses	Chen et al. (1993)



## 5.0 SUBSTRATS DE FERMENTATION

La fermentation en milieu liquide est généralement le procédé utilisé pour la production d'une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Cependant, Roche et collaborateurs (1995) ont employé un procédé de fermentation en milieu solide pour la production d'une arabinofuranosidase de *Trichoderma reesei* sur un milieu contenant de la pulpe de betterave à sucre. Dans la plupart des cas, l'arabinosidase est produite dans un milieu liquide à l'aide d'une source de carbone adéquate. *Aspergillus niger* produit une arabinosidase, inductible, dans un milieu de culture contenant le L-arabinose ou le L-arabinan comme substrat carboné mais pas dans un milieu contenant une autre source de carbone (Tagawa et Kaji, 1988). Le L-arabinan (betterave à sucre) est également utilisé pour la production d'une arabinofuranosidase chez une bactérie du genre *Streptomyces* (Kaji et al., 1981; Komae et al., 1982). Le xylan d'épeautres d'avoine induit la production des enzymes xylanolytiques. Cette source carboné a entraîné une augmentation de l'activité xylanase, xylosidase et arabinofuranosidase (Hespell et O'Bryan, 1992) chez *Butyrivibrio fibrisolvens* en contraste au glucose, xylose ou arabinose. L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase A (Manin et al., 1994) de *Streptomyces lividans* a été produite dans un milieu contenant le xylan d'épeautres d'avoine.

Mac Farlane et collaborateurs (1990) ont évalué l'influence de diverses sources de carbone sur l'activité de plusieurs enzymes chez *Bacteroides ovatus*. Cette bactérie possède un taux de croissance spécifique plus élevé avec le xylan comparativement au xylose ou l'arabinose. *B. ovatus* doit synthétiser plusieurs enzymes pour métaboliser complètement le xylan en sucres simples. La présence de L-arabinose dans le milieu de culture favorise une induction maximale de l'Abf chez *B. ovatus* (Mac Farlane et al., 1990). Cette bactérie n'est pas sous le contrôle de la répression catabolique par les sucres simples. Biely (1985) a observé que de nombreuses enzymes xylanolytiques sont inductibles. Les conditions de culture sont sous la dépendance du type de micro-organisme, de la température, du pH, du temps d'incubation ainsi que de l'aération. L'optimisation des conditions de culture est primordial pour la production enzymatique.

## 6.0 SUBSTRATS DE L'ENZYME

Dans la littérature, on note une grande diversité de substrats pour les arabinofuranosidases. L'enzyme est spécifique envers le lien  $\alpha$ -L-1,2-,  $\alpha$ -L-1,3- ou  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl contrairement à l'arabinanase qui n'est spécifique qu'envers le lien  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl de l'arabinan uniquement. Généralement, tout substrat contenant des groupements L-arabinose constitue un substrat possible de l'enzyme.

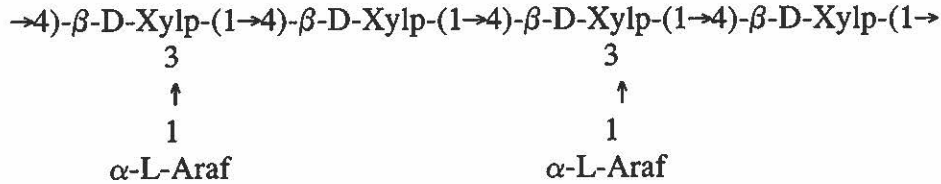
L'arabinoxylan contient le L-arabinose substitué en  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,2 du xylose. Il

Il y a une unité arabinose par 10 unités de xylose, cependant le niveau de substitution peut être plus élevé dépendamment de la source végétale (Aspinall, 1972). Par ailleurs, il est possible de retrouver deux résidus arabinose en position 2, en position 3, ou en position 2 et 3 sur le xylose. L'arabinoxylan est associé à la fraction hémicellulosique du tissu ligneux du bois mou, et se retrouve également dans les substances de réserve des céréales.

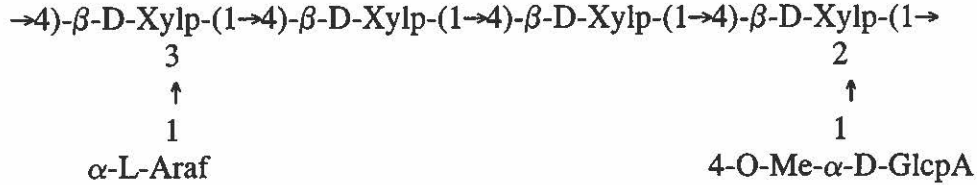
L'arabinogalactan est un autre substrat contenant de l'arabinose. Ce polysaccharide est localisé au niveau de la matrice de la paroi cellulaire. L'arabinogalactan est également un polysaccharide de réserve. L'arabinogalactan est constitué de monomères  $\beta$ -D-galactopyranose liés les uns aux autres par des liens  $\beta$ -1,4 et possédant des groupements latéraux  $\beta$ -D galactopyranose et L-arabinofuranose liés en  $\alpha$ -1,3 (Aspinall, 1972). Plusieurs monosaccharides peuvent former une chaîne latérale d'arabinose liés les uns aux autres par des liens  $\alpha$ -1,5 (voir figure 3).

L'arabinan est un troisième polysaccharide important. Ce substrat est dégradé par la plupart des arabinofuranosidases. L'arabinan est associé aux substances pectiques localisées dans la paroi primaire de la cellule végétale et également dans les espaces intracellulaires. L'arabinan est constitué d'une chaîne polymérique constitué de sous-unités arabinose liés en  $\alpha$ -1,5 et ramifiés avec des sous-unités arabinofuranose liés en  $\alpha$ -1,3 (voir figure 3). Les arabino-oligosaccharides provenant de la dégradation du xylan par des xylanases sont des substrats de l'enzyme. Généralement, les arabino-oligoxylosides de différents degrés de polymérisation constituent les substrats préférés des Abfs.

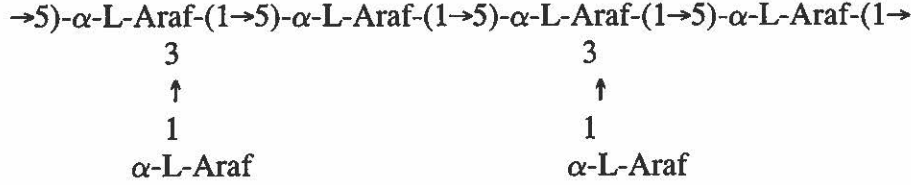
L-arabino-D-xylan de farine de blé:



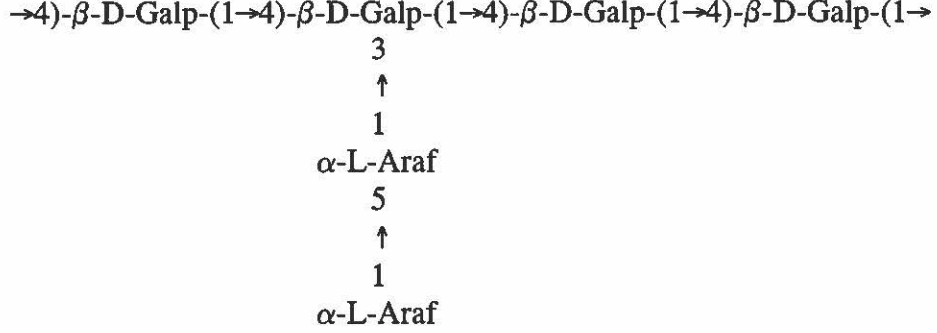
L-arabino-D-glucurono-D-xylan de graminées et des bois mous:



L-arabinan de betterave à sucre:



L-arabino-D-galactan de graines de soya:



**Figure 3 :** Hémicelluloses isolées des tissus végétaux et des graines.

Xylp: xylopyranose Galp: galactopyranose Araf: arabinofuranose  
4-O-Me-α-D-GlcA: acide 4-O-méthylglucuronopyranose

## 7.0 CLASSIFICATION DES $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASES

Les Abfs peuvent être classées selon leur mode d'action et leur substrats préférentiels. Quelques unes des enzymes étudiées effectuent l'hydrolyse de l'arabinan et/ou de l'arabinan de betterave à sucre avec la libération du L-arabinose. Ces enzymes clivent le lien  $\alpha$ -L-1,3-arabinofuranosyl ou  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl à l'extrémité non-réductrice de l'arabinan (Ericksson et al., 1990). L'arabinanase possède également une activité d'hydrolyse de l'arabinan. Cette enzyme est classée comme une endo-arabinanase, c'est-à-dire que l'enzyme clive le lien  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl interne. La plupart des Abfs libèrent de l'arabinose à partir de l'arabinoxylan; cependant, dans la majorité des cas l'hydrolyse est lente mais il y a un synergisme avec les xylanases. Le xylose, le xylobiose et l'arabinose sont les produits de dégradation de l'arabinoxylan (Poutanen, 1988). L'arabinoxyllobiose et l'arabinoxylotriose sont hydrolysés par l'enzyme de *Bacillus subtilis* 3-6 (Kaneko et al., 1994) et également par l'enzyme provenant de *Streptomyces lividans* (Manin et al., 1994). Enfin, une Abf possédant une activité d'hydrolyse sur les monoterpenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoglucosides a été caractérisée (Gunata et al., 1990). Selon Kaji (1984), il existe deux types d'Abfs; 1) une enzyme ayant une affinité envers les arabino-oligosaccharides de faible poids moléculaire, et 2) une enzyme ayant une affinité envers les substrats de haut poids moléculaire et de faible poids moléculaire. Par contre, une enzyme ayant une spécificité de substrat unique envers l'arabinoxylan a été purifiée et caractérisée à partir du surnageant d'*Aspergillus awamori* (Kormelink et al., 1991).

Cette enzyme est capable de libérer l'arabinose comme produit unique d'hydrolyse à partir de l'arabinoxylan.

La classification des arabinofuranosidases selon Kaji (1984) semble concorder avec les observations sur la nature des différentes enzymes. Ainsi, une Abf possédant un haut poids moléculaire et/ou ayant une localisation intracellulaire n'est active qu'envers les petits substrats de faible poids moléculaire qui peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule. Une Abf ayant un faible poids moléculaire et/ou une localisation extracellulaire a une affinité de substrat plus grande vers les substrats de haut poids moléculaire.

La classification des Abfs selon leurs activité enzymatique est complexe, de plus il y a de nombreuses exceptions. Par définition, une enzyme est active envers un substrat, ou catalyse une réaction d'hydrolyse bien spécifique. Utt et collaborateurs (1991) ont démontré l'existence d'une arabinofuranosidase-xylosidase. Cette enzyme possède une double spécificité de substrat envers le 4-méthylumbelliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside et le 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-xyloside. Cette enzyme clive le lien  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl ainsi que le lien  $\beta$ -D-xylopyranosyl. De plus, certaines xylanases ont un comportement atypique, elles libèrent le sucre L-arabinose de l'arabinoxylan avant une attaque endoxylanolytique et la libération d' oligo-xylosides (Grabski et Jeffries, 1991; Matte et Forsberg, 1992).

## 8.0 CLONAGE DU GÈNE

Les gènes codant pour une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ont été clonés chez *Pseudomonas fluorescens* (Kellett et al., 1990), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Utt et al., 1991)

et *Clostridium stercorarium* (Schwarz et al., 1990) en utilisant l'approche hétérologue avec *E. coli*.

L'expression hétérologue des gènes chez un hôte comme *E. coli* présente souvent des problèmes au niveau des modifications et de l'excrétion des protéines. Conséquemment, l'application des méthodes de clonage homologue chez *Streptomyces lividans* développée par le Groupe des streptomycètes de l'Institut Armand Frappier constitue une avenue intéressante pour l'étude de l'expression des gènes.

Par cette méthode, plusieurs gènes codant pour les enzymes du système xylanolytique ont été clonés chez *S. lividans* en utilisant le plasmide multicopie pIJ702 portant le gène de résistance à la thiostreptone et le gène de synthèse de la tyrosinase (voir figure 4). *S. lividans* IAF 10-164, un mutant cellulase- et xylanase-négatif, servait comme hôte. Ce mutant ne possède aucune activité arabinofuranosidase (Manin et al., 1994). Plusieurs gènes ont été clonés avec le système de clonage homologue développé par le Groupe des streptomycètes de l'Institut Armand Frappier: les gènes codant pour trois xylanases (Mondou et al., 1986; Vats Metha et al., 1990; Shareck et al., 1991), deux cellulases (Théberge et al., 1992; Wittmann et al., 1994), et une mannanase (Arcand et al., 1993). Enfin, une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfA) a été purifiée et caractérisée récemment à l'aide de ce système d'expression homologue (Manin et al., 1994). L'expression homologue des gènes des endoglucanases et des hémicellulases chez *Streptomyces lividans* a contribué à une surproduction des enzymes chez le micro-organisme hôte par rapport à la bactérie sauvage.

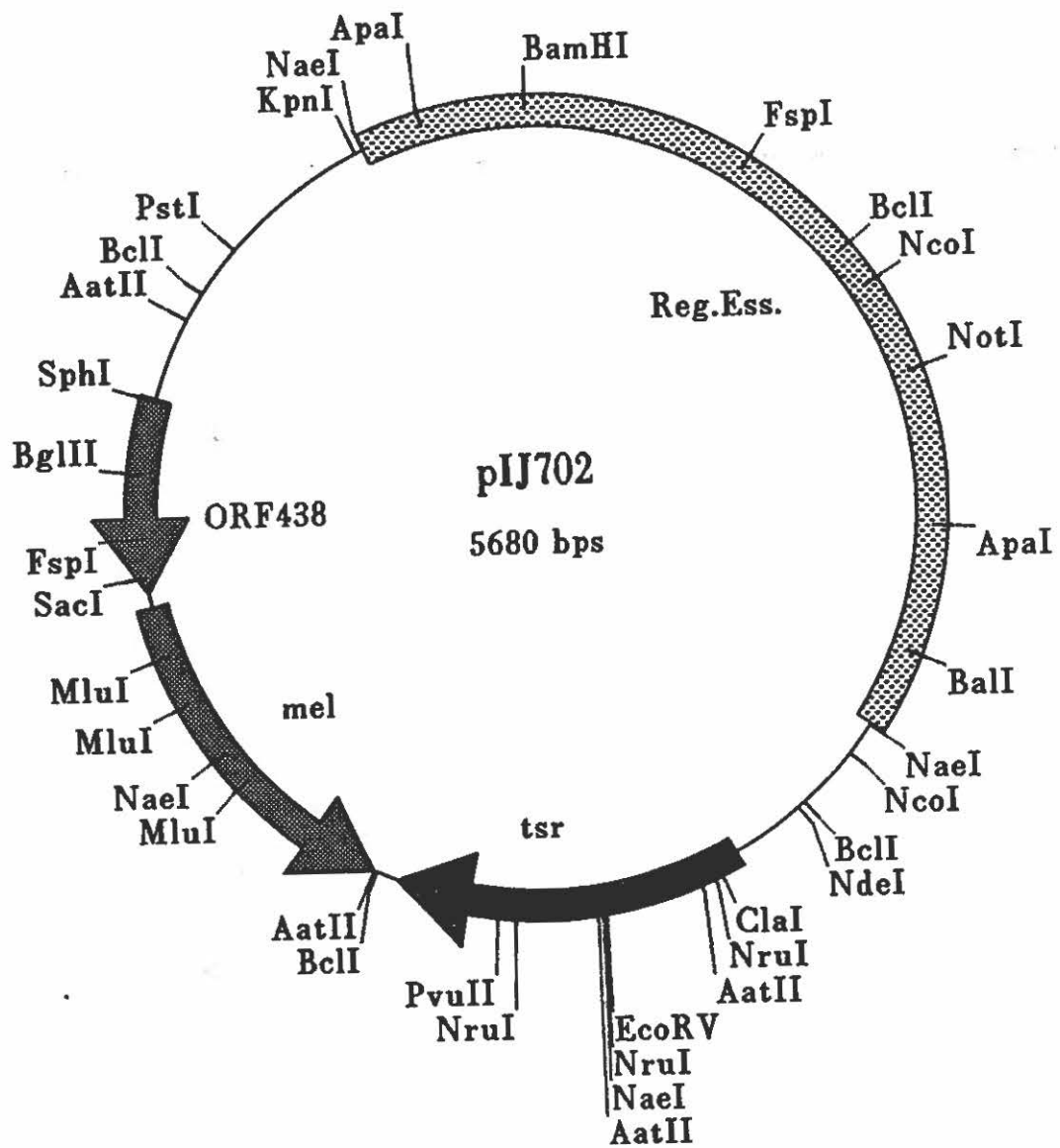


Figure 4: Carte de restriction du plasmide pIJ702.



## 9.0 DÉPISTAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

La purification et la caractérisation d'une enzyme nécessite un test enzymatique fiable, rapide et précis. Il existe des méthodes d'analyse qualitatives ou quantitatives pour suivre l'activité enzymatique. Selon la littérature, la méthode d'analyse utilisant le pNPA est la plus couramment citée. L'hydrolyse du substrat par l'enzyme entraîne la libération d'une molécule chromogène, le p-nitrophénol, produit mesuré par spectrophotométrie permettant la quantification de l'activité enzymatique (voir figure 5).

Une deuxième approche consiste à la détection de l'activité enzymatique sur milieu solide. Le substrat est le 4-méthylumbélliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside. L'hydrolyse provoque la libération de 4-méthylumbélliférone qui est un composé fluorescent. La détection de la fluorescence est très sensible et rapide, mais qualitative (voir figure 5).

