



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
À LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

MARTIN ROBERGE

ÉTUDE STRUCTURE/FONCTION  
DE LA XYLANASE A DE *STREPTOMYCES LIVIDANS*

OCTOBRE 1994

---

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX . . . . .	vii
LISTE DES FIGURES . . . . .	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS . . . . .	x
SOMMAIRE . . . . .	xii
INTRODUCTION . . . . .	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . . . . .	3
1.0 LES STREPTOMYCÈTES . . . . .	3
2.0 LE XYLANE . . . . .	4
3.0 LES XYLANASES . . . . .	5
3.1 Provenance . . . . .	5
3.2 Caractéristiques biochimiques . . . . .	7
3.3 Substrats des xylanases . . . . .	8
4.0 CLASSIFICATION . . . . .	9
4.1 Selon le mode d'action . . . . .	9
4.2 Selon les propriétés physico-chimiques . . . . .	11
4.3 Selon les comparaisons de séquences en acides aminés . . . . .	12
5.0 STRUCTURE DES XYLANASES . . . . .	16
5.1 Comparaison des structures primaires . . . . .	16
5.2 Organisation en domaines . . . . .	16
5.2.1 Domaine catalytique . . . . .	16
5.2.2 Domaine de liaison au substrat . . . . .	18
5.2.3 Séquences de jonction . . . . .	19
5.2.4 Autre domaine chez les xylanases . . . . .	20
5.3 Cristallographie et structure tridimensionnelle . . . . .	20
6.0 MODE D'ACTION . . . . .	22
6.1 Identification des acides aminés impliqués dans la catalyse . . . . .	22
6.1.1 Par modifications chimiques . . . . .	24
6.1.2 Par mutagénèse . . . . .	25

6.2	Stéréochimie de la réaction . . . . .	29
6.3	Mécanisme proposé . . . . .	30
6.4	Spécificité de substrat . . . . .	33
6.5	Activité transférase . . . . .	34
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .	35
1.0	SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES . . . . .	35
1.1	<i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	35
1.2	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	35
2.0	PLASMIDES UTILISÉS . . . . .	36
2.1	<i>S. lividans</i> . . . . .	36
2.2	<i>E. coli</i> . . . . .	37
3.0	CONSERVATION DES SOUCHES . . . . .	37
3.1	<i>S. lividans</i> . . . . .	37
3.2	<i>E. coli</i> . . . . .	38
4.0	CONDITIONS DE CULTURE . . . . .	39
4.1	De <i>S. lividans</i> . . . . .	39
4.1.1	Milieux liquides . . . . .	39
4.1.2	Milieux solides . . . . .	39
4.2	De <i>E. coli</i> . . . . .	40
4.2.1	Milieu liquide . . . . .	40
4.2.2	Milieux solides . . . . .	41
5.0	MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES DES SOUCHES . . . . .	41
5.1	<i>S. lividans</i> . . . . .	41
5.1.1	Protoplastes et transformation . . . . .	41
5.1.2	Isolement de plasmides et digestion avec enzymes de restriction . . . . .	42
5.2	<i>E. coli</i> . . . . .	43
5.2.1	Transformation . . . . .	43
5.2.2	Isolement de plasmides . . . . .	43
6.0	SOUS-CLONAGE DES GÈNES DE <i>E. COLI</i> À <i>S. LIVIDANS</i> . . . . .	44
7.0	CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS . . . . .	47
7.1	Criblage selon l'activité enzymatique . . . . .	47
7.2	Criblage par isolement de plasmides . . . . .	47
7.3	Criblage par hybridation de colonies . . . . .	48

8.0	SÉQUENÇAGE DES GÈNES	49
8.1	Sous-clonage dans M13	49
8.2	Transfection	50
8.3	Production et purification de l'ADN simple brin	50
8.4	Protection à la nucléase S1	51
8.5	Séquençage du gène de la xylanase A	52
9.0	PRODUCTION DE L'ENZYME	52
9.1	Conditions de culture	52
	9.1.1 <i>S. lividans</i>	52
	9.1.2 <i>E.coli</i>	53
9.2	Récupération de l'enzyme	53
	9.2.1 <i>S. lividans</i>	53
	9.2.2 <i>E.coli</i>	54
10.0	DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	55
10.1	Tests quantitatifs	55
	10.1.1 Sucres réducteurs	55
	10.1.2 Hydrolyse du PNPC	56
10.2	Test qualitatif	56
11.0	PURIFICATION DES ENZYMES	57
11.1	Dialyse	57
11.2	Échangeurs d'ions	57
11.3	Tamis moléculaire	59
12.0	ANALYSE DES PROTÉINES	60
12.1	Dosage des protéines	60
12.2	SDS-PAGE	62
12.3	Détermination du point isoélectrique	62
12.4	Immunobuvardage	63
13.0	CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE	64
13.1	Détermination du pH optimal	64
13.2	Détermination de la température optimale	64
13.3	Thermostabilité en présence de substrat	64
13.4	Thermostabilité en absence de substrat	65
13.5	Détermination des paramètres cinétiques	65
14.0	DÉTERMINATION DU MODE D'HYDROLYSE	66
14.1	Profil d'hydrolyse sur HPLC	66
14.2	Détermination de la fréquence de clivage du xylopentaose	67