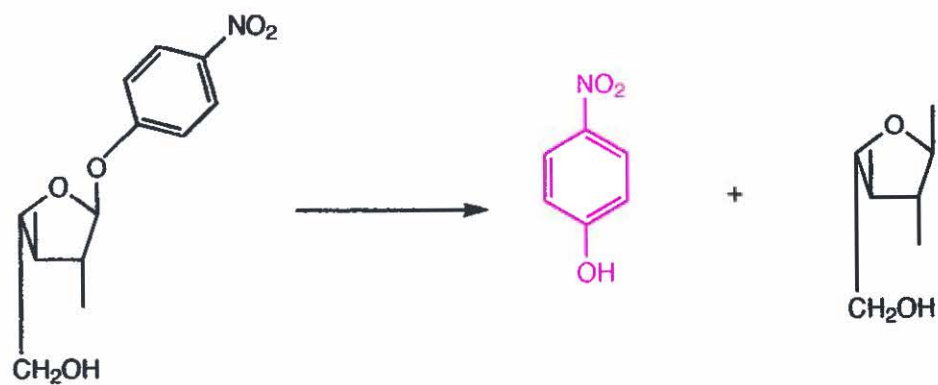
## 10.0 PURIFICATION DE L'ENZYME

L'enzyme  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase peut être purifiée à partir d'un extrait cellulaire ou bien directement à partir du surnageant de culture tout dépendant de la localisation de l'enzyme. La première étape de purification d'une enzyme extracellulaire est l'isolement du surnageant de culture de la masse cellulaire, ensuite l'enzyme est concentrée par précipitation au sulfate d'ammonium ou par ultrafiltration qui représente une méthode efficace de concentration. L'enzyme est purifiée par la combinaison d'une ou plusieurs

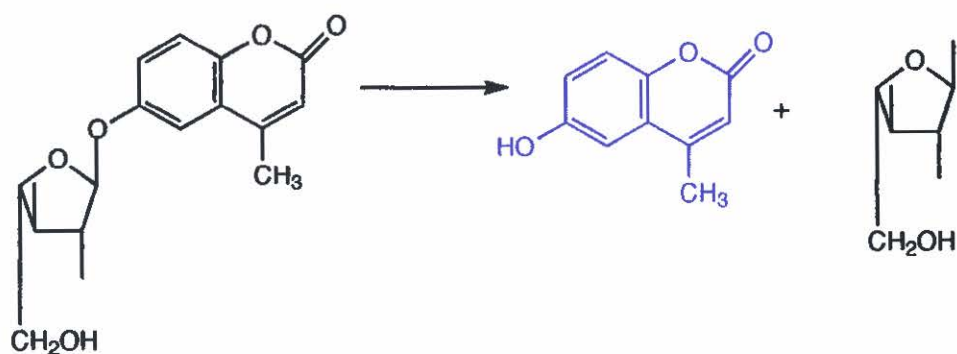
techniques chromatographiques, généralement la chromatographie échangeuse d'ions, la filtration moléculaire ou la chromatographie par interactions hydrophobiques. Le procédé est similaire pour une enzyme intracellulaire, cependant la première étape nécessite le fractionnement de la biomasse cellulaire, soit la destruction des cellules, pour récupérer le matériel cytoplasmique (voir tableau 4). La méthode de purification habituellement utilisée est la chromatographie liquide à haute performance qui est une méthode de séparation chimique efficace basée sur une adsorption sélective entre différents composants d'un mélange sur une matrice solide.

Le premier principe de purification est basé sur les propriétés ioniques de la protéine. La séparation se fait selon la charge de la protéine, dans des conditions spécifiques de pH, sur une colonne échangeuse anionique ou cationique. Le second principe est basé sur le poids moléculaire de différents constituants d'un mélange et la séparation se fait par filtration sur un gel formé de particules ayant des pores de différentes tailles. Le troisième principe est basé sur l'hydrophobicité des protéines et la séparation se fait par la différence entre l'hydrophobicité des composants du mélange envers une matrice organique non-polaire. Généralement, la pureté de l'échantillon est évaluée par électrophorèse SDS sur un gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes et par coloration au nitrate d'argent. Habituellement, la pureté se manifeste également par une augmentation de l'activité spécifique de l'enzyme, permettant la détermination du facteur de purification. Dans la plupart des cas, l'activité spécifique est généralement mesuré à l'aide du substrat synthétique pNPA, et non un substrat naturel tel l'arabinoxylan.

A)



B)



A) p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside

B) 4-méthylumbélliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside

**Figure 5:** Substrats synthétiques hydrolysés par une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

**Tableau 4:** Exemples de purification d'une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

organisme	étape de purification	activité spécifique (U/mg)	facteur de purification	rendement (%)
<i>Ruminococcus albus</i> 8	1)ultrafiltration 2)Sephacryl S300 3)précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4)isoélectrofocalisation	655	840	52,6
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1)ultrafiltration 2)CM-Sepharose 3)Biogel P-150	19,2	128	35
<i>Streptomyces lividans</i> 66	1)cassage des cellules 2)précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3)Phényl-Sepharose 4)DEAE-Sepharose 5)filtration moléculaire	153	153	21
<i>Streptomyces diastaticus</i>	1)Mono Q 2)Mono S 3)isoélectrofocalisation	131 105	37 29	11 1,25
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	1)cassage de cellules 2)précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3)ultrafiltration 4)phényl agarose 5)Mono-Q 6)filtration moléculaire	7093	282	9

## 11.0 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

## 11.1 Caractéristiques biochimiques

**Tableau 5:** Propriétés physico-chimiques des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases.

organisme	localisation (E/I)	M.M. (kDa)	pI	Km (mM)	Vmax (U/mg)
<i>Ruminococcus albus</i> 8	E	310	3,8	1,6	N.D.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	E	94	8,15	4	36,4
<i>Trichoderma reesei</i>	E	53	7,5	1,2	N.D.
<i>Aspergillus niger</i>	E	53	3,6	5	N.D.
<i>Scopolia japonica</i>	E	62	N.D.	6,7	5,26
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	I	230	6,05	0,7	109
<i>Streptomyces diastaticus</i>	E E	38 60	8,8 8,3	10 12,5	105 131
<i>Streptomyces purpurascens</i>	E	495	3,9	0,08	89,3
<i>Streptomyces</i> sp. 17-1	E	92	4,4	3,6	N.D.
<i>Bacteroides xylanolyticus</i> X5-1	I	364	N.D.	0,5	155
<i>Streptomyces lividans</i>	I	380	4,6	0,6	180

E: enzyme extracellulaire I: enzyme intracellulaire

N.D. : non déterminé

### 11.2 Inhibiteurs de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de certaines Abfs est inhibée par certains traitements chimiques. Par exemple, l'Abf de *Ruminococcus albus* 8 est inhibée à 50 % par 0,05 mM de HgCl<sub>2</sub> ou par le p-chloromercuribenzoate. L'enzyme est sensible à un traitement avec un agent sulfhydryl (Greve et al., 1984). L'activité de l'enzyme Abf de la moisissure *Aspergillus niger* est complètement inhibée par 1 mM d'acétate de mercure et l'enzyme est complètement dénaturée par un traitement 6 M urée (Tagawa et Kaji, 1988). L'enzyme purifiée de *Scopolia japonica* est inhibée de 45 et 90 % par une solution de 10 mM de zinc et cuivre, respectivement (Uchida et Tanaka, 1988). Le cuivre, le barium ainsi que le mercure sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique chez l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase des fèves de soya (Hatanaka et al., 1991). Le L-arabinose est libéré lors de la réaction d'hydrolyse catalysée par l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase et inhibe l'activité enzymatique. *Penicillium capsulatum* possède deux Abfs différentes, Ara II est inhibée par l'arabinose (K<sub>i</sub> 16,4 mM) alors que Ara I n'est pas affectée par la présence de ce sucre (Filho et al., 1995).

### 11.3 Activateurs

Les ions Fe<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup> sont des ions activateurs de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de la levure *Rhodotorula flava* (Uesaka et al., 1978) tandis que Ca<sup>++</sup> et Zn<sup>++</sup> activent l'enzyme des cotylédons des fèves de soya (Hatanaka et al., 1991).

## 12.0 APPLICATIONS

La dégradation complète des hémicelluloses (soit les polymères et les oligomères) en sucres monomères est une réaction catalysée par le synergisme entre plusieurs enzymes. L'Abf est une enzyme accessoire qui pourrait être utilisée avec un mélange enzymatique pour faciliter la dégradation du contenu hémicellulosique d'une variété de substances naturelles (Ward et Moo-Young, 1989). Le traitement des pâtes de papier à l'aide des enzymes xylanolytiques est une application intéressante. La dégradation des hémicelluloses facilite l'enlèvement de la lignine des pâtes de papier et aide au blanchiment du papier, contribuant à l'élimination du chlore. Cependant, l'hydrolyse des matériaux hémicellulosiques et la dégradation complète du xylan nécessite la collaboration entre plusieurs enzymes dont l'arabinofuranosidase qui catalyse une étape importante (Biely, 1985). Le contenu en arabinose des hémicelluloses des céréales, tel l'orge, le seigle ou l'avoine est élevé. L'utilisation de l'Abf trouve un intérêt dans le traitement de ces céréales pour enlever les résidus arabinose. Un tel traitement pourrait augmenter l'accessibilité des fibres diététiques lors de la digestion et une augmentation de la valeur nutritive de la moulée (Dekker et Richards, 1979). Finalement, cette enzyme pourrait trouver une application dans la production de certains arômes naturels, par exemple les terpénoïdes retrouvés dans le vin, lors de la production de boissons alcoolisées (Gunata et al., 1990). Il y a un certain intérêt pour l'application des enzymes hémicellulosiques, par exemple la clarification des jus de fruits, le traitement des farines de céréales, le traitement des fibres végétales textiles pour l'industrie en général (Ericksson et al., 1990).

### 13.0 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Sous-clonage du gène *abfB* dans le système d'expression homologue de *Streptomyces lividans*
- Purifier l'  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B
- Produire des anticorps à partir de l'enzyme purifiée
- Déterminer la masse moléculaire et le point isoélectrique de l'enzyme
- Déterminer la thermostabilité de l'enzyme
- Analyser la spécificité de l'enzyme envers les polysaccharides; l'arabinoxylan, l'arabinogalactan et l'arabinan
- Analyser la spécificité de l'enzyme envers les arabino-oligosaccharides de divers degrés de polymérisation
- Evaluer le synergisme de l'enzyme avec les xylanases



## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.0 LISTE DES PRODUITS

Acétate de sodium (J.T. Baker)  
Acétate de potassium (Fisher)  
Acide citrique (BDH)  
Acide éthylènediaminetétraacétique (BDH)  
Acide p-hydroxybenzoïque hydrazine (ICN)  
Acide phosphorique (J.T. Baker)  
Acide phthalique (BDH)  
Acide trichloroacétique (BDH)  
Acrylamide (Bio-Rad)  
Adénosine triphosphate (Pharmacia LKB)  
Adjuvant RiBi (Cedar Lane)  
Agar (Difco)  
Agarose (Bio-Rad)  
Albumine de sérum de bovin (Sigma)  
Arabinose (Sigma)  
Bacto casamino acids (Difco)  
Bactotryptone (Difco)  
Bicarbonate de sodium (J.T. Baker)  
 $\beta$ -mercaptoéthanol (BDH)  
Bleu Brillant de Rémozol (Sigma)  
Bleu de bromophénol (BDH)  
Bleu de Coomassie R 250 (Bio-Rad)  
Bouillon de tryptone de soya (Difco)  
Bromure d'éthidium (Bio-Rad)  
Carbonate de sodium (BDH)  
Chlorure d'ammonium (J.T. Baker)  
Chlorure de calcium (BDH)  
Chlorure de cuivre (Fisher)  
Chlorure de fer (Fisher)  
Chlorure de potassium (J.T. Baker)  
Chlorure de magnésium (J.T. Baker)  
Chlorure de manganèse (J.T. Baker)  
Chlorure de sodium (Anachemia)  
Citrate de sodium (Anachemia)  
Diméthylformamide (BDH)  
Diméthylsulfoxyde (BDH)

Enzymes de restriction (Pharmacia LKB)  
Enzyme *Pfu* (Stratagene)  
Ethanol  
Extrait de boeuf (Difco)  
Extrait de levures (Difco)  
Glucose (Fisher)  
Glutaraldéhyde (BDH)  
Glycérol (Fisher)  
Hydroxyde de potassium (J.T. Baker)  
Hydroxyde de sodium (J.T. Baker)  
Isopropanol (BDH)  
Maltose (Sigma)  
Méthanol  
Méthylumbélliférone (Sigma)  
N,N'-méthylène bis-acrylamide (Bio-Rad)  
Nucléotides (Pharmacia LKB)  
NZamine A (Sheffield Products)  
p-nitrophénol (Sigma)  
Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)  
Phosphate de potassium monobasique (Fisher)  
Phosphate de potassium dibasique (Fisher)  
Phénol (BDH)  
Polyéthylène glycol (Sigma)  
Propionamide (Aldrich Chemicals)  
Protéine A marqué à <sup>125</sup>I (ICN)  
Réactif de Folin (BDH)  
Réactif de Bradford (Bio-Rad)  
Sodium de borate (Sigma)  
Sodium de phosphate dibasique (Fisher)  
Sodium de phosphate monobasique (Fisher)  
Sucrose (BDH)  
Sulfate d'ammonium (J.T. Baker)  
Sulfate d'ammonium (BDH)  
Sulfate de cuivre (J. T. Baker)  
Sulfate de fer (J.T. Baker)  
Sulfate de magnésium (BDH)  
Sulfate de potassium (Anachemia)  
Sulfate dodécyl de sodium (Bio-Rad)  
Tampon One Phor All 10x (Pharmacia LKB)  
Tampon *Pfu* (Stratagene)  
Tartrate de potassium monobasique (BDH)  
Temed (Bio-Rad)

Thiostreptone (Squibb Canada)  
Triton X-100 (Bio-Rad)  
Trousse de détection de glycoprotéines (Boehringer Mannheim)  
Trousse de coloration à l'argent (Pharmacia LKB)  
Tween 80 (Aldrich)  
Xylose (Sigma)

## 2.0 LISTE DES SUBSTRATS

Arabinan de betterave à sucre (Megazyme)  
Arabinan débranché (Megazyme)  
Arabinan  $\alpha$ -L-1,5 linéaire (Megazyme)  
Arabinogalactan (Sigma)  
Arabino-oligoxylosides (purifiés par Catherine Manin)  
Arabinoxylan de blé (Megazyme)  
Arabinoxylan de seigle (Megazyme)  
Oligoxylosides (purifiés par Martin Roberge)  
4-méthylumbelliféryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (Sigma)  
p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (Sigma)  
Xylan de bouleau (Sigma)  
Xylan de mélèze (ICN)  
Xylan d'épeautres d'avoine (Sigma)

### 3.0 MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET VECTEURS UTILISÉS

#### 3.1 Souches bactériennes

La souche sauvage *Streptomyces lividans* 1326 provient du Dr Hopwood (Institut John Innes, Norwich, Grande Bretagne). La souche *Streptomyces lividans* IAF 10-164 est un mutant xylanase- et cellulase-négatif. Cette souche a été obtenue par mutagenèse aléatoire avec la N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (Mondou et al., 1986) et a été récemment caractérisée par Hurtubise et al. (1995).

#### 3.2 Vecteur plasmidique

Le vecteur plasmide pIJ702 est un vecteur multicopie contenant comme marqueur de sélection le gène de résistance à l'antibiotique thiostreptone, et le gène de synthèse de la mélanine pour la détection phénotypique. Ce vecteur a été construit par Katz et al. (1983), il contient un site BglII unique servant à l'insertion d'un fragment d'ADN. L'insertion d'un ADN au site BglII provoque l'interruption du gène tyrosinase et cause l'abolition de la synthèse de la mélanine, un pigment noir.

## 4.0 MILIEUX DE CULTURE

### 4.1 Milieu pour la conservation des souches

Les souches de *S. lividans* sont conservées sur un milieu Bennett. Ce milieu riche favorise la croissance bactérienne. Ce milieu est composé de 1 g d'extrait de levures, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g de NZamine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre d'eau distillée. Un ml d'une solution de thiostreptone (50 mg/ml) est ajouté, après stérilisation au milieu de culture. L'antibiotique exerce une pression sélective envers les clones possédant le plasmide pIJ702. Les plats de Pétri sont incubés pendant 5 à 7 jours à 34 °C jusqu'à l'obtention d'un tapis de spores. La durée de conservation des clones est de 6 mois à 4 °C. La conservation des souches à long terme nécessite la lyophilisation. Pour ce faire, des spores provenant d'un milieu Bennett-thiostreptone sont resuspendues dans du lait écrémé 10 % (p/v) stérile. Les spores sont lyophilisées dans des ampoules de verre qui sont ensuite scellées à la flamme sous vide.

### 4.2 Milieu de détection de l'activité enzymatique

La détection et la sélection des transformants est réalisée à l'aide de deux milieux de détection; A) le milieu minimal Stewart-RBB xylan, et B) le milieu minimal Stewart-4MUA. Le milieu RBB-xylan est un milieu utilisé pour le criblage d'une activité

xylanolytique (Biely et al., 1985) et le milieu Stewart-4MUA a été utilisé pour le criblage d'une activité arabinofuranosidasique. Le milieu minimal Stewart contient les ingrédients suivants; 2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g de  $\text{KCl}$ , 17 g d'agar et 1 ml d'une solution de sels minéraux de Mandels. La solution de Mandels contient 140 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 160 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 500 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 200 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  par 100 ml d'eau distillée (Mandels et Reese, 1957). Le pH est vérifié avant la stérilisation, la mesure doit être 7,2. Après stérilisation du milieu, 10 ml d'une solution stérile de  $\text{MgSO}_4$  (5%) est ajouté ainsi qu'un ml de thiostreptone à 50 mg/ml. La thiostreptone est gracieusement fourni par Bristol Myers Squibb.

En A) le milieu minimal Stewart est complété avec le xylan d'épeautres d'avoine associé au colorant Rémazol Bleu Brillant (RBB) à 0,1 % (p/v) préparé selon la méthode de Biely et al. (1985). La biodégradation du xylan provoque le développement d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie. En B) le xylan d'épeautres d'avoine est additionné à 0,1 % (p/v) au milieu gélosé et le substrat synthétique 4-méthylumbélliféryl-alpha-L-arabinofuranoside (1 mM) est additionné après stérilisation du milieu gélosé. La libération de 4-méthylumbélliférone lors de la dégradation de la molécule synthétique provoque l'émission d'une fluorescence bleu visible par éclairage sous une lumière ultraviolette.

#### 4.3 Milieu pour la production de l'inoculum

Le milieu Trypticase Soya Broth est un milieu riche et complexe favorisant la croissance bactérienne. Ce milieu est utilisé selon le protocole du fabricant en dissolvant 27,5 g de poudre dans 1 L d'eau distillée. L'antibiotique thioestreptone est ajouté à une concentration finale de 5 ug/ml après stérilisation.

#### 4.4 Milieu pour la production de l'enzyme

Le milieu M<sub>14</sub> a été utilisé pour la production d'enzyme. Le milieu est composé des éléments suivants; 1,4 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 ml de Tween 80. 1 ml d'une solution de sels minéraux de Mandels est ajouté par litre d'eau distillée (voir la section 4.2). Le pH du milieu est ajusté à 7,4 et stérilisé à l'autoclave à 121 °C pour 20 min. 0,6 ml d'une solution stérile de MgSO<sub>4</sub> (5%) et 1 ml d'une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> (3%) sont ajoutés à 100 ml de milieu après stérilisation afin de minimiser la précipitation des phosphates. La thioestreptone est également ajoutée pour une concentration finale de 5 ug/ml après stérilisation. Le substrat xylose (25%) est ajouté pour une concentration finale de 1%. Le milieu estensemencé avec un inoculum provenant d'une pré-culture en TSB. Le même milieu est utilisé pour l'isolement de plasmides. Dans ce cas, le milieu liquide estensemencée avec une loupée de spores provenant d'un Pétri Bennett-thioestreptone.

## 5.0 SOUS-CLONAGE ET ANALYSE PLASMIDIQUE

### 5.1 Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification *in vitro* permet d'amplifier une séquence nucléotidique d'ADN à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques placées aux extrémités du segment d'ADN. Les amorces vont s'hybrider de façon homologue aux sections complémentaires de la séquence d'ADN à amplifier. Un cycle de PCR comprend trois étapes; une dénaturation de l'ADN double brin à 94 °C, l'hybridation des oligonucléotides à 55 °C, et la polymérisation d'un nouveau brin d'ADN à partir de l'ADN complémentaire à l'aide de la polymérase *Pfu* à 72 °C. Ce cycle est répété trente fois.

La réaction de PCR est effectuée dans un tube Eppendorf stérile contenant 70 µl d'eau, 1 µl de l'ADN matrice, 0,5 µl de chacun des oligonucléotides (50 pM), 10 µl du tampon de la polymérase *Pfu*(10 x), 2 µl de chacun des nucléotides A,T,C et G (2 mM), 1 µl de Tween 20, et 8 µl de proprionamide 50 % et 1 µl de l'enzyme (polymérase *Pfu*). L'amplification de l'ADN est effectuée à l'aide d'un appareil automatisé (Pharmacia LKB, Gene ATAQ Controller). Un cycle de PCR comprend les étapes suivantes; 95 °C pour 5 min, 55°C pour 5 min, 72 °C pour 3 min, 94 °C pour 1 min, 55 °C pour 1 min, 72 °C pour 3 min et 72 °C pour 7 min.



## 5.2 Ligation

Le produit de PCR est sous-cloné dans le plasmide multicopie pIJ702 au site BglII. Le plasmide et le produit de PCR sont digérés avec des endonucléases spécifiques selon Sambrook et al. (1989) dans un volume de 20 ul. Après digestion, les enzymes de restriction sont désactivées par un traitement de dénaturation thermique à 70 °C pour 10 min. L'ATP (10 mM) ainsi que la T4 DNA ligase sont ajoutés au tube. Le mélange est incubé 6 h à la température de la pièce.

## 5.3 Transformation

Les plasmides recombinants sont sous-clonés dans des protoplastes de *S. lividans* (mutant IAF 10-164) selon la méthode de Hopwood et al. (1988) modifié par Kluepfel et al. (communication personnelle). L'ADN plasmidique et les protoplastes sont mélangés et le polyéthylène glycol est ajouté à la solution de protoplastes. La suspension est étalée sur Pétri R<sub>5</sub> et sont incubés à 34 °C durant 16 h. L'antibiotique thiostreptone est ajouté à une concentration de 50 ug/ml. L'antibiotique est étalé sur la surface du Pétri uniformément à l'aide d'un manche de Koch stérile. Les Pétris sont incubés pour une période additionnelle de 72 h.

#### 5.4 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée par la lyse alcaline selon la méthode de Kieser et al. (1984) avec certaines modifications. Un culot de mycélium provenant d'une culture de 25 ml en milieu M<sub>14</sub> xylose 1 % est resuspendu dans un volume final de 500 ul avec le tampon de lyse (2 mg/ml lysozyme, 10,3 % sucrose, 25 mM Tris-Cl et 25 mM EDTA, pH 8,0). Le mélange est incubé à 37 °C pour 30 min. Un volume de 250 ul de solution 2 (0,3 M NaOH, 2% SDS) est ajouté au mélange qui est ensuite incubé à 70 °C pour 15 min. Le régulateur de température du bain-marie est éteint, lorsque la température atteint 35 °C, soit après 40 min, 80 ul d'une solution phénol-chloroforme est ajouté. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par l'addition de 70 ul de sodium acétate 3 M et 1 volume d'isopropanol. Le mélange est incubé 5 min à la température de la pièce. L'ADN est récupéré par centrifugation à 13 000 x g pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans 50 ul de TE 1x (1 mM Tris-Cl , 1 mM EDTA, pH 8,0) et une seconde extraction est réalisée avec 25 ul de phénol neutre. La phase aqueuse est précipitée une deuxième fois avec un volume d'isopropanol, et le culot est finalement resuspendu dans 50 ul d'eau distillée stérile.

### 5.5 Digestion de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique isolé est analysé par une digestion simple avec des endonucléases de restriction (Pharmacia LKB) selon les recommandations du manufacturier. Une unité d'enzyme de restriction est utilisée par microgramme d'ADN dans un tampon One Phor All 10 x (Pharmacia LKB) pour une concentration finale de 1 x. Le volume réactionnel est de 20 ul. Le mélange est incubé pendant 1 à 2 h à 37 °C.

### 5.6 Analyse de l'ADN plasmidique

L'analyse de l'ADN plasmidique est effectuée par une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % dans un tampon TBE 1 x (89 mM Tris HCl, 89 mM acide borique, 20 mM EDTA, pH 8,0) et contenant du bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN sont séparés en appliquant un voltage constant. La migration est réalisée à l'aide d'un appareil à électrophorèse DNA SubCell (Bio-Rad). Un standard d'ADN de taille connue entre 400 et 12 000 paires de base (1 Kb Ladder, Bethesda Research Laboratories) permet d'estimer la taille des fragments.

## 6.0 FERMENTATION BATCH

L'enzyme est produite par fermentation pour une période de temps spécifique. Une suspension de spores provenant de plats de Pétri Bennett-thiostreptone est homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur et sert d'inoculum à un milieu TSB 25 ml. La culture est incubée à 34 °C, à 240 rpm sur un agitateur rotatif. Après un temps d'incubation de 24 h, le mycélium est récolté par centrifugation. La stérilité de la culture est vérifiée au microscope optique. Le mycélium provenant de cette pré-culture sert d'inoculum à une deuxième pré-culture en TSB dans un volume de 100 ml. Un inoculum de 8 % (v/v) est utilisé pour la seconde pré-culture et la culture. Après une incubation de 24 h, le mycélium est récolté. Le mycélium estensemencé dans un milieu M<sub>14</sub> xylose 1%. La culture est incubée à 34 °C pour 72 h.

## 7.0 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

### 7.1 Analyse qualitative de l'activité enzymatique

L'évaluation de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase est réalisée sur milieu solide Stewart-RBB xylan ou Stewart-xylan-4MUA (voir section 4.2). Des puits d'un diamètre de 5 mm sont percés dans la gélose à l'aide d'un poinçon, et un volume de 20 à 50  $\mu$ l de l'échantillon est déposé dans le puit. Les Pétris sont mis à incubation à 37

°C dans un sac de plastique pour une période s'échelonnant entre 1 h et 24 h. L'apparition d'une zone d'éclaircissement est évaluée sous la lumière naturelle. La fluorescence est analysée par illumination des Pétris sous lumière ultra-violette. Un halo de fluorescence indique une activité enzymatique arabinofuranosidasique.

### 7.2 Analyse des sucres par chromatographie

L'arabinose libéré lors de l'hydrolyse du substrat (xylan d'épeautres d'avoine, xylan de bouleau, arabinoxylan de blé ou de seigle, arabinan), par l'action de l'enzyme est analysé par chromatographie analytique sur une colonne Aminex HPX 42A (Bio Rad). La résine à l'intérieur de la colonne est composée d'une matrice de polystyrène divinylbenzène contenant des groupements d'acide sulfonique chargés avec un ion antagoniste cationique déterminé. Les sucres sont séparés selon leurs tailles et leurs charges ioniques. L'éluant utilisé est l'eau Milli Q (Millipore) chauffé à 80 °C. Le débit d'élution est de 0,5 ml/min. Les sucres sont détectés par un réfractomètre différentiel à la sortie de la colonne.

### 7.3 Analyse quantitative de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est déterminée avec la méthode des sucres réducteurs de Lever (1972) modifiée par Dr Claude Dupont (communication personnelle) avec l'acide p-aminohydroxybenzoïque hydrazine (PAHBAH). La réaction enzymatique est réalisée dans un volume de 1,0 ml contenant 900 µl de substrat xylan d'épeautres d'avoine soluble

1 % (p/v) et 100 ul de l'enzyme convenablement diluée dans le tampon phosphate 50 mM pH 6,0. Le xylan d'épeautres d'avoine soluble est isolé de la fraction complète du xylan de la façon suivante; 35 g de xylan est bouilli dans un volume de 2 L d'eau distillée pour 2 h. La fraction soluble est récupérée par centrifugation à  $13\,325 \times g$  pour 35 min. La fraction soluble est lyophilisée. Le temps réactionnel est de 10 min à 55 °C avec agitation dans un bain-marie. La réaction est arrêtée par l'addition de 100 ul du mélange réactionnel à 300 ul de PAHBAH sur glace. L'échantillon est incubé à 95 °C pour 5 min dans des tubes Titertek. Un témoin de réaction contenant le substrat seul est ajouté comme contrôle. Le sucre arabinose est utilisé comme standard. La densité optique de la coloration est mesuré à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique à lecture de microplaques (Bio Tek Instruments).

#### 7.4 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951) avec l'albumine sérique de bovin comme standard ou selon la méthode de Bradford avec le réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) avec la gamma globuline comme standard.

#### 7.5 Définitions des unités

Une unité internationale (U.I.) correspond à la libération d'une umole d'arabinose par minute par ml de solution. L'activité spécifique est défini par le nombre d'unités (U.I.) par mg de protéines.

## 8.0 PURIFICATION DE L'ENZYME

Le surnageant de culture est récolté suite à une centrifugation de la culture à 11 325 x g . Le surnageant est filtré sur laine de verre pour retenir les débris cellulaires. Le filtrat est concentré par ultrafiltration sur membrane avec le système Pellicon (Waters Millipore). Le diamètre des pores de la membrane filtrante utilisé est de 10 000 Da.

Les protéines du rétentat sont précipitées jusqu'à une saturation de 50 % (p/v) par addition lente et continue de cristaux de sulfate d'ammonium sur glace. La solution est laissée au repos durant la nuit à 4 °C. Les protéines sont récupérées par centrifugation à 17 888 x g. Un culot provenant de la précipitation est resuspendu dans le tampon malonate 20 mM pH 6,0. La solution est dialysée à deux reprises contre 2 L d'eau distillée et à une reprise contre 2 L de tampon malonate 5 mM. L'échantillon est ensuite chargé sur une colonne Econo (Bio-Rad) de 2,5 cm de diamètre et 20 cm de hauteur contenant une résine échangeuse cationique CM Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée avec le même tampon à un débit constant de 2 ml/min contenant 1 M NaCl. La colonne est ensuite lavée au moins une heure avec le tampon malonate afin d'éliminer toute trace de contaminants. La conductivité est mesurée avant adsorption de l'échantillon, celle-ci doit être inférieure ou égale à celle du tampon. L'enzyme est adsorbée sur la colonne à un débit constant de 2 ml/min. L'enzyme est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl échelonné sur 60 min. Les fractions sont analysées par un détecteur d'absorbance U.V. réglé à 280 nm et récoltées à raison de 8 ml par fraction. L'activité

enzymatique est évaluée par un test qualitatif sur milieu de détection Stewart 4-MUA. Les fractions actives sont combinées et dialysées contre de l'eau Milli Q et concentré avec le procédé d'ultrafiltration sur cellule OmegaCell (Filtron) sur une membrane de 10 kDa.

La pureté de l'échantillon est évaluée par une courbe de titration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide contenant des ampholites (PhastGel IEF 3-9, Pharmacia). Cette technique de séparation est bidimensionnelle. La première migration crée un gradient de pH avec les ampholites. Le gel est déplacé dans le sens des aiguilles d'une montre de 90 degrés et l'échantillon est appliqué perpendiculairement au gradient de pH au milieu du gel. Les protéines deviennent négativement ou positivement chargées dépendant du pH et migrent du centre du gel vers la cathode ou l'anode. Le taux de migration dépend de la magnitude des charges de la protéine. 4 ul de l'échantillon sont appliqués sur gel à l'aide d'un applicateur TC (Phast System). Suite à la migration électrophorétique, le gel est coloré au nitrate d'argent dans l'unité de développement à l'aide de la méthode de développement sensible (Development technique file No. 210, sensitive silver staining, Pharmacia Biotech). L'enzyme pure est congelée sur glace sèche et lyophilisée.

## 9.0 CARACTÉRISATION DE L'ENZYME

### 9.1 Masse moléculaire

La masse moléculaire est déterminée par SDS PAGE selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant un appareil Phast System et suivi d'une coloration au nitrate d'argent.



La masse moléculaire est déterminée à partir d'un standard de masse moléculaire connu. Le standard de masse moléculaire comprend les protéines suivantes; lysozyme (14 400 Da) inhibiteur de trypsine de soya (21 500 Da) anhydrase carbonique (31 000 Da) ovalbumine (47 700 Da) albumine de sérum de bovin (66 200 Da) et phosphorylase B (97 400 Da). 10 ul d'un échantillon est mélangé à 5 ul de tampon d'échantillon 3x (10 mM Tris-Cl, 2,5% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,01% bleu de bromophénol). Le mélange est bouilli 10 min. Un volume de 4 ul d'échantillon est appliqué sur le gel. Le temps de migration électrophorétique est de 70 Vh. Après la migration, le gel est coloré au nitrate d'argent à l'aide de l'unité de développement selon le manuel d'instruction.

La méthode conventionnelle est utilisée pour l'évaluation d'une plus grande quantité de protéines. Une quantité connue d'échantillon est mélangée dans un rapport 1:4 avec le tampon d'échantillon 5x (10 mM Tris-Cl, 2 % SDS, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20 % glycérol et 0,05 % bleu de bromophénol). Le mélange est bouilli pendant 10 min et est déposé dans un puit d'un gel de polyacrylamide 12,5 %. La migration est de 16 h à 50 V. Le gel est coloré 1 h dans la solution de coloration (Bleu de Coomassie R250) et est décoloré dans une solution de décoloration (30 % méthanol, 10 % acide acétique).

## 9.2 Point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique de la protéine est réalisée par focalisation isoélectrique sur un gel de polyacrylamide contenant des ampholites formant un gradient de pH. La méthode automatisée Phast System est utilisée avec un gel PhastGel IEF 3-9.

Un volume de 4  $\mu$ l de l'échantillon est appliqué sur gel. Le pI de la protéine est évaluée par rapport à un standard de pI. Le standard de point isoélectrique comprend les protéines suivantes; amyloglucosidase (pI 3,5) inhibiteur de trypsine de soya (pI 4,55)  $\beta$ -lactoglobuline A (pI 5,2) anhydrase B carbonique de bovin (pI 5,85) anhydrase B carbonique humaine (pI 6,55) bande acide de myoglobine (pI 6,85) bande basique de myoglobine (pI 7,35) bande acide de lectine de lentille (pI 8,15) bande moyenne de lectine de lentille (pI 8,45) bande basique de lectine de lentille (pI 8,65) et trypsinogène (pI 9,3). Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent à l'aide de l'unité de développement.

### 9.3 pH, température et temps d'incubation optimaux

La détermination des paramètres de l'activité enzymatique a été effectuée par la méthode des sucres réducteurs avec le PAHBAH (voir section 7.3). Le sucre arabinose a été utilisé comme standard. Le taux de libération des sucres réducteurs est déterminé par l'intensité de la coloration par une lecture au spectrophotomètre à une densité optique de 405 nm.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de l'arabinofuranosidase B est déterminé en utilisant trois tampons (tampon phosphate, tampon sodium phosphate et sodium citrate 50 mM) couvrant l'échelle de pH entre 4,0 et 7,0. Une courbe de l'activité enzymatique en fonction du pH permet d'évaluer le pH optimal à l'activité de l'enzyme.

L'effet de la température sur l'activité enzymatique est mesurée dans la gamme de 45 à 70 °C, à la valeur de pH optimal. Une courbe d'activité enzymatique en fonction de la température permet d'évaluer la température optimale de l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique est mesurée en fonction du temps d'incubation sur une période totale de 40 minutes dans les conditions optimales de pH et température. Une courbe de l'activité enzymatique en fonction du temps d'incubation permet de déterminer la linéarité de la réaction sur une période de temps donnée. Le temps d'incubation valable de l'enzyme est situé dans la région linéaire de la courbe d'activité.