14.2.1	Purification des oligoxylosides tritiés . . . . .	67
14.2.2	Détermination de la fréquence de clivage du xylopentaose . . . . .	68
III.	RÉSULTATS . . . . .	70
1.0	SOUS-CLONAGE DES GÈNES . . . . .	70
2.0	PRODUCTION DES ENZYMES . . . . .	74
3.0	SÉQUENÇAGE DES GÈNES . . . . .	76
4.0	PURIFICATION DES ENZYMES MODIFIÉES . . . . .	77
5.0	CARACTÉRISATION . . . . .	81
5.1	Activité spécifique . . . . .	81
5.2	Caractéristiques physico-chimiques . . . . .	83
5.3	Température optimale . . . . .	86
5.4	pH optimal . . . . .	86
5.5	Thermostabilité . . . . .	89
5.6	Paramètres cinétiques . . . . .	89
5.7	Profils d'hydrolyse . . . . .	92
5.8	Fréquence de clivage . . . . .	94
5.8.1	Purification des oligoxylosides tritiés . . . . .	94
5.8.2	Fréquence de clivage du xylopentaose . . . . .	95
IV.	DISCUSSION . . . . .	98
1.0	SOUS-CLONAGE DES GÈNES ET PRODUCTION D'ENZYMES . . . . .	98
2.0	CARACTÉRISTIQUES DES MUTANTS . . . . .	99
2.1	Température optimale . . . . .	99
2.2	pH optimal . . . . .	100
2.3	Thermostabilité . . . . .	100
2.4	Paramètres cinétiques . . . . .	101
3.0	PROFILS D'HYDROLYSE ET FRÉQUENCE DE CLIVAGE DU XYLOPENTAOSE . . . . .	104
4.0	STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE . . . . .	105
5.0	MUTANT D50N . . . . .	107

6.0	MUTANT W85H .....	108
7.0	MUTANT N127D .....	109
8.0	MUTANTS E128Q ET E236Q .....	110
9.0	MUTANT T235Y .....	111
10.0	MUTANT D270N .....	112
V.	CONCLUSION .....	114
	REMERCIEMENTS .....	118
	BIBLIOGRAPHIE .....	119

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Les deux familles de xylanases . . . . .	14
Tableau 2:	Liste des xylanases cristallisées à ce jour. . . . .	23
Tableau 3:	Liste des plasmides contenant le gène de la xylanase A muté (Moreau 1993). . . . .	38
Tableau 4:	Programme d'élution de la xylanase A sur la colonne AP2 DEAE 15 HR. . . . .	58
Tableau 5:	Liste des plasmides dérivés de pAM19.1 contenant les gènes mutants de la xylanase A de <i>S. lividans</i> . . . . .	71
Tableau 6:	Liste des souches exprimant un dérivé du plasmide pIAF18 contenant un gène muté de la xylanase A de <i>S. lividans</i> . . . . .	74
Tableau 7:	Activité enzymatique déterminée par la méthode des sucres réducteurs sur les surnageants de culture des différentes souches à différents temps et températures d'incubation dans le milieu 14, contenant 1% xylose. . . . .	75
Tableau 8:	Comparaison de l'activité spécifique des surnageants de cultures et du rendement en poudre brute des différentes xylanases. . . . .	76
Tableau 9:	Tableau de purification des mutants de la xylanase A. . . . .	79
Tableau 10:	Activité spécifique des enzymes mutantes purifiées, en utilisant le xylane de bouleau comme substrat. . . . .	82
Tableau 11:	Comparaison des constantes cinétiques des mutants de la xylanase A de <i>S. lividans</i> , déterminées avec du xylane de bouleau, à celles de l'enzyme de type sauvage. . . . .	92



## LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Schéma du xylane et de ses sites d'attaque par les enzymes hydrolytiques. . . . .	6
Figure 2:	Comparaison des séquences primaires de dix xylanases de la famille F. . . . .	17
Figure 3:	Mécanisme de déplacement double impliquant une rétention de la configuration du carbone anomérique. . . . .	31
Figure 4:	Mécanisme de déplacement simple impliquant l'inversion de la configuration du carbone anomérique . . . . .	32
Figure 5:	Sous-clonage des gènes mutants de la xylanase A de <i>E.coli</i> à <i>S. lividans</i> . . . . .	46
Figure 6:	Résumé des étapes de purification de la xylanase A de <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	61
Figure 7:	Autoradiogramme de l'hybridation de colonies des transformants de la souche de <i>S. lividans</i> IAF10-164 transformée dans le cas du mutant E236Q. . . . .	73
Figure 8:	Profils d'élution typiques de la xylanase A par HPLC sur DEAE suivie d'un tamis moléculaire. . . . .	78
Figure 9:	SDS-PAGE de chacune des étapes de purification du mutant N127D, coloré au nitrate d'argent. . . . .	84
Figure 10:	Immunobuvardage des protéines mutantes de la xylanase A purifiées. . . . .	84
Figure 11:	Spectres de fluorométrie différentielle de la xylanase A et des mutants E128Q et E236Q à une émission de 295 nm. . . . .	85
Figure 12:	Détermination de la température optimale d'hydrolyse du xylane de bouleau à pH 6,0. . . . .	87
Figure 13:	Détermination du pH optimal d'hydrolyse du xylane de bouleau à 60°C. . . . .	88

Figure 14:	Thermostabilité des xylanases à 60°C en présence de xylane de bouleau 5% à pH 6,0. . . . .	90
Figure 15:	Thermostabilité des xylanases à 60°C en absence de substrat à pH 6,0. . . . .	91
Figure 16:	Profils d'hydrolyse du xylopentaose par la xylanase A et les mutants D50N, W85H et N127D. . . . .	93
Figure 17:	Autoradiogrammes de la chromatographie sur couche mince du mélange d'oligoxylosides tritiés et de la deuxième migration du <sup>3</sup> H-xylopentaose. . . . .	96
Figure 18:	Fréquence de clivage (%) du xylopentaose par la xylanase A et certains mutants. . . . .	97
Figure 19:	Structure ( $\alpha/B$ ) <sub>8</sub> de la xylanase A de <i>S. lividans</i> ressemblant à un saladier. . . . .	106

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide déoxyribonucléique
ala, A	alanine
amp	ampicilline
arg, R	arginine
ARN	acide ribonucléique
asn, N	asparagine
asp, D	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
ccm	chromatographie sur couche mince
cys, C	cystéine
°C	degré Celsius
DEAE	diéthylaminoéthyle
DNS	acide dinitrosalicylique
DMF	diméthylsulfoxyde
D.O.	densité optique
EC	enzyme classification
EDTA	éthylènediaminetetraacétate
g	unité gravitationnelle
gln, Q	glutamine
glu, E	acide glutamique
gly, G	glycine
h	heure(s)
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
his, H	histidine
ile, I	isoleucine
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
kpb	kilo paires de bases
kDa	kilodalton(s)
leu, L	leucine
lys, K	lysine
M	molarité
met, M	méthionine
$\mu$ g	microgramme(s)
$\mu$ L	microlitre(s)
$\mu$ mole	micromole(s)
mg	milligramme(s)
min	minute(s)
mL	millilitre(s)

mM	millimolaire
nm	nanomètre(s)
NTG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PEG	polyéthylène glycol
phe, F	phénylalanine
pI	point isoélectrique
P.M.	poids moléculaire
PNPC	<i>para</i> -nitrophénol- $\beta$ -D-cellobioside
pro, P	proline
RBB	remazol bleu brillant
rpm	révolutions par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
s	seconde(s)
ser, S	sérine
SSC	citrate de sodium salin
TAE	tris-acétate-EDTA
TE	tris-HCl-EDTA
TES	acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique
thr, T	thréonine
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminométhane
trp, W	tryptophane
TSB	bouillon tryptone de soya
tyr, Y	tyrosine
UV	ultra-violet
val, V	valine
v/v	volume/volume
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## SOMMAIRE

Le xylane est l'un des principaux constituants de la paroi cellulaire des plantes. Il est composé d'une chaîne principale d'unités xylose liées entre elles par des liens  $\beta$ -1,4. La provenance du xylane influence la nature ainsi que la fréquence des substituants retrouvés le long du polymère, faisant du xylane un substrat complexe et très hétérogène. Les xylanases ont un potentiel industriel très élevé, entre autres, leur utilisation dans le blanchiment des pâtes à papier permettrait de diminuer grandement la charge polluante de cette industrie.

Les xylanases sont classées en deux familles (F et G) selon leur séquence en acides aminés (Henrissat *et al.*, 1989). La bactérie *Streptomyces lividans* sécrète trois xylanases différentes dont la xylanase A, qui fait partie de la famille F. Pour mieux connaître le mécanisme d'action de ce type d'enzyme, certains acides aminés, conservés parmi les xylanases de la famille F, ont été modifiés par mutagénèse dirigée (Moreau, 1993).