#### 9.4 Cinétique enzymatique

Le  $K_m$  est défini comme étant la concentration de substrat à laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié de sa vitesse maximale. Le  $V_{max}$  correspond à la vitesse maximale de réaction lorsque l'enzyme est saturée en substrat. Le  $K_m$  représente l'affinité de l'enzyme pour un substrat. La cinétique de l'enzyme est évaluée dans des conditions de pH, température et temps d'incubation optimaux. Le xylan d'épeautres d'avoine et l'arabinoxylan de blé contiennent le sucre L-arabinose. La cinétique enzymatique a été réalisée à des concentrations du substrat xylan d'épeautres d'avoine variant de 0,5 à 20 mg/ml et 0,1 à 15 mg/ml pour le substrat arabinoxylan de blé. Une courbe de Michaelis-Menten est tracée. La courbe permet la visualisation du plafonnement de la vitesse de réaction enzymatique lorsque la concentration de substrat est très grande. La représentation en double inverse, c'est-à-dire la courbe de Lineweaver-Burke, permet de déterminer les

valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  pour l'enzyme. La pente de la droite correspond à  $K_m/V_{max}$ . A l'interception de l'ordonnée, l'inverse de l'activité enzymatique équivaut à l'inverse de  $V_{max}$ , et à l'interception de l'abscisse, l'inverse de la concentration de substrat est égale à la valeur négative de  $K_m$ .

### 9.5 Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'AbfB est évaluée à diverses températures dans l'intervalle de 30 à 70 °C. L'activité enzymatique est déterminée par le test des sucres réducteurs avec le PAHBAH (voir section 7.3). L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions optimales définies, soit 10 min d'incubation à 55 °C, dans le tampon phosphate pH 6,0. L'enzyme était préincubée à différentes températures, en absence du substrat, pour une période de temps croissante, allant de 10 min à 48 h. Un échantillon d'enzyme de 100  $\mu$ l est prélevé et utilisé pour un test d'activité enzymatique. L'activité enzymatique est évaluée en fonction du temps d'incubation pour différentes températures.

## 10.0 PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX

### 10.1 Immunisation

Les anticorps polyclonaux dirigés contre l'arabinofuranosidase B sont produits chez deux lapines de race New Zealand âgées de 4 mois (3-5 kg). L'adjuvant utilisé est l'émulsion MPL+TDM+CWS RiBi (ImmunoChem Research, Cedar Lane). L'adjuvant

est chauffé pendant 15 min, à 45 °C et est reconstitué avec 2 ml de PBS contenant une quantité connue de la protéine pure. A la première immunisation, 900 ug de l'antigène sont injecté à chacune des lapines selon divers sites d'injections selon le protocole du manufacturier. Trois semaines plus tard, une deuxième immunisation est effectuée avec 900 ug de l'antigène. Après six semaines, le sang est récupéré par ponction cardiaque. Le sérum est récupéré par centrifugation.

### 10.2 Transfert des protéines sur nitrocellulose

Suite à une électrophorèse SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec l'appareil Trans blot SD Semi Dry Transfert cell (Bio-Rad) selon la méthode de Towbin et al. (1979). Le transfert est réalisé en appliquant un voltage de 20 V pendant 45 min pour un gros gel de polyacrylamide.

### 10.3 Immunodétection

La membrane est séchée sous vide durant 1 h. Par la suite, la membrane est immergée pendant 30 min dans un tampon PBS contenant 3 % de lait écrémé. Les anticorps sont ajoutés à la solution et la membrane est incubée durant 2 h à la température de la pièce. La membrane est lavée avec une solution PBS Triton X-100 0,5 % à trois reprises, pour 10 min, et ensuite avec du PBS pour un autre 10 min. La membrane est saturée avec du PBS lait écrémé 3 %. La protéine A marquée à l'iode radioactif I<sup>125</sup> est ajoutée à raison de 3 ul pour 30 ml de PBS. La membrane est incubée 2 h à la température

de la pièce, la protéine A marquée se fixe à l'anticorps. Par la suite, la membrane est lavée dans les mêmes conditions que mentionnées ci-haut pour éliminer la fixation non-spécifique.

#### 10.4 Autoradiographie

La membrane est séchée, enveloppée dans une pellicule Saran, puis fixée sur une feuille de carton. La membrane est exposée sur un film Kodak X-Omar AR à -70 °C pour une période de 24 h ou plus, selon la sensibilité de la réaction. Le film est développée dans une chambre noire avec une solution de développement, et une solution de fixation.

### 11.0 SYNERGISME ENZYMATIQUE

L'arabinoxylan de blé et de seigle possèdent un rapport arabinose/xylose élevé. Ces substrats ont servi à l'étude du synergisme enzymatique. La réaction d'hydrolyse est effectuée dans un tube Eppendorf stérile contenant 90 ul de substrat à 10 mg/ml, dans lequel 10 ul de dilutions adéquates d'enzyme sont ajoutés. L'hydrolyse est réalisée à 55 °C dans un bain chauffant pour une période d'environ 16 h. La réaction est arrêtée par dénaturation thermique. En parallèle, un échantillon contenant un hydrolysate avec la xylanase A ou C seulement incubé dans les mêmes conditions constitue un contrôle de réaction enzymatique. Un contrôle substrat est inclus. La différence dans les patrons d'hydrolyse entre l'échantillon contenant le mélange d'enzyme et le contrôle échantillon

représente la quantité de sucres libérés par l'action synergique des deux enzymes. La différence dans les patrons d'hydrolyse est évaluée par une analyse qualitative sur une colonne Aminex HPX 42A tel que décrit dans la section 7.2.

## 12.0 GLYCOSYLATION

L'évaluation de la glycosylation de la protéine est réalisée à l'aide du kit DIG Glycan Detection (Boehringer Mannheim) selon le protocole A du manufacturier. A la suite d'un traitement oxydatif avec le périodate de sodium, les groupements aldéhydes des oligosaccharides sont liés de façon covalente à la digoxigénine. Les protéines sont séparées par SDS PAGE selon le protocole standard de Laemmli (voir section 9.1) et par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode de Towbin (voir section 10.2). La membrane est saturée avec une solution de blocage contenant du lait écrémé pour 30 min, et lavée avec un tampon TBS, 3 fois 10 min. La membrane est incubée pour 1 h à la température de la pièce avec un anticorps Anti-DIG couplé à une phosphatase alcaline dans la solution de blocage, suivi de trois lavages avec TBS. Les protéines glycosylées sont détectées par un immuno-essai avec un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. Le substrat de la phosphatase alcaline est ajouté et le développement d'une coloration noire révèle la présence de groupements glycosylés. Un contrôle positif et négatif permettent d'évaluer la réaction de coloration.

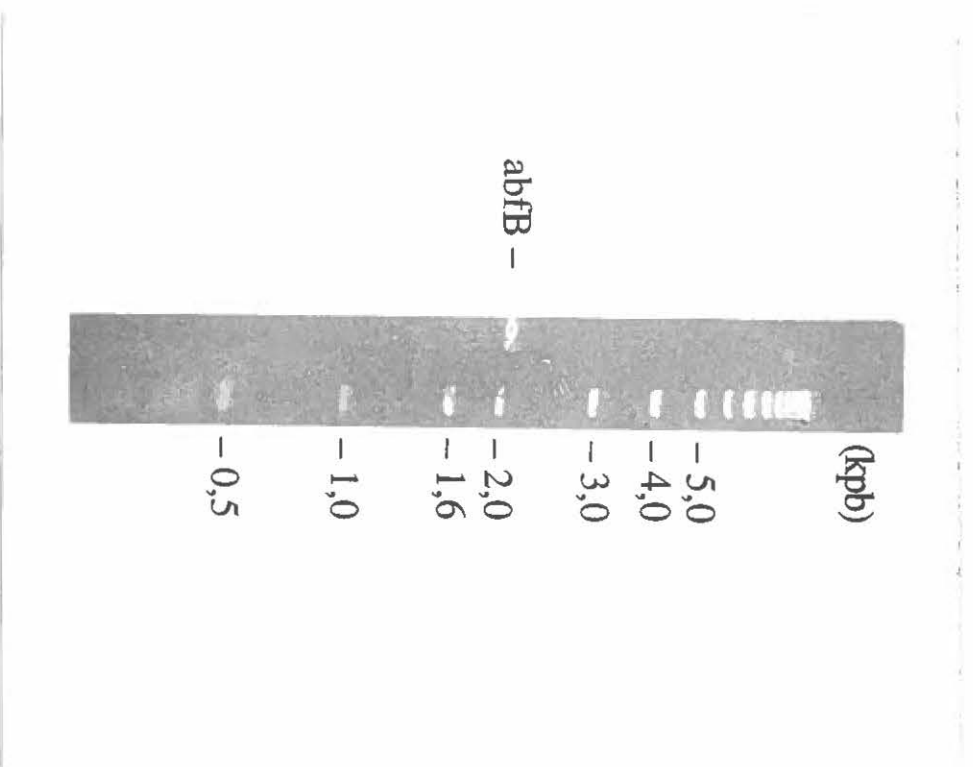
### III. RÉSULTATS

#### 1.0 AMPLIFICATION DU GÈNE PAR PCR

Le gène codant l'enzyme  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B est contenu dans une séquence nucléotidique de 2,1 kpb. La séquence nucléotidique complète a été déterminée à partir du plasmide pIAF31 dans le laboratoire du Dr François Shareck. Le plasmide pIAF31 contient un fragment chromosomique de *S. lividans* contenant le gène *xlnA* et *abfB* formant un opéron. La séquence *abfB* possède une séquence peptide signal. L'*abfB* possède une homologie avec *xlnA*. La région homologue code pour un site de fixation au xylan. La séquence du gène *abfB* a été amplifiée par PCR à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques bordant le gène. La séquence nucléotidique de l'amorce 5' est 5'GGGATCCAAGCTTAAAGTAGTAGTGGTCACGGA3' alors que la séquence correspondant à l'amorce 3' est 5'GGGGATCCAAGCTTGTGCACCGACGGTCT3'.

Le gène *abfB* codant pour l'enzyme  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B a été amplifié par la technique de PCR. L'ADN amplifié a été analysé sur un gel d'agarose pour visualiser la présence du fragment à 2,1 kpb (voir figure 6).

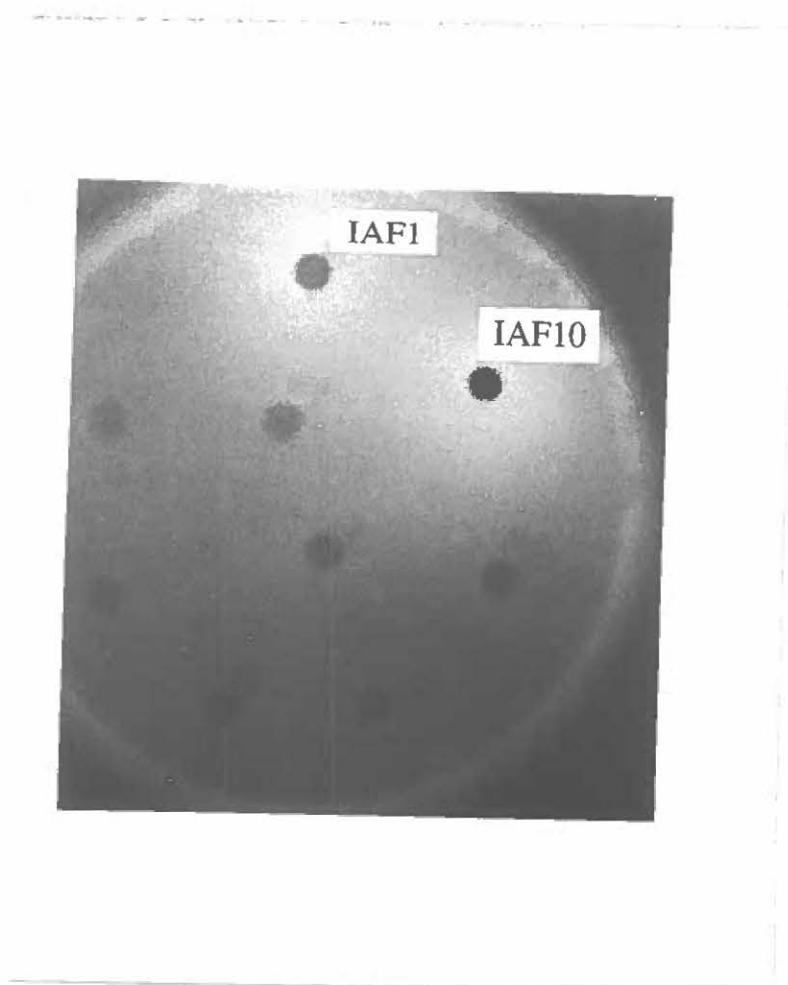




**Figure 6:** Amplification du gène abfB par PCR.

## 2.0 SOUS-CLONAGE DU GÈNE

Le gène *abfB* a été sous cloné dans le plasmide multicopie pIJ702 au site BglII. L'insertion d'un fragment d'ADN au site BglII inactive le gène de la tyrosinase qui est une enzyme intermédiaire dans la voie de synthèse de la mélanine. La majorité des colonies sur milieu R<sub>5</sub> étaient blanches. 64 clones transformants ont été repiqués sur un milieu de détection RBB xylan. Douze clones positifs ainsi que douze clones négatifs ont été sélectionnés et ensemencés sur milieu Bennett-thiostreptone. Par la suite, les clones sélectionnés ont été cultivés en milieu M<sub>14</sub> xylose. L'analyse des surnageant de culture des clones par SDS-PAGE démontrait qu'une protéine majoritaire était sécrétée dans le milieu de culture des clones *S. lividans* IAF1 et IAF10. En parallèle, des échantillons de surnageant de culture ont été analysés sur un milieu Stewart-4MUA pour la détection d'une activité enzymatique. Un halo de fluorescence était observé dans les puits correspondants indiquant la présence d'une enzyme capable de dégrader la molécule 4-MUA (voir figure 7). De plus, la libération du sucre arabinose à partir des substrats naturels arabinoxylan et xylan d'épeautres d'avoine confirmait l'activité arabinofuranosidasique des clones IAF1 et IAF10. Les clones IAF1 et IAF10 ont été lyophilisés pour la conservation.



**Figure 7:** Hydrolyse enzymatique du substrat synthétique 4-MUA médiée par les surnageants de culture des clones *S. lividans* IAF1 et IAF10.

### 3.0 PRODUCTION DE L' ENZYME

L'enzyme AbfB a été produite par fermentation dans un milieu minimal M<sub>14</sub> contenant le xylose comme source de carbone. Le plasmide à multicopie entraîne une surexpression de l'enzyme AbfB et abolit l'effet répresseur du xylose. En présence de cette source de carbone , 3 U/ml ont été produites après 72 h de culture à 34 °C. Après ce temps, on note une diminution de l'activité enzymatique, cependant à 96 h il y a stabilisation de l'activité enzymatique autour de 2 U/ml. Parallèlement, on observe une diminution de la concentration de protéines à partir de 96 h. L'AbfB est la protéine majoritaire dans le milieu de culture.

### 4.0 PURIFICATION DE L'ENZYME

#### 4.1 Purification

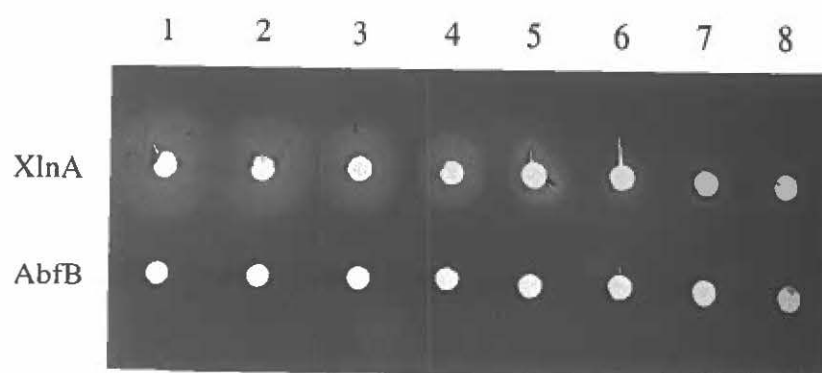
L'AbfB a été purifiée jusqu'à homogénéité en trois étapes. L'ultrafiltration est la première étape de purification, elle est rapide permettant de concentrer 35 fois le volume de surnageant de culture avec toutefois une faible perte de l'activité enzymatique dans le filtrat. La deuxième étape de purification consiste en une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium. L'AbfB est purifiée sur une colonne échangeuse cationique (CM Sepharose) par chromatographie conventionnelle à basse pression. L'enzyme élue de la

colonne avec un gradient de chlorure de sodium à partir de 0,4 M avec obtention d'un pic d'élution unique. L'activité enzymatique des fractions récoltées était déterminée sur milieu gélosé Stewart 4-MUA et RBB xylan. L'AbfB catalyse l'hydrolyse de la molécule synthétique 4-MUA, cependant elle est incapable de cliver le xylan et entraîner la formation d'une zone d'éclaircissement sur RBB xylan (voir figure 8).

La fraction retenue sur la résine CM Sepharose était responsable de l'activité arabinofuranosidasique alors que les diverses fractions non chargées sur la résine étaient responsable de l'activité xylanolytique.

#### 4.2 Rendement

Le rendement de purification de l'enzyme a été évalué à 4,6 %. L'ultrafiltration a permis de concentrer les protéines, et surtout, de diminuer le volume de surnageant de culture de manière appréciable. L'augmentation de l'activité spécifique de l'enzyme est négligeable, effectivement le taux de purification est de 3,6. 12 mg de la protéine (AbfB) est purifiée à la fin du passage sur la colonne CM-Sepharose (voir tableau 6). La pureté de l'AbfB a été vérifiée par une courbe de titration électrophorétique. Le gel, coloré au nitrate d'argent, révélait une protéine ayant un pI de 7,4. La présence de faibles bandes pourrait indiquer la présence d'isoformes de l'enzyme ou bien des produits de dégradation de l'enzyme (voir figure 9).



**Figure 8:** Hydrolyse du substrat RBB-xylan par la xylanase A et l'arabinofuranosidase B à des dilutions sérielles.

concentration d'enzyme (mg/ml)

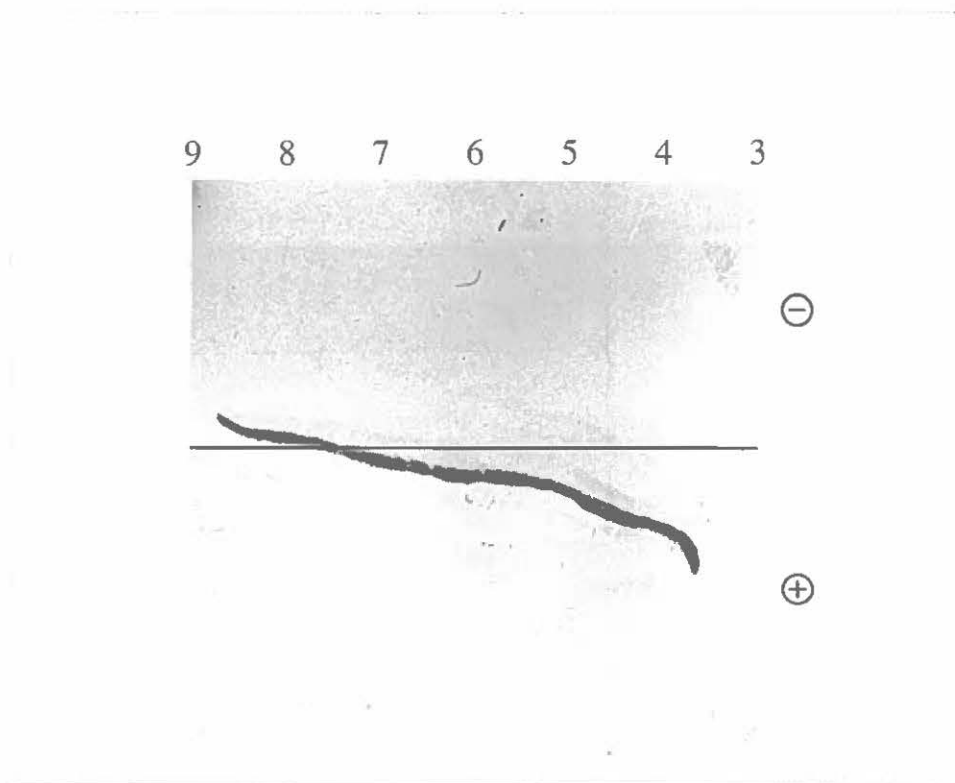
1=1 2=0,5 3=0,2 4=0,1 5=0,05 6=0,025 7=0,02 8=0,01

XlnA = xylanase A

AbfB = arabinofuranosidase B

**Tableau 6:** tableau de purification de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B (AbfB).

étape	activité total (U.I.)	protéines total (mg)	activité spécifique (U.I./mg)	rendement (%)	facteur de purification
surnageant de culture	22 560	9160	2,46	100	1
enzyme brute	2940	450	6,5	13	2,6
CM Sepharose	1050	125	8,4	4,6	3,6



**Figure 9:** Courbe de titration électrophorétique de l'AbfB sur gel de polyacrylamide contenant des ampholytes formant un gradient de pH de 3 à 9 (PhastSystem, Pharmacia). 4  $\mu$ g de protéines sur le gel. Gel coloré au nitrate d'argent.



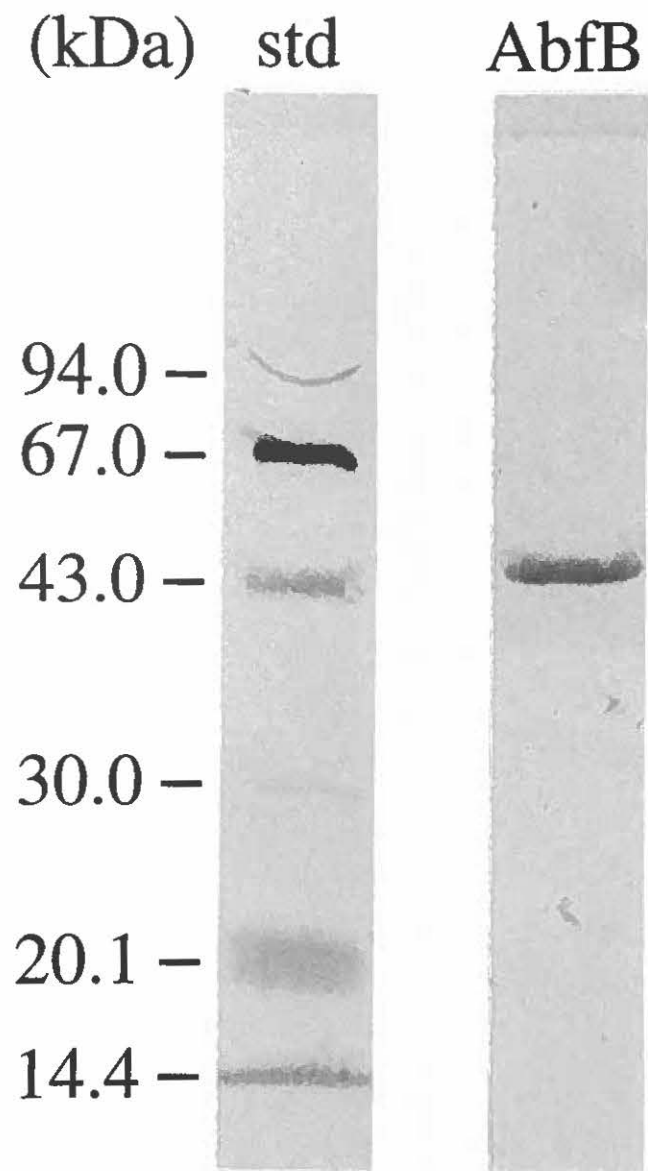
## 5.0 CARACTÉRISATION DE L'ARABINOFURANOSIDASE

### 5.1 Masse moléculaire, point isoélectrique et glycosylation

La masse moléculaire de l'enzyme a été déterminé par SDS PAGE. La masse moléculaire de l'AbfB est de 43 000 Da estimée par rapport à un standard de protéines de masse moléculaire (voir figure 10). La masse moléculaire de l'AbfB selon la séquence déduite en acides aminés du gène abfB est de 47 000 Da. Il y a une différence d'environ 4 000 Da entre la masse moléculaire déterminé à partir de la séquence et la masse moléculaire sur SDS-PAGE.

Le point isoélectrique de l'enzyme est de 7,4 (voir figure 9).

La réaction de glycosylation (Dig Glycan Detection kit) indique que l'enzyme n'est pas glycosylée, l'AbfB ne contient pas de groupements O-glycosidiques.



**Figure 10:** Détermination du poids moléculaire de l'AbfB par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS. 4  $\mu$ g de protéines. Gel coloré au nitrate d'argent.

## 5.2 Température et pH optimaux

La courbe de l'activité enzymatique de l'AbfB en fonction du pH indique que la valeur optimale de l'activité enzymatique est de 6,0 pour les différents tampons (voir figure 11). Cependant, l'activité enzymatique est optimale avec le tampon phosphate. Avec ce tampon, l'activité optimale est 10,8 U/ml, alors que l'activité optimale est 9,2 et 7,3 U/ml avec les tampons Mc Ilvaine (acide citrique et sodium phosphate dibasique) et sodium citrate respectivement.

La température optimale a été déterminée à la valeur de pH optimal. La courbe de l'activité enzymatique en fonction de la température illustre une activité optimale à 55 °C. L'enzyme est rapidement inactivée à une température supérieure à 60 °C (voir figure 12).

## 5.3 Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique a été déterminée dans des conditions de pH, température et temps d'incubation optimaux. La méthode de Lineweaver-Burke a été utilisée pour déterminer les constantes cinétiques. Le graphique de Lineweaver-Burke illustre l'inverse de l'activité enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration de substrat. Le  $K_m$  de l'enzyme a été déterminé à 1,17 mg/ml et le  $V_{max}$  de l'enzyme à 18,5 U/mg pour l'arabinoxylan de blé. Le  $K_m$  a été déterminé à 5,12 mg/ml pour la fraction soluble du xylan d'épeautres d'avoine et le  $V_{max}$  est 17,2 U/mg (voir figure 13). La valeur de  $V_{max}$  calculé est quasiment identique alors que le  $K_m$  est différent pour ces deux polysaccharides.

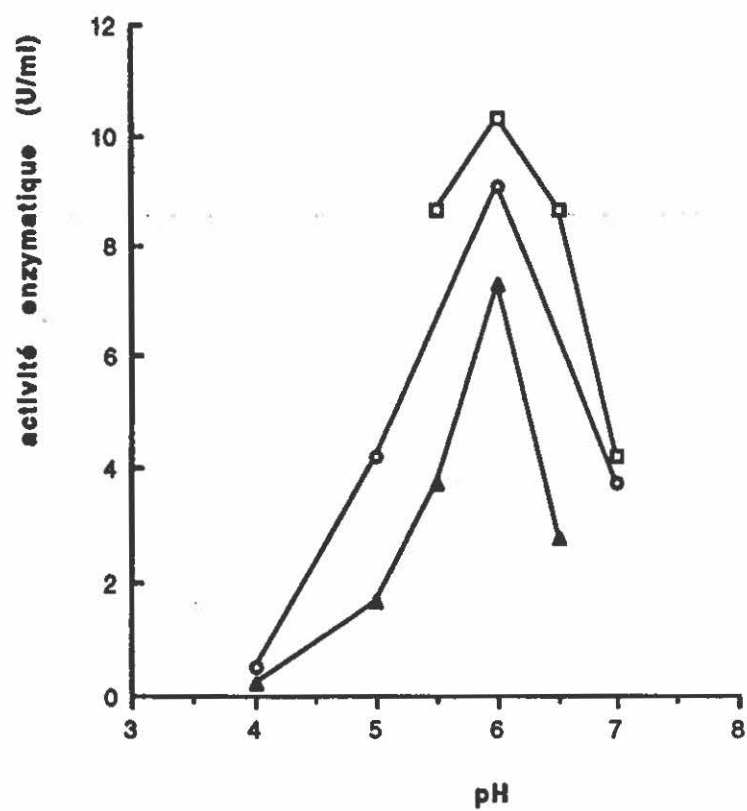


Figure 11: Effet du pH sur l'activité enzymatique.

- tampon sodium phosphate
- ▲— tampon sodium citrate
- tampon phosphate

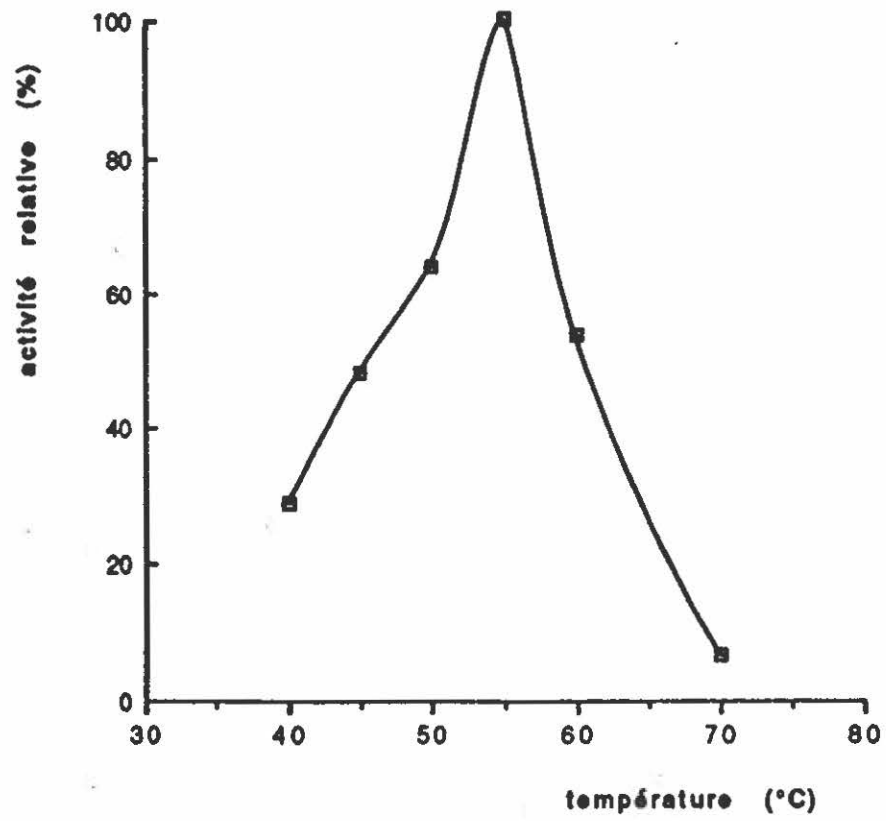
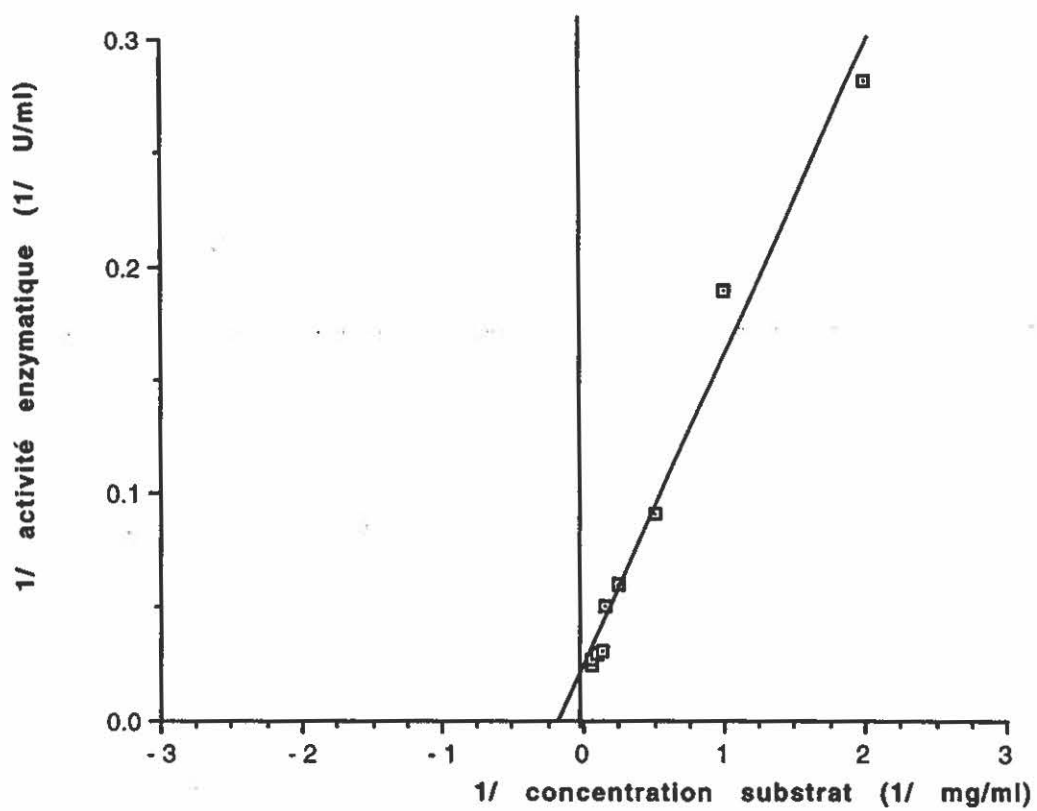


Figure 12: Effet de la température sur l'activité enzymatique.



**Figure 13:** Courbe de Lineweaver-Burke de l'enzyme avec le substrat xylan d'épeautres d'avoine.

#### 5.4 Stabilité thermique

Le graphique illustrant l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps d'incubation à diverses températures montre une dénaturation rapide de l'enzyme à des températures supérieures à 60 °C. Dix pourcents de l'activité enzymatique demeure après seulement 10 min d'incubation à 60 °C, alors que plus de 50 % de l'activité restent après 30 min d'incubation à 50 °C (voir figure 14).

#### 5.5 Immuno-identification

L'immuno-identification de type Western montre une réponse des anticorps polyclonaux envers l'AbfB à 43 kDa. Les anticorps anti-AbfB reconnaissent également la xylanase A<sub>1</sub>, cependant la réponse vis-à-vis la xylanase A<sub>1</sub> est beaucoup plus faible. Par ailleurs, les anticorps dirigés contre la xylanase A<sub>1</sub> reconnaissent l'arabinofuranosidase B, de même, la réponse est faible. Donc, il existe une réaction croisée entre les anticorps dirigés contre les deux protéines (voir figure15). La xylanase A<sub>1</sub> et l'arabinofuranosidase B ont toutes les deux une masse moléculaire évalué à 43 kDa.