Le but de cette étude est de produire des protéines mutantes en grande quantité chez *S. lividans* et de les purifier pour permettre leur caractérisation biochimique. Les gènes codant pour les protéines mutantes, D50N, W85H, N127D, E128Q, R156E, T235Y, E236Q et D270N ont tous été sous-clonés chez *S. lividans* pour permettre la production ainsi que la purification des enzymes. La caractérisation des enzymes consistait en l'étude des optimums de leurs températures et pH d'hydrolyse, de leurs paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) ainsi que de leur mode d'hydrolyse. Les résultats ont permis de montrer

qu'aucune des mutations analysées n'affectait le mode d'action de l'enzyme au niveau du profil d'hydrolyse du xylane et du xylopentaose ainsi que dans la fréquence de clivage du xylopentaose. Aucune des mutations n'a affecté l'affinité de l'enzyme envers le xylane de bouleau, car les  $K_m$  n'ont pas été modifiés. Chez le mutant D50N, on observe une baisse de thermostabilité importante de l'enzyme ainsi qu'une baisse d'activité spécifique de 27% par rapport à l'enzyme de type sauvage. L'activité spécifique de la xylanase A-W85H représente 20% de celle de l'enzyme sauvage. Cette mutation a également diminué la thermostabilité de l'enzyme et augmenté la température optimale d'hydrolyse de 5°C. La mutation N127D a également augmenté la température optimale de 10°C. L'importance de cet acide aminé est démontrée par une baisse de 98% de l'activité spécifique lorsque l'asparagine est remplacée par un acide aspartique. Le remplacement des acides glutamiques en positions 128 et 236 par des glutamines a eu pour effet de diminuer l'activité enzymatique d'un facteur de 250 et 500, respectivement. L'analyse structurale de ces deux mutants négatifs a permis de les proposer comme résidus catalytiques essentiels de la xylanase A de *S. lividans* (Moreau *et al.*, 1994c). Les mutations T235Y et D270N ont eu pour effet de diminuer l'activité spécifique de l'enzyme de 42 et 61%, respectivement.

La détermination de la structure tridimensionnelle de l'enzyme à 2,6 Å (Derewenda *et al.*, 1994) a permis de confirmer le rôle des différents acides aminés en les situant par rapport au site catalytique de l'enzyme. Grâce à la structure, d'autres mutants pourront être analysés pour permettre une meilleure compréhension des xylanases.

## INTRODUCTION

Le xylane est un des principaux constituants de la paroi cellulaire des plantes. C'est donc une des sources de carbone renouvelables les plus abondantes sur terre. Le xylane est composé d'une chaîne principale d'unités de xylose liées entre elles par des liens  $\beta$ -1,4. Les variations entre les types de xylane se situent au niveau des substituants retrouvés le long de cette chaîne. Les xylanases (E.C. 3.2.1.8) sont les enzymes qui hydrolysent le xylane. À ce jour, il y a une soixantaine de xylanases connues provenant de bactéries et de champignons. Les xylanases ont trouvé plusieurs utilisations industrielles, entre autres, leur utilisation dans l'industrie du blanchiment de la pâte à papier permettrait de diminuer l'utilisation des produits chlorés qui sont les principaux polluants de cette industrie. Pour que l'utilisation des xylanases en industrie soit la plus efficace possible, la connaissance du mécanisme d'action et des propriétés de ces enzymes est primordiale.

En se basant sur des comparaisons de leurs structures primaires et de leurs séquences hydrophobes, les xylanases ont été regroupées en deux familles (familles F et G, Gilkes *et al.*, 1991 ou familles 10 et 11, Henrissat *et al.*, 1991). La xylanase A de *Streptomyces lividans* fait partie des familles 10 et F. Il y a relativement peu d'informations sur le mode d'action de ces enzymes. La caractérisation moléculaire de la xylanase A devient donc essentielle pour permettre une meilleure compréhension de ce type d'enzyme.

Il existe plusieurs façons de déterminer le mécanisme d'action d'une enzyme. Une de celles-ci réside dans l'identification du rôle des acides aminés dans le mode d'action de la protéine. Il est possible d'identifier les résidus importants à l'aide de la comparaison des séquences en acides aminés des xylanases d'une même famille. Ensuite, la modification de ces résidus par mutagenèse dirigée permet de démontrer l'implication des acides aminés dans la catalyse enzymatique. Ces travaux seront éventuellement appuyés par la structure tridimensionnelle de l'enzyme.