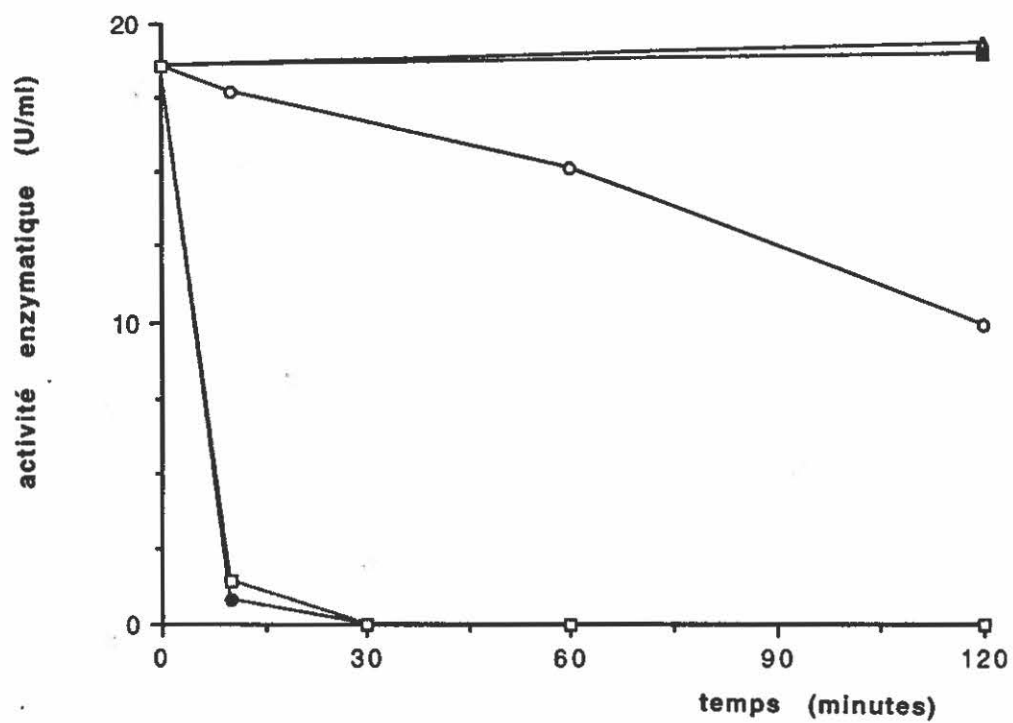
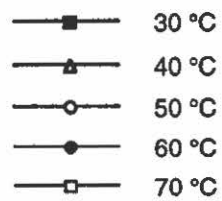
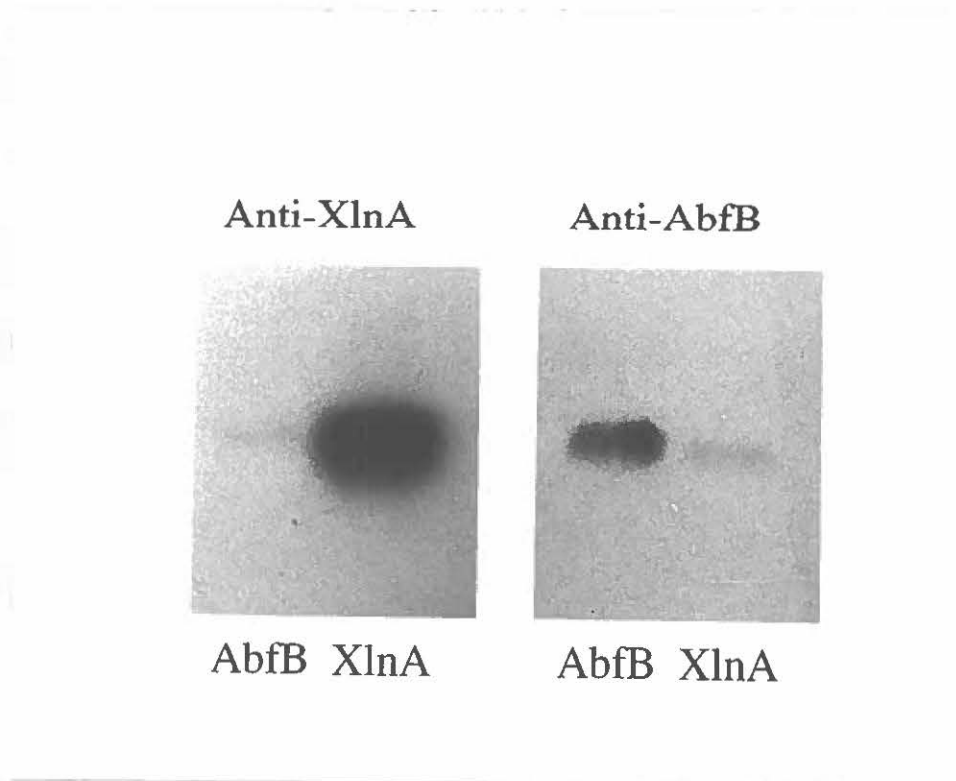


Figure 14: Thermosensibilité de l'AbfB.







**Figure 15:** Immunoréaction croisée des anticorps dirigés contre l'AbfB et XlnA.

AbfB = arabinofuranosidase B  
Anti-AbfB = anticorps anti-AbfB

XlnA = xylanase A  
Anti-XlnA = anticorps anti-XlnA

## 5.6 Profils d'hydrolyse

L'AbfB libère le sucre L-arabinose du xylan d'épeautres d'avoine, de l'arabinoxylan de blé et de seigle, et de l'arabinan de betterave à sucre. L'activité spécifique envers le xylan d'épeautres d'avoine est de 8,75 U/mg. L'activité spécifique vis-à-vis l'arabinoxylan de blé et de seigle est de 13,4 U/mg et 11,5 U/mg respectivement. L'arabinose résulte également de l'hydrolyse des arabino-oligoxylosides de l'arabinoxylotriose ( $A_1X_3$ ) à l'arabinoxylhexaose ( $A_1X_6$ ) (voir figure 16). Aucun produit d'hydrolyse n'a pu être détecté du xylan de bouleau, de mélèze ou de l'arabinan linéaire et débranché, ni de l'arabinogalactan.

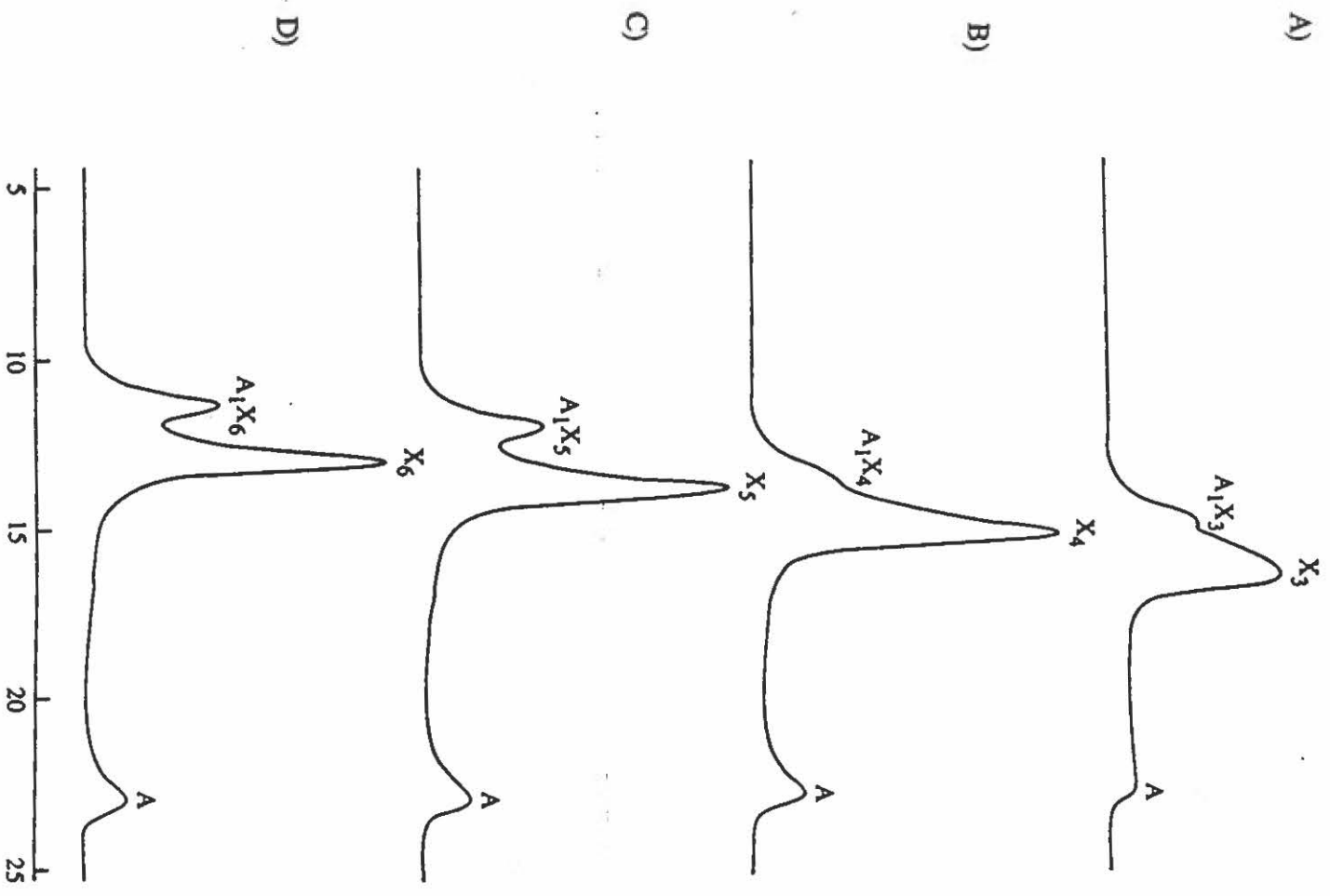
L'arabinofuranosidase B possède une faible activité  $\beta$ -xylosidase. Ce résultat est observé par l'action d'hydrolyse sur des arabino-oligoxylosides après une incubation prolongée. Le xylotriase, le xylo tétraose, le xylopentaose et le xylohexaose sont les sucres libérés après une incubation de 24 h (voir figure 17). Le xylose et le xylobiose n'ont pas été retrouvés dans les analyses. Cette activité  $\beta$ -xylosidase résiduelle de l'AbfB a été démontrée seulement à partir des arabino-oligoxylosides. Effectivement, aucune activité résiduelle n'a pu être détectée sur le xylan d'épeautres d'avoine, l'arabinoxylan de blé ou de seigle. Le seul produit d'hydrolyse suite à une incubation prolongée est l'arabinose. L'AbfB est incapable d'effectuer une hydrolyse complète du xylan d'épeautres d'avoine, la libération de l'arabinose sur le xylan ne cause pas un éclaircissement du substrat RBB xylan.

**Figure 16:** Patrons d'hydrolyse des arabino-oligoxylosides d'un hydrolysate de xylan d'épeautres d'avoine par l'AbfB après une heure d'incubation.

- A) arabino-xylotriase
- B) arabino-xylotétraose
- C) arabino-xylopentaose
- D) arabino-xylohexaose

A<sub>1</sub>X<sub>3</sub> = arabino-xylotriase  
A<sub>1</sub>X<sub>4</sub> = arabino-xylotétraose  
A<sub>1</sub>X<sub>5</sub> = arabino-xylopentaose  
A<sub>1</sub>X<sub>6</sub> = arabino-xylohexaose

A = arabinose  
X<sub>3</sub> = xylotriase  
X<sub>4</sub> = xylotétraose  
X<sub>5</sub> = xylopentaose  
X<sub>6</sub> = xylohexaose

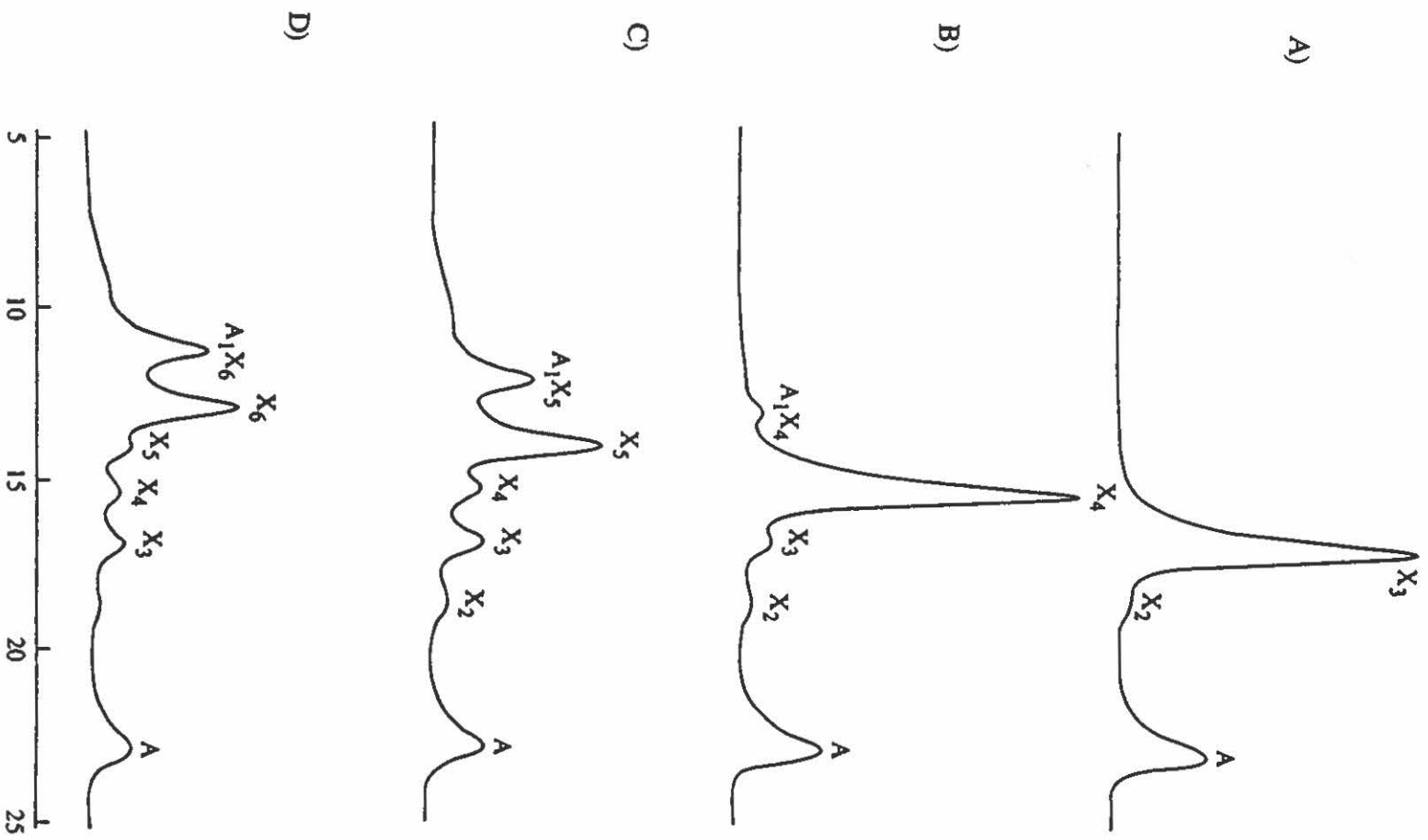


**Figure 17:** Patrons d'hydrolyse des arabino-oligoxylosides d'un hydrolysate de xylan d'épeautres d'avoine par l'AbfB après 24 h d'incubation.

- A) arabino-xylotriase
- B) arabino-xylotétraose
- C) arabino-xylopentaose
- D) arabino-xylohexaose

A<sub>1</sub>X<sub>4</sub> = arabino-xylotétraose  
A<sub>1</sub>X<sub>5</sub> = arabino-xylopentaose  
A<sub>1</sub>X<sub>6</sub> = arabino-xylohexaose

A = arabinose  
X<sub>2</sub> = xylobiose  
X<sub>3</sub> = xylotriase  
X<sub>4</sub> = xylotétraose  
X<sub>5</sub> = xylopentaose  
X<sub>6</sub> = xylohexaose



## 6.0 SYNERGISME ENZYMATIQUE

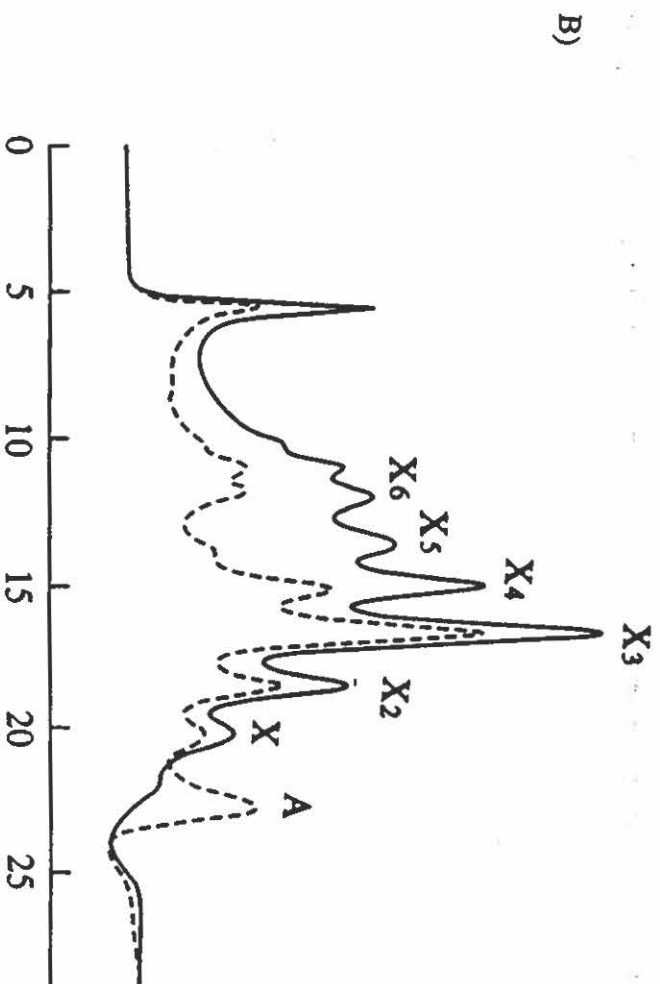
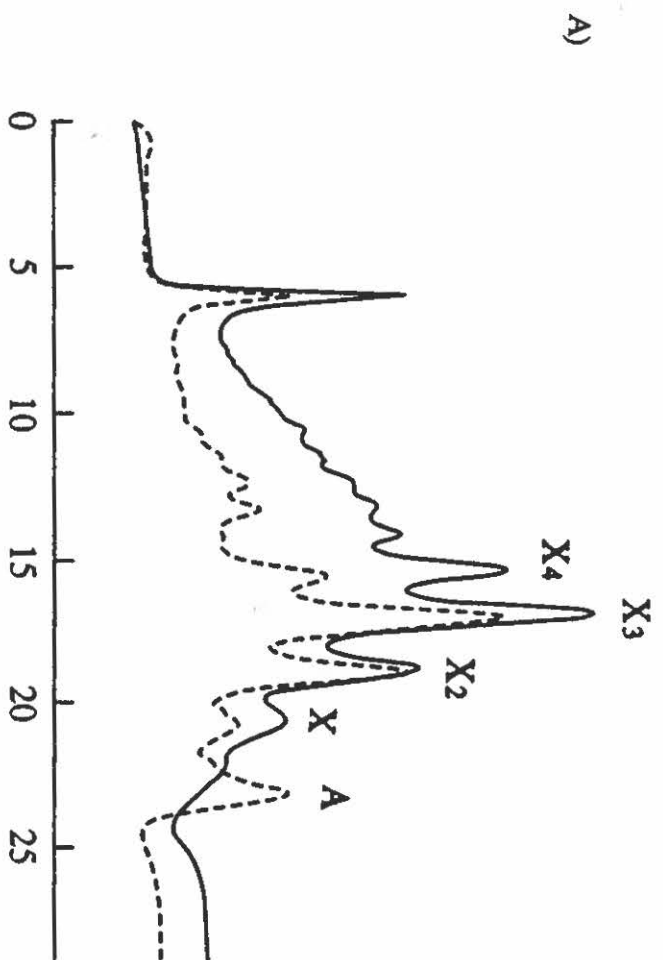
Aucun synergisme enzymatique n'a pu être observé lors de l'hydrolyse du xylan d'épeautres d'avoine par l'action combinée de l'AbfB avec la xylanase A ou la xylanase C. Le traitement enzymatique avec la xylanase A ou la xylanase C seul libère autant d'oligoxylosides sinon plus qu'un traitement combinée de l'arabinofuranosidase B avec l'une ou l'autre des deux xylanases. Par contre, on note des différences dans les patrons d'hydrolyse du xylan après une heure d'incubation. Les oligoxylosides de faible poids moléculaire tel le xylobiose, le xylotriose et le xylotétraose sont libérés au détriment du xylopentaose, xylohexaose et xyloheptaose (voir figure 18). L'AbfB hydrolyse avec une efficacité égale le xylan d'épeautres d'avoine que les arabino-oligoxylosides provenant de la dégradation du xylan par les xylanases. Le résultat est très différent pour les substrats contenant un rapport plus élevé en arabinose. Ainsi, l'arabinoxylan de blé ou de seigle est faiblement dégradé par la xylanase A ou la xylanase C. L'hydrolyse combinée de l'AbfB avec l'une ou l'autre des xylanases montre clairement une augmentation dans l'activité xylanolytique. Le xylose, le xylobiose et le xylotriose sont les produits d'hydrolyse de l'arabinoxylan par la XlnA alors que le xylobiose, le xylotriose, le xylotétraose, et le xylopentaose sont les produits d'hydrolyse de la XlnC (voir figure 19).

**Figure 18:** Profils d'hydrolyse du xylan d'épeautres d'avoine par les xylanases et l'arabinofuranosidase B.

A)    —  = XlnA seul  
      - - - - = XlnA avec AbfB

B)    —  = XlnC seul  
      - - - - = XlnC avec AbfB

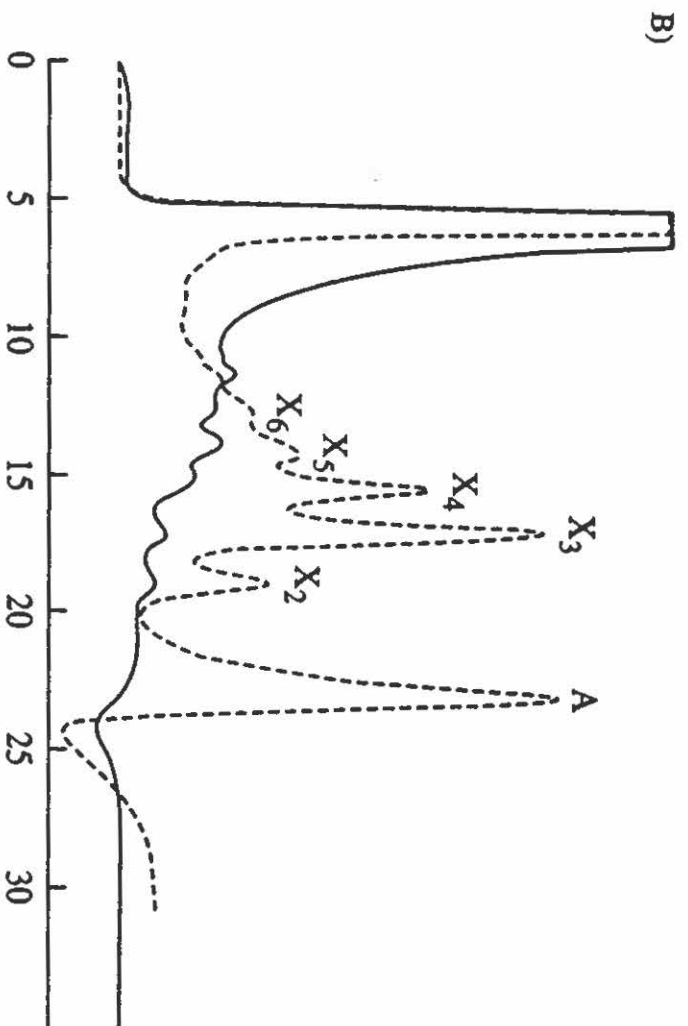
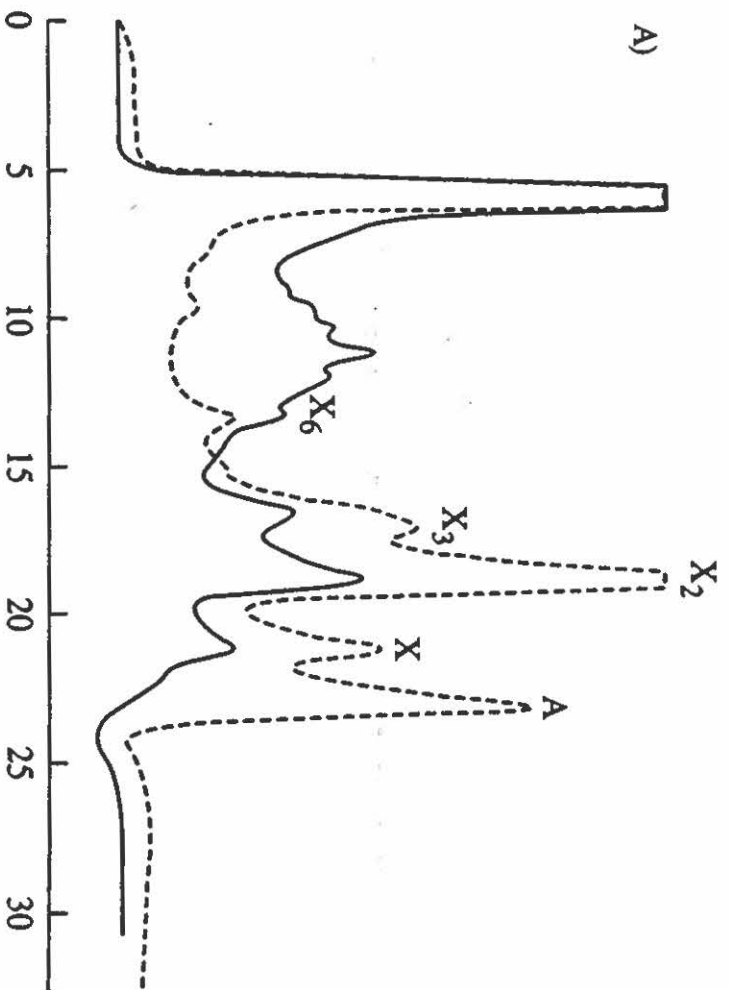




**Figure 19:** Profils d'hydrolyse de l'arabinoxylan de blé par les xylanases et l'arabinofuranosidase B.

A)    \_\_\_ = XlnA seul  
      ---- = XlnA avec AbfB

B)    \_\_\_ = XlnC seul  
      ---- = XlnC avec AbfB



#### IV. DISCUSSION

Le gène *abfB* a été localisé sur le plasmide pIAF31. Ce plasmide provient d'une banque d'ADN génomique du chromosome de *Streptomyces lividans* (Mondou et al., 1986). L'analyse de l'activité enzymatique du surnageant de culture du clone *S. lividans* IAF31 montrait la présence d'une activité xylanolytique ainsi qu'une activité arabinosidasique. Cette dernière n'est pas une activité résiduelle de la xylanase A, cela indiquait que l'insert d'ADN dans le plasmide pIAF31 codait possiblement pour deux enzymes, soit une xylanase et une arabinofuranosidase. La séquence nucléotidique du gène *abfB* a été déterminée suite au séquençage complet de l'insert génomique contenu dans le plasmide pIAF31. L'*abfB* est localisé en amont de *xylA* sur le plasmide pIAF31.

L'*abfB* possède une forte homologie de séquence avec le gène *xynC* de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* qui code pour une arabinofuranosidase (Kellett et al., 1990). Cette séquence disponible dans la banque génomique GenBank était la seule ayant une homologie avec l'*abfB*. *xlnA* et *abfB* sont tous les deux sous le contrôle d'un promoteur unique localisé entre les deux gènes, or le sens de transcription est opposé.

Par une approche d'amplification par PCR, l'*abfB* a été amplifié à l'aide de deux oligonucléotides bordant le gène. Le sous-clonage du gène dans le vecteur multicopie pIJ702 résultait d'un grand nombre de copies du gène *abfB* dans la souche *S. lividans* IAF10-164. L'expression des gènes dans un vecteur multicopie est très utile pour la

production des enzymes. Plusieurs gènes ont été exprimés dans le vecteur pIJ702, et on constate une surexpression dans tous les cas (Vats-Metha et al., 1990; Kluepfel et al., 1992; Arcand et al., 1993; Manin et al., 1994).

Le milieu M<sub>14</sub> est un milieu pauvre contenant plusieurs sels minéraux. *S. lividans* a une bonne croissance dans ce milieu de culture. *S. lividans* IAF1 n'est pas sous le contrôle de la répression catabolique par le xylose et ce à cause de l'effet multicopie du plasmide pIJ702 (Gusek et Kinsella, 1992). Le xylose est un substrat coûteux, et représente un inconvénient important lors de la mise à l'échelle de la fermentation à grande échelle. L'analyse sur un gel de SDS-PAGE des protéines sécrétées par le clone IAF1 révélait une production élevée de la protéine. L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B représente au moins 25 % des protéines retrouvées dans le bouillon de culture.

L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B a été purifiée relativement facilement par chromatographie conventionnelle sur une résine cationique carboxyméthyl. Les protéines sécrétées dans le surnageant de culture du clone IAF1 sont pour la plupart des protéines acides ayant un pI inférieur à 7. L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B est une protéine ayant un pI de 7,4, ce qui est légèrement supérieur à 7. Par conséquent, la purification de l'AbfB a été plus rapide comparativement à une procédure employant diverses étapes de purification. Il est difficile de comparer le niveau de purification de l'enzyme avec la littérature, car effectivement la caractérisation des Abfs a été effectuée avec le substrat synthétique pNPA. L'Abf de *Ruminococcus albus* (Greve et al., 1984) a une activité

spécifique de 655 U/mg avec le pNPA alors que l'activité spécifique est de 883 U/mg pour *Clostridium stercorarium* (Schwarz et al., 1995) et 153 U/mg pour *Streptomyces lividans* (Manin et al., 1994). L'AbfB ne possède aucune activité d'hydrolyse avec le pNPA. *Clostridium stercorarium* a une activité spécifique de 10,4 U/mg avec l'arabinoxylan (Schwarz et al., 1995), ce qui est similaire à l'AbfB de *S. lividans*.

Les caractéristiques biochimiques de l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B de *S. lividans* sont en plusieurs points différentes des autres enzymes citées dans la littérature. L'AbfB est un monomère constitué d'un seul polypeptide possédant une masse moléculaire moyenne de 43 000 Da localisé entre l'Abf C1 de *Streptomyces diastaticus* 38 000 Da (Tajana et al., 1992) et l'Abf de *Trichoderma reesei* 53 000 Da (Poutanen, 1988). La protéine XylC ayant une homologie avec l'AbfB a une masse moléculaire de 59 000 Da (Kellett et al., 1990). Par contre, l'Abf de *Streptomyces purpurascens* a une masse moléculaire de 495 000 Da (Komae et al., 1982) alors que l'Abf de *Bacteroides xylanolyticus* a une masse moléculaire de 364 000 Da (Schyns et al., 1994) et l'AbfA de *Streptomyces lividans* 380 000 Da (Manin et al., 1994).

Généralement, les protéines de poids moléculaire élevé sont des polymères constitués de plusieurs sous-unités. On observe une corrélation directe entre le poids moléculaire et la localisation cellulaire puisque les enzymes de haut poids moléculaire sont localisées à l'intérieur de la bactérie. Par contre, dans certaines situations, la lyse bactérienne au cours de la croissance entraîne la libération des enzymes de poids

moléculaire élevé. L'AbfA de *S. lividans* est une enzyme intracellulaire (Manin et al., 1994) tandis que l'AbfB est sécrétée et se retrouve dans le milieu extracellulaire. La présence d'une séquence peptide signal dans le cadre de lecture ouvert explique ce fait. Les enzymes extracellulaires possèdent généralement une plus grande spécificité de substrats, alors que les protéines intracellulaires sont limitées par le nombre de substrats qui peuvent entrer à l'intérieur de la cellule.

Le point isoélectrique de l'enzyme est 7,4. La courbe de titration électrophorétique de l'enzyme montre que la charge nette totale de la protéine est près de la neutralité. Généralement, les protéines synthétisées par les streptomycètes sont des protéines de nature acide. De plus, la plupart des Abfs citées sont acides, en particulier les arabinofuranosidases de *Ruminococcus albus* avec un pI de 3,8 (Greve et al., 1984), *Streptomyces purpurascens* avec un pI de 3,9 (Komae et al., 1982) et *Aspergillus nidulans* avec un pI de 4,3 (Fernandez-Espinar et al., 1994). L'AbfA de *Streptomyces lividans* a un pI acide de 4,6 (Manin et al., 1994). L'Abf de *Trichoderma reesei* a un pI de 7,5 proche de celui de l'AbfB (Poutanen, 1988). Enfin, la bactérie *Streptomyces diastaticus* synthétise deux arabinofuranosidases ayant un pI plus élevé que l'AbfB, soit 8,3 et 8,8 (Tajana et al., 1992). Ces deux enzymes ont des caractéristiques physico-chimiques semblables alors que l'AbfA et l'AbfB produites par *S. lividans* sont très différentes (voir tableau 7).

L'AbfB n'est pas glycosylée tous comme l'AbfA. La plupart des protéines des procaryotes ne sont pas glycosylées. Les modifications post-traductionnelles sont beaucoup plus fréquentes chez les levures et les eucaryotes supérieurs (plantes et mammifères). La glycosylation des protéines bactériennes pourrait constituer une forme de stabilisation de la structure tridimensionnelle ou bien une protection de certains acides aminés contre l'attaque protéolytique. Le rôle de la glycosylation des protéines est peu connu.

La température optimale de l'activité enzymatique est 55 °C pour l'AbfB (voir figure 12). L'Abf de *Butyrivibrio fibrisolvens* possède un optimum thermique identique (Hespell et O Bryan, 1992). Le profil de température indique une diminution importante de l'activité enzymatique à 70 °C. En effet, l'activité enzymatique relative est 10 % de l'activité optimale. A 40 °C, l'activité enzymatique relative est 30 %. L'enzyme est rapidement dénaturée à des températures supérieures à 60 °C alors qu'à des températures inférieures à 50 °C, l'énergie d'activation est insuffisante pour la réaction enzymatique. L'optimum thermique est similaire aux optimums observés pour les différentes xylanases et cellulases de *S. lividans*. L'AbfA a un optimum à 60 °C (Manin et al., 1994). *S. lividans* est un micro-organisme mésophile vivant dans le sol. Les enzymes synthétisées doivent avoir une activité optimale similaire à la température de croissance du micro-organisme dans la litière organique du sol. La température à laquelle l'activité enzymatique est optimale se situe généralement entre 45 et 60 °C pour les enzymes bactériennes. Par contre, le micro-organisme thermophile *Bacillus stearothermophilus* possède une enzyme



ayant une température optimale de 70 °C (Gilead et Shoham, 1995). Le pH optimal à l'activité enzymatique est 6,0, identique à celui de l'AbfA (Manin et al., 1994). A pH 4,0, l'activité relative est à peine 20 % , alors qu'à pH 7,0, l'activité relative est d'environ 50 %. L'AbfB est sensible à un pH inférieur à 5. Les enzymes synthétisées par les streptomycètes ont une activité enzymatique autour de pH 5,5 et 6,5 alors que les champignons synthétisent des enzymes ayant une activité optimale autour de pH 2,0. Les champignons sont des micro-organismes qui préfèrent un environnement acide alors que les streptomycètes vivent dans un milieu où le pH est près de la neutralité.

L'AbfB est une enzyme thermosensible. En effet, l'activité enzymatique de l'enzyme chute drastiquement après une préincubation de 30 minutes à 50 °C. L'activité enzymatique est quasiment nulle après une heure d'incubation à 50 °C (voir figure 14). *Streptomyces lividans* est un micro-organisme mésophile, par conséquent, la plupart des enzymes synthétisées chez cette bactérie ne sont pas thermo-résistantes. La dénaturation thermique de l'enzyme est habituellement associée à une modification conformationnelle de l'enzyme. La dénaturation de la forme tridimensionnelle de la protéine pourrait occasionner une perte significativement importante de la capacité de fixation de l'enzyme au substrat. En effet, la fixation de l'enzyme sur le xylan doit être la première étape du mécanisme d'hydrolyse du xylan. Une déstabilisation conformationnelle du site de fixation XBD pourrait affecter la réaction d'hydrolyse; à ce moment l'enzyme est incapable de se lier sur la chaîne de  $\beta$ -D-1,4-xylan, ou alors le complexe enzyme-substrat est relativement

instable affectant considérablement la vitesse d'hydrolyse. Une modification de la conformation du site catalytique pourrait être une deuxième explication de la perte d'activité enzymatique. La modification de la structure du site catalytique au niveau de certains acides aminés pourrait altérer l'ordre de la réaction enzymatique.

L'immunoidentification de type Western montre une réaction croisée des anticorps dirigés contre la xylanase A et l'arabinofuranosidase B. Ce résultat montre que l'AbfB possède des épitopes communs avec la xylanase A. Les anticorps anti-XlnA reconnaissent l'AbfB, cependant la réponse est légèrement plus faible. De plus, les anticorps anti-AbfB reconnaissent la xylanase A, également avec une réponse plus faible. Il existe une homologie de séquence nucléotidique entre le gène *abfB* et le gène *xlnA*. La séquence homologue est localisée à l'extrémité 5' du gène *xlnA* alors qu'elle se localise à l'extrémité 3' du gène *abfB*. La séquence homologue est un site de fixation sur le xylan (XBD), ce domaine de fixation doit avoir une structure tridimensionnelle commune chez ces deux hémicellulases de *S. lividans*. Les épitopes communs des antigènes sont localisés au niveau du site XBD. Effectivement, les anticorps anti-XBD dirigés contre le site XBD de la xylanase A reconnaissent l'arabinofuranosidase B. Les sites de fixation au substrat sont retrouvés chez quelques cellulases et hémicellulases (Coughlan et Hazlewood, 1993). Il semble que ces domaines pourraient augmenter la capacité de liaison entre l'enzyme et le substrat. Les gènes *xynB* (xylanase) et *xynC* (arabinofuranosidase) de *Pseudomonas fluorescens* contiennent également une séquence homologue à l'intérieur de la séquence

complète du gène. Cette séquence est identique chez les deux gènes et code pour un site CBD. Cette séquence a été retrouvée à différentes positions dans le génome de la bactérie (Kellett et al., 1990).