## I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.0 LES STREPTOMYCÈTES

Le genre *Streptomyces* fait partie de la famille des Streptomyceteaceae appartenant à l'ordre des Actinomycètes. En 1992, 45 espèces différentes de *Streptomyces* avaient été identifiées selon leurs propriétés biochimiques, microbiologiques et physiologiques (Gusek et Kinsella, 1992). Ce sont des bactéries Gram-positif, aérobies, retrouvées dans le sol. Les streptomycètes sont non pathogènes (GRAS: "generally recognized as safe") pour l'homme et les animaux, sauf peut-être *S. somaliensis*. Par ailleurs, *S. scabies* a été reconnu comme pathogène chez la plante (Gusek et Kinsella, 1992). Les streptomycètes possèdent des particularités au niveau de leur production de métabolites secondaires ainsi que dans leur grande capacité de sécrétion. Plus de 60% des 6000 antibiotiques microbiens proviennent du genre *Streptomyces* (Gusek et Kinsella, 1992).

*Streptomyces lividans* est un hôte de plus en plus populaire pour le clonage d'ADN provenant de différentes espèces. *S. lividans* possède plusieurs avantages dont la possibilité de sécréter des protéines hétérologues (Gilbert *et al.*, accepté pour publication). Cet organisme reconnaît aussi un grand nombre de promoteurs et possède la qualité non négligeable de ne sécréter qu'une faible quantité de protéases. Il semble également que *S. lividans* ne produise pas d'endonucléase de restriction (Gusek et Kinsella, 1992).

## 2.0 LE XYLANE

La paroi cellulaire des plantes est constituée de trois principaux polysaccharides: la cellulose, formée d'une chaîne de  $\beta$ -1,4 glucose, l'hémicellulose incluant les glucanes, mannanes et xylanes ainsi que la lignine, structure complexe formée de différents composés phénoliques. Le xylane est l'hémicellulose retrouvée majoritairement dans les parois cellulaires des plantes. Il peut représenter, dans le cas des angiospermes, de 15 à 30% du poids sec de la plante (Whistler et Richards, 1970). Dans la majorité des cas, la chaîne principale du xylane est substituée. Les substituants les plus communs du xylane sont: les acétyles dans le bois dur, les arabinosyles dans le bois mou, ainsi que les glucuronosyles (Timell, 1967). La composition et la fréquence des substituants de la chaîne principale de xylose dépendent surtout de la source de xylane. Il est par contre possible que des artéfacts, causés par la méthode d'isolement, provoquent des variations au niveau des substituants du xylane. Chez les plantes, le xylane forme l'interface entre la lignine et la cellulose et est lié de façon covalente à la lignine par ses résidus arabinosyles et glucuronosyles (Wong *et al.*, 1988).

L'hydrolyse de l'hémicellulose peut conduire à la production d'éthanol, de protéines d'origine unicellulaire, de solvants et de produits chimiques en utilisant différents microorganismes fermenteurs (Wong *et al.*, 1988). Il existe d'autres applications, notamment dans le blanchiment de la pâte à papier, pour diminuer et même remplacer

l'utilisation de chlore. Également, l'hydrolyse partielle de l'hémicellulose pourrait conduire à l'augmentation de la valeur nutritive de certains aliments d'origine végétale destinés à l'alimentation animale en augmentant la disponibilité de la cellulose. La libération des fibres de cellulose des tiges de palmiers grâce à l'action des xylanases, permettrait aussi la fabrication de jute. Certaines xylanases bien caractérisées pourraient aussi être utilisées dans la production d'oligoxylosides pouvant servir en laboratoire ou bien dans la caractérisation de parois cellulaires de plantes et dans la production de protoplastes de cellules végétales.

Étant donné la structure complexe du xylane, diverses enzymes sont nécessaires pour réussir à le dégrader complètement. Parmi ces enzymes, on retrouve différents types de xylanases, des  $\beta$ -xylosidases ainsi que toute la gamme des enzymes débranchantes (Figure 1).

### 3.0 LES XYLANASES

#### 3.1 Provenance

Les xylanases sont des  $\beta$ -1,4-D-xylane xylanohydrolases (EC 3.2.1.8). Plusieurs xylanases, isolées de différents microorganismes, ont été caractérisées à ce jour. Ces xylanases proviennent de bactéries et de champignons. Les genres de bactéries rencontrés



le plus souvent sont: *Bacillus*, *Clostridium* et *Streptomyces*, mais des xylanases ont été isolées chez au moins 18 différents genres bactériens. Chez les champignons, les genres *Trichoderma* et *Cryptococcus* sont les plus communs. Les microorganismes qui produisent des xylanases sont retrouvés là où la biomasse végétale est dégradée, c'est-à-dire surtout dans le sol et dans le rumen des bovins. Étant donnée l'hétérogénéité du xylane dans la nature, on retrouve souvent plusieurs xylanases produites par un même organisme (Wong *et al.*, 1988). La multiplicité des xylanases chez un même organisme est un phénomène difficile à expliquer. Wong *et al.* (1988), dans un article de revue, proposent qu'un tel système de xylanases pourrait permettre d'obtenir un degré d'hydrolyse du xylane plus élevé.