Une cinétique enzymatique a été effectuée avec deux substrats contenant le L-arabinose, soit le xylan d'épeautres d'avoine ainsi que l'arabinoxylan de blé qui sont des xylans des graminées. La différence entre ces substrats se retrouve au niveau de la proportion relative d'arabinose. Le pourcentage d'arabinose dans l'arabinoxylan est plus élevé, soit environ 40 % comparativement au xylan d'épeautres d'avoine avec 9 %. De plus, le xylan d'épeautres d'avoine contient divers résidus tel des groupements méthylglucuronate. Le  $K_m$  représente l'affinité de l'enzyme envers un substrat, ou la stabilité du complexe enzyme-substrat. Plus le  $K_m$  est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat ou la force de liaison du complexe enzyme-substrat est grande. Ce résultat montre que l'enzyme a une plus grande affinité envers l'arabinoxylan. La formation du complexe enzyme-substrat, avec l'arabinoxylan, est avantagé comparativement au xylan d'épeautres d'avoine. Par contre, leur  $V_{max}$  est quasiment identique. Ce résultat montre que la vitesse de réaction enzymatique ne peut pas dépasser une certaine vitesse limite, qui est identique indépendamment de la nature du substrat utilisé. Habituellement, le  $K_m$  et le  $V_{max}$  des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases ont été déterminés à partir du substrat synthétique p-nitrophényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside. Par conséquent, il est très difficile de comparer les résultats puisque  $K_m$  et  $V_{max}$  varient avec le type de substrat utilisé.

L'AbfB est capable de libérer l'arabinose à partir du xylan d'épeautres d'avoine, mais également à partir de l'arabinoxylan de blé ou de seigle, et de l'arabinan de betterave à sucre (voir tableau 7). Par contre, l'AbfA ne possède pas d'activité envers le xylan d'épeautres d'avoine, mais une faible activité envers l'arabinoxylan de blé et de seigle seulement après une incubation prolongée (Manin et al., 1994). Les fonctions de ces deux arabinofuranosidases sont probablement complémentaires.

L'AbfB est incapable d'hydrolyser le xylan de bouleau ou bien le xylan de mélèze. Les xylans des bois mous et durs ne contiennent pas ou très peu de résidus L-arabinofuranose.

L'AbfB libère l'arabinose de l'arabinan. Ce polysaccharide est constitué d'un long polymère de résidus L-arabinose liés par des liens  $\alpha$ -L-1,5 possédant des groupements  $\alpha$ -L-1,2-,  $\alpha$ -L-1,3 arabinofuranosyl branchés. L'enzyme clive spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -L-1,2- ou  $\alpha$ -L-1,3-arabinofuranosyl, mais est incapable de cliver la liaison  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosyl puisque l'enzyme est incapable d'hydrolyser l'arabinan débranché. L'AbfB est incapable de libérer le sucre L-arabinose à partir de l'arabinogalactan. L'AbfA est également incapable de libérer de l'arabinose de l'arabinogalactan comme la plupart des arabinofuranosidases citées dans la littérature. Dans ce cas, l'arabinose doit être lié dans une forme inaccessible pour l'enzyme.

L'AbfB, comme l'AbfA, libère le sucre L-arabinose des arabino-oligoxylosides de divers degrés de polymérisation. Ce résultat est très intéressant par le fait que l'AbfB libère l'arabinose suite à une hydrolyse de substrats de haut poids moléculaire et de faible poids moléculaire. *Bacillus subtilis* synthétise une enzyme active contre l'arabinoxylbiose et l'arabinoxylotriose mais non contre l'arabinoxylotétraose (Kaneko et al., 1994). L'AbfB de *S. lividans* est capable de libérer l'arabinose soit à partir de l'extrémité terminale non-réductrice ou bien à l'intérieur de l'oligomère.

L'activité  $\beta$ -xylosidase résiduelle de l'AbfB apparaît après une incubation prolongée de 24 heures à 55 °C. L'hydrolyse de l'arabino-xylohexaose entraîne la libération de l'arabinose, du xylotriase, du xylotétraose, et du xylopentaose. Par contre, la présence de xylohexaose montre qu'il n'y a pas dégradation complète. Cette activité  $\beta$ -xylosidase n'est pas le résultat d'une contamination dans la préparation enzymatique. La pureté de la protéine sur gel SDS-PAGE révèle une seule protéine ayant une masse moléculaire de 43 000 Da. Utt et al. (1992) ont démontré l'existence d'une arabinofuranosidase possédant une activité  $\beta$ -xylosidase. Par ailleurs, Rodionova et al. (1983) ont démontré l'existence d'une xylosidase possédant une activité arabinofuranosidase. Il existe une différence majeure dans le type de lien impliqué dans la réaction d'hydrolyse par ces deux enzymes. En effet, une  $\beta$ -D-xylosidase réalise un clivage d'un lien  $\beta$ -1,4 entre deux unités xyloses, alors qu'une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase effectue la réaction de clivage d'un lien  $\alpha$ -L-1,2 ou  $\alpha$ -L-1,3 entre une unité xylose et une

unité arabinose. Or, il est difficile d'admettre qu'une enzyme pourrait catalyser la réaction de clivage de deux types de liens chimiques. Cependant, Utt et al. (1992) ont proposé que ce mécanisme serait fréquent dans la nature. La rotation autour du lien  $\alpha$ -1,3 glycosidique liant l'arabinofuranose au xylopyranose produit un lien similaire au lien  $\beta$ -1,4 entre résidus xylopyranoses adjacents.

L'AbfB est une enzyme à action synergique. Plusieurs auteurs; dont Greve et al. 1984; Lee et Forsberg, 1987 et Kormelink et al. 1991, ont observé ce phénomène avec les arabinoxylans. La libération des résidus L-arabinose sur la chaîne de  $\beta$ -1,4-xylan diminuerait l'encombrement stérique sur le polysaccharide. La diminution des résidus L-arabinose sur la chaîne de  $\beta$ -D-1,4-xylan entraîne une augmentation de l'activité enzymatique des xylanases. Ce synergisme est accentuée avec l'arabinoxylan de blé ou de seigle comparativement au xylan d'épeautres d'avoine. Ces arabinoxylans contiennent une proportion élevée en arabinose, soit un résidu arabinose pour deux ou trois xyloses environ alors que la proportion est un résidu arabinose pour dix xyloses pour le xylan d'épeautres d'avoine.

## CONCLUSION

Le gène codant pour une nouvelle arabinofuranosidase (*abfB*) a été cloné dans un système d'expression chez *Streptomyces lividans* et l'enzyme a été purifiée à partir du surnageant de culture. La caractérisation biochimique et la détermination de la spécificité de substrat révèle des informations intéressantes sur cette deuxième arabinofuranosidase.

D'après la nomenclature instaurée par Kaji (1984), l'AbfB est classée comme étant une enzyme du type *Aspergillus niger*. Les enzymes de ce type sont peu nombreuses à avoir été caractérisées. Par contre, selon la même classification, l'AbfA est classée comme une enzyme du type *Streptomyces purpurascens*. Le tableau 7 illustre les caractéristiques biochimiques des deux Abfs produites par *S. lividans*.

**Tableau 7:** Tableau synoptique des Abfs de *Streptomyces lividans*.

enzyme	M.M. (kDa)	pI	localisation (E/I)	structure (M/P)	substrat(s)
AbfA	380	4,3	I	P	AX <sub>2</sub> -AX <sub>6</sub> pNPA
AbfB	43	7,4	E	M	arabino- xylan de blé, seigle xylan d'épeautres d'avoine arabinan AX <sub>2</sub> -AX <sub>6</sub>

E: enzyme extracellulaire    I: intracellulaire  
M: structure monomérique    P: structure polymérique



## REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier ma mère qui m'a accordée son support moral, financier et affectif tous au long de mes études. Je tiens également à remercier mon amie Julie pour son aide inestimable et son amour. Merci au Dr. Dieter Kluepfel pour m'avoir accepté comme étudiant. Merci aux professeurs du Groupe des streptomycètes, Dieter, François, Rolf et Claude pour leur expertise et les critiques constructives dans l'élaboration du mémoire et des séminaires. Merci aux techniciennes Lise, Nicole, Lisette et Liette pour l'aide technique, les conseils et les encouragements au fil du temps. Finalement, merci au fond FCAR et la Fondation Armand Frappier pour l'accord d'une bourse pour la poursuite de mes études.

## LISTE DE REFERENCES

- ARCAND, N., D. KLUEPFEL, F.W. PARADIS, R. MOROSOLI, et F. SHARECK. 1993.  $\beta$ -mannanase of *Streptomyces lividans* 66: Cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**: 857-863.
- ASPINALL, G.O. Ed. 1972. *The Polysaccharides*. Academic Press, Toronto.
- BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- BIELY, P., D. MISLOVICAVA et R. TARAN. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanases and endo-1,4-glucanases. *Anal. Biochem.* **144**: 142-146.
- BRILLOUET, J.M. et J.C. MOULIN. 1985. Production, purification and properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*. *Carbohydr. Res.* **144**: 113-126.
- CHEN, C.S., Y.F. CHEN et A. YEH. 1993. Activities and some properties of glycosidases from germinating mung beans. *J. Chin. Biochem. Soc.* **22**: 1-8.
- COUGHLAN, M.P. et G.P. HAZLEWOOD. 1993.  $\beta$ -1,4-D-xylan degrading enzyme systems; Biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 259-289.
- DEKKER, R.F.H. et G.N. RICHARDS. 1979. Hemicellulases; Their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-292.

- ERICKSSON, K.E.L., R.A.BLANCHETTE et A. PAUL. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Toronto.
- FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., J.L. PENA, F. PINAGA et S. VALLES. 1994.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Letters **115**: 107-112.
- FILHO, E.X.F., J. PULS et M.P. COUGHLAN. 1995. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 168-173.
- GILEAD, S. et Y. SHOHAM. 1995. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T 6. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 170-174.
- GRABSKI, A.C. et T.W. JEFFRIES. 1991. Production, purification and characterization of a  $\beta$ -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 987-992.
- GREVE, L.C., J.M. LABAVITCH et R.E. HUNGATE. 1984.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8; Purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. Appl. Environ. Microbiol. **47**: 1135-1140.
- GUNATA, Z., J.M. BRILLOUET, S. VOIRIN, R. BAUMES et R. CORDONNIER. 1990. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, action of grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. J. Agric. Food Chem. **38**:

772-776.

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

HATA, K., M. TANAKA, Y. TSUMURAYA et Y. HASHIMOTO. 1992.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from radish (*Raphanus sativus*) seeds. Plant Physiol. **100**: 388-396.

HATANAKA, H., H. IMAOKA, S. TAJIMA et T. KASAI. 1991. Purification and properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from cotyledons of soybeans seedlings.

Agric. Biol. Chem. **55**:2599-2605.

HESPELL, R.B. et P.J. O'BRYAN. 1992. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS 113. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1082-1088.

HIRANO, Y., Y. TSUMURAYA et Y. HASHIMOTO. 1994. Characterization of spinach leaf  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and  $\beta$ -galactosidases and their synergistic action on an endogenous arabinogalactan-protein. Physiol. Plant. **92**: 286-296.

HOPWOOD, D.A., J.M. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WOOD et H. SCHREMPF. 1988. Genetic manipulation of *Streptomyces*. Norwich, The John Innes Foundation.

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

- KAJI, A. 1984. L-arabinosidases. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **42**: 383-394.
- KAJI, A. et K. TAGAWA. 1970. Purification, crystallisation and amino acid composition of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta* **207**: 456-464.
- KAJI, A. et O. YOSHIHARA. 1970. Properties of purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfii*. *Biochem. Biophys. Acta* **250**: 367-371.
- KAJI, A., M. SATO et Y. TSUTSUI. 1981. An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. no.17-1. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 925-931.
- KANEKO, S., M. SANO et I. KUSAKABE. 1994. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3425-3428.
- KARIMI, S. et O.P. WARD. 1988. Comparative study of some microbial arabinan-degrading enzymes. *J. Indust. Microbiol.* **4**: 173-180.
- KATZ, E., C.J. THOMPSON et D.A. HOPWOOD. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-2714.
- KELLETT, L.E., D.M. POOLE., L.M.A. FERREIRA, A.J. DURRANT, G.P. HAZLEWOOD et H.J. GILBERT. 1990. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochem J.* **272**: 369-376.

- KIESER, T. 1984. Factors affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.
- KLUEPFEL, D., S. VATS-METHA, F. AUMONT, F. SHARECK, et R. MOROSOLI. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.* **267**: 45-50.
- KLUEPFEL, D., N. DAIGNEAULT, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1992. Cloning and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 626-631.
- KOMAE, K., A. KAJI et M. SATO. 1982. An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1899-1905.
- KORMELINK, F.J.M., M.J.F. SEARLE-VAN LEEUWEN, T.M. WOOD et A.G.J. VORAGEN. 1991. Purification and characterization of a (1,4)- $\beta$ -D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 753-758.
- LABORDA, F., A.H. FIELDING et R.J.W. BYRDE. 1973. Extra- and intra-cellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Sclerotinia fructigena*. *J. Gen. Microbiol.* **79**: 321-329.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. *Nature* **227**: 680-685.
- LEE, S.F. et C.W. FORSBERG. 1987. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Can. J. Microbiol.* **33**: 1011-1016.

- LEVER, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* **47**: 273-279.
- LOWRY, O.H., W.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- MANDELS, M. et E.T. REESE. 1957. Production of cellulase in *Trichoderma reesei* is influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.* **73**: 269-278.
- MANIN, C., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1994. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem. J.* **302**: 443-449.
- MATHESON, N.K. et H.S. SAINI. 1977.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-galactosidases in germinating lupini cotyledons. *Carbohydr. Res.* **57**: 103-116.
- MATTE, A. et W. FORSBERG. 1992. Purification, characterization and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S 85. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 157-168.
- MacFARLANE, G.T., S. HAY, S. MacFARLANE et G.R. GIBSON. 1990. Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glycosidase production by *Bacteroides ovatus*, in batch and continuous culture. *J. Appl. Biotechnol.* **68**: 179-187.
- MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* **49**: 323-329.
- MOROSOLI, R., J-L. BERTRAND, F. MONDOU, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem J.*

239: 587-592.

POUTANEN, K. 1988. An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 7: 271-282.

ROCHE, N., P. BERNA, C. DESGRANGES et A. DURAND. 1995. Substrate use and production of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase during solid-state culture of *Trichoderma reesei* on sugar beet pulp. Enz. Microb. Techn. 17: 935-941.

RODIONOVA, N.A., I.M. TAVOBILOV et A.M. BEZBORODOV. 1983.  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus niger* 15: Purification and characterization. J. Appl. Biochem. 5: 300-312.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHWARZ, W.H., H. ADELSBERGER, S. JAURIS, C. HERTEL, B. FUNK et W.L. STAUDENBAUER. 1990. Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase,  $\beta$ -D-xylosidase, and alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 170: 368-374.

SCHWARZ, W.H., K. BRONNENMEIER, B. KRAUSE, F. LOTTSPEICH et W.L. STAUDENBAUER. 1995. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 856-860.



- SCHYNS, P.J.Y.M.J, J. De FRANKNIKER, A.J.B. ZEHNDER. et A.J.M. STRAUSS. 1994. Production, purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 548-554.
- SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI, et D. KLUEPFEL. 1991. Nucleotide sequence of the xylanase A, B and C genes of *Streptomyces lividans*. Gene **107**: 75-82.
- TAGAWA, K. et A. KAJI. 1988.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Methods Enzymol. **160**: 707-712.
- TAJANA, E., A. FIECHTER et W. ZIMMERMANN. 1992. Purification and characterization of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1447-1450.
- TANAKA, M. et T. UCHIDA. 1978. Purification and properties of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from plant *Scopolia japonica* calluses. Biochem. Biophys. Acta **522**: 531-540.
- TANAKA, Y. TSUMURAYA et Y. HASHIMOTO. 1992.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from radish (*Raphanus sativus*) seeds. Plant Physiol. **100**: 388-396.
- THEBERGE, M., P. LACAZE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 815-820.
- TOWBIN, H., T. STAEBELIN et J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamides gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.

UCHIDA, T. et M. TANAKA. 1988.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Scopolia japonica*.  
Methods Enzymol. **160**: 712-719.

UESAKA, E., M. SATO, M. RAIJU et A. KAJI. 1978.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from  
*Rhodotorula flava*. J. Bacteriol. **133**: 1073-1077.

UTT, E.A., C.K. EDDY, K.F. KESHAU et L.O. INGRAM. 1991. Sequencing and  
expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB gene encoding a novel bifunctional protein  
with  $\beta$ -D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol.  
**57**: 1227-1234.

VATS-MEHTA, S., P. BOUVRETTE, F. SHARECK, R. MOROSOLI, et D.  
KLUEPFEL. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans*  
66. Gene **86**: 119-122.

WARD, O.P. et M. MOO-YOUNG. 1989. Enzymatic degradation of cell wall and related  
plant polysaccharides. Crit. Rev. Biotechnol. **8**: 237-264.

WEBB, E.C. Ed. 1984. Enzyme nomenclature. IUBMB. Academic Press. Toronto,  
Canada.

WEINSTEIN, L. et P. ALBERSHEIM. 1979. Structure of plant cell wall. IX.  
Characterization and partial purification of a wall-degrading endo-arabanase and a  
arabinosidase from *Bacillus subtilis*. Plant Physiol. **63**:425-432.

WITTMANN, S., F. SHARECK, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1994. Purification  
and characterization of a second endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA

sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1701-1703.