### 3.2 Caractéristiques biochimiques

En majorité, les xylanases caractérisées ont des masses moléculaires variant de 20 à 50 kDa. Il y a quelques exceptions, comme la xylanase de *Ruminococcus albus* ayant une masse moléculaire de 720 kDa (Greve *et al.*, 1984). D'autre part, la xylanase II de *Chaetomium thermophile var. coprophile* (Ganju *et al.*, 1989) et la xylanase de *Gliocladium virens* (Woodward *et al.*, 1981), deux xylanases de champignons, ont chacune une masse moléculaire de 7 kDa. Il existe une relation entre le point isoélectrique des xylanases et leur masse moléculaire permettant ainsi de classer ces enzymes (Wong *et al.*, 1988, section 4.2).

Les températures et pH optimaux de ces enzymes varient énormément entre les différents organismes. Par exemple, la xylanase de la bactérie thermophile *Thermotoga* espèce FjSS3-B1 a une activité maximale à 105°C (Simpson *et al.*, 1991). Il existe également certaines souches alcalophiles de *Bacillus* produisant des xylanases ayant des pH optimaux de 6 à 10 (Nakamura *et al.*, 1993 et Honda *et al.*, 1985). D'un autre côté, la xylanase II de *Robillarda* espèce Y-20 a une activité optimale à pH 3,5 (Koyama *et al.*, 1990), mais en général, le pH optimal des xylanases est compris entre 5 et 7. Les valeurs de température et de pH optimaux sont très importantes du point de vue industriel, car au niveau de l'industrie des pâtes et papiers, la xylanase idéale serait stable et fonctionnelle à haute température et à pH alcalin.

Les constantes cinétiques des xylanases sont très variables et difficilement comparables puisque les conditions expérimentales et les préparations des substrats sont différentes d'un laboratoire à l'autre.

### 3.3 Substrats des xylanases

Les xylanases sont des enzymes qui hydrolysent le xylane provenant de n'importe quelle origine végétale. A partir du xylane, il est possible de faire une hydrolyse partielle en utilisant une xylanase bien caractérisée pour ainsi isoler et purifier des oligoxylosides de degrés de polymérisation variables par chromatographie sur couche mince (ccm) (Klaus

et Fisher, 1988) ou par chromatographie en phase liquide (Manin *et al.*, 1994). Ces substrats de tailles définies et dont le nombre, la nature et l'emplacement des substituants peuvent être connus, permettraient de faciliter l'interprétation des résultats de la caractérisation enzymatique.

Il existe aussi des substrats synthétiques dont l'hydrolyse est facilement détectable par spectrophotométrie. On retrouve surtout les aryle- $\beta$ -glycosides et les 4-méthylumbelliferyle- $\beta$ -glycosides. Le xylane peut également être couplé directement à des colorants comme le Remazol-Bleu-Brillant (RBB). Une zone d'hydrolyse peut également être visualisée dans un milieu contenant du xylane à l'aide d'une coloration au rouge de Congo qui colore les polysaccharides non-hydrolysés seulement. L'utilité de ces substrats est résumée par Biely *et al.* (1992).

## 4.0 CLASSIFICATION

### 4.1 Selon le mode d'action

Étant donnée la découverte d'un nombre croissant de xylanases de différents organismes, Reilly (1981) a tenté de classer ces enzymes. En même temps, il se trouvait à classer les glycanases en général selon leur mode d'hydrolyse. Les xylanases hydrolysent le xylane qui est un substrat très hétérogène pouvant être soit très long, soit

très court (xylobiose), et plus ou moins substitué par différents groupements. Donc, même aujourd'hui, il n'existe pas de substrat simple et bien défini nous permettant de caractériser les xylanases. Reilly a donc tenté de classifier les xylanases selon leur mode d'action. Il les a divisé en trois grandes classes: les  $\beta$ -xylosidases, les exo-xylanases et les endo-xylanases.

Les  $\beta$ -xylosidases hydrolysent les petits oligoxylosides en xylose. Elles procèdent avec rétention de configuration du carbone anomérique, c'est-à-dire le carbone en position 1 dans la molécule de xylose, car ses quatre substituants sont différents. Selon Reilly, les  $\beta$ -xylosidases n'ont pas d'activité transglycosylase leur permettant d'assembler deux oligoxylosides pour former une molécule de plus grande taille. Aujourd'hui, certaines  $\beta$ -xylosidases, dont celle de *Neurospora crassa* (Deshpande *et al.*, 1986) ont une activité transférase. Ces enzymes seraient donc les dernières impliquées dans la dégradation du xylane. Le xylose et le xylobiose ainsi formés pourraient ensuite être transportés dans la cellule où ils seraient métabolisés.

Les exo-xylanases hydrolysent très rapidement le xylane en xylobiose et xylose, cependant, elles sont moins actives sur des petits oligoxylosides. Ces enzymes n'ont que peu ou pas d'activité transglycosylase et procèdent par inversion de la configuration du carbone anomérique.



Les endo-xylanases hydrolysent le xylane en oligoxylosides de tailles intermédiaires. Elles sont subdivisées en quatre groupes à savoir si elles produisent ou non du xylobiose et du xylotriose et si elles hydrolysent au niveau des embranchements. Les endo-xylanases utilisent également un mécanisme de transglycosylation.

#### 4.2 Selon les propriétés physico-chimiques

Dans une revue sur la multiplicité des xylanases, Wong *et al.* (1988), ont constaté qu'il y avait un lien entre le poids moléculaire et le point isoélectrique des xylanases. Contrairement à celle de Reilly (1981), cette classification faisait exclusivement appel aux propriétés physico-chimiques des protéines. Il y a donc deux types de xylanases: celles de faible masse moléculaire ayant un point isoélectrique alcalin et un deuxième type ayant une masse moléculaire élevée et un point isoélectrique acide (Tableau 1). Les xylanases de *Streptomyces lividans* sont partagées dans ces deux groupes, la xylanase A faisant partie des enzymes acides (pI de 5,2) de haute masse moléculaire (43 kDa, Morosoli *et al.*, 1986), tandis que les xylanases B et C ont une masse moléculaire faible (31 kDa et 22 kDa, respectivement) et un point isoélectrique basique (8,4 et > 10,25 respectivement) (Kluepfel *et al.*, 1990 et Kluepfel *et al.*, 1992).

#### 4.3 Selon les comparaisons de séquences en acides aminés

Il existe deux écoles de pensée sur la classification des glycosyle hydrolases. La première divise les enzymes selon leur séquence en acides aminés et la deuxième les sépare selon leur séquence d'hydrophobicité. Ces deux classifications sont très semblables.

D'un côté, Henrissat *et al.* en 1989, divisaient les cellulases en 6 familles (A à F) en se basant sur des comparaisons des séquences en acides aminés des domaines catalytiques de 21  $\beta$ -glycanases et en utilisant aussi l'analyse de l'hydrophobicité des séquences primaires ("hydrophobic cluster analysis ou HCA"). Selon ces auteurs, la famille F était constituée de glycanases non spécifiques, c'est pourquoi on pouvait y retrouver les deux seules xylanases classifiées: une partie de la séquence de la Xyn de *Cryptococcus albidus* (Morosoli et Durand, 1988) et Xyn Z de *Clostridium thermocellum* (Grépinet *et al.*, 1988).

Par la suite, Béguin (1990) ajoute quelques enzymes à cette liste dont deux xylanases classifiées dans la famille F. A cette époque, les xylanases semblaient se retrouver toutes dans une même famille. On y retrouve également l'exoglucanase/xylanase Cex de *Cellulomonas fimi* (O'Neill *et al.*, 1986) et la partie N-terminale de la cellobiosidase EGB de *Caldocellum saccharolyticum* (Saul *et al.*, 1989). Il ajoute

également une famille nommée BG comprenant quelques  $\beta$ -glucosidases.

Gilkes *et al.* (1991) ajoutent trois familles nouvelles dont la famille G formée de quatre xylanases: Xyn de *Bacillus circulans* (Yang *et al.*, 1988), Xyn A de *Bacillus pumilus* (Fukusaki *et al.*, 1984), Xyn de *Bacillus subtilis* (Paice *et al.*, 1986) et Xyn B de *Clostridium acetobutylicum* (Zappe *et al.*, 1990). Ils ajoutent également les familles H et I.

En 1991, Henrissat classe les glycosyle hydrolases en 35 familles différentes selon leur séquence en acides aminés en utilisant la base de données SWISS-PROT. Cette classification regroupe des enzymes provenant de 39 numéros EC différents. Dans cette liste, les xylanases correspondant aux familles F et G se retrouvent dans les familles 10 et 11, respectivement.

Une mise à jour a été faite par Henrissat en 1992. Au niveau des xylanases, cette classification basée sur des homologies de séquences primaires a permis de confirmer l'hypothèse de Wong *et al.* (1988), c'est-à-dire que la famille F est composée de xylanases de haut poids moléculaire et de point isoélectrique acide tandis que la famille G contient des xylanases alcalines de faible poids moléculaire. La xylanase A de *S. lividans* fait partie de la famille F et les xylanases B et C de la famille G (Shareck *et al.*, 1991). Depuis, toutes les nouvelles xylanases sont réparties dans les familles F et G.

Tableau 1: Les deux familles de xylanases

Famille	Enzyme	Organisme	Référence
F	XynA	<i>Bacillus souche C-125</i>	Hamamoto <i>et al.</i> , 1987
	XynA <sup>a</sup>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 49	Mannarelli <i>et al.</i> , 1990
	XynB <sup>a</sup>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c	Lin et Thomson, 1991
	XynA	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Lüthi <i>et al.</i> , 1990
	XynZ <sup>b</sup>	<i>Clostridium thermocellum</i>	Grépinet <i>et al.</i> , 1988
	Xyn	<i>Cryptococcus albidus</i>	Boucher <i>et al.</i> , 1988
	XYLA <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp. <i>cellulosa</i>	Hall <i>et al.</i> , 1989
	XYLB <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp. <i>cellulosa</i>	Kellett <i>et al.</i> , 1990
	XlnA	<i>Streptomyces lividans</i>	Shareck <i>et al.</i> , 1991
	XYLA <sup>b</sup>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	Zhang et Flint, 1992
	Xyn	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Srinivasa <i>et al.</i> , 1991
	EG/CBH <sup>a</sup>	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	CELB\$CALSA <sup>d</sup>
	ORF4	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Lüthi <i>et al.</i> , 1990
	CBH/CEX	<i>Cellulomonas fimi</i>	O'Neil <i>et al.</i> , 1986
	XynC	<i>Aspergillus kawachi</i> IFO4308	Ito <i>et al.</i> , 1992b
	Xyn	<i>Bacteroides ovatus</i> V975	U04957 <sup>e</sup>
	Xyn	<i>Clostridium stercorarium</i>	D12504 <sup>e</sup>
	Xyn	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	Haas, 1992
	XynA	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i> B6A-RI	Lee <i>et al.</i> , 1993

G	XynA	<i>Bacillus circulans</i>	Yang <i>et al.</i> , 1988
	XynA	<i>Bacillus pumilus</i>	Fukusaki <i>et al.</i> , 1984
	XynA	<i>Bacillus subtilis</i>	Paice <i>et al.</i> , 1986
	XynB	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Zappe <i>et al.</i> , 1990
	XlnB	<i>Streptomyces lividans</i>	Shareck <i>et al.</i> , 1991
	XlnC	<i>Streptomyces lividans</i>	Shareck <i>et al.</i> , 1991
	XYLA <sup>a</sup>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	Zang et Flint., 1992
	Xyn <sup>c</sup>	<i>Chainia</i> sp.	Bastawde <i>et al.</i> , 1991
	Xyn2 <sup>c</sup>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Tsujibo <i>et al.</i> , 1991
	XynA <sup>c</sup>	<i>Schizophyllum commune</i>	Oku <i>et al.</i> , 1993
	XynA	<i>Schizophyllum commune</i> synth.	Graham <i>et al.</i> , 1993
	Xyn <sup>c</sup>	<i>Trichoderma viride</i>	Ujiie <i>et al.</i> , 1991
	XynC	<i>Aspergillus kawachii</i>	Ito <i>et al.</i> , 1992a
	Xyn	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Maat <i>et al.</i> , 1992
	Xyn	<i>Streptomyces</i> sp. No. 36A	Nagashima <i>et al.</i> , 1989
	Xyn	<i>Trichoderma harzanium</i>	Yaguchi <i>et al.</i> , 1992
	Xyn1	<i>Trichoderma reesei</i>	Torronen <i>et al.</i> , 1992
	Xyn2	<i>Trichoderma reesei</i>	Torronen <i>et al.</i> , 1992
	Xyn <sup>a</sup>	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	P29127 <sup>d</sup>
	Xyn <sup>b</sup>	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	P29127 <sup>d</sup>
	XlnA	<i>Aspergillus tubigenis</i>	de Graaff <i>et al.</i> , 1994
	XynA	<i>Aeromonas cavia</i> ME-1	Kubata <i>et al.</i> , 1992
	XynA	<i>Clostridium stercorarium</i>	Sakka <i>et al.</i> , 1993
	XynC	<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Paradis <i>et al.</i> , 1993
	XlnA	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Gilbert <i>et al.</i> , 1992
	Xyn2	<i>Trichoderma reesei</i> ALK02721	Saarelainen <i>et al.</i> , 1993

<sup>a</sup> : Partie N-terminale

<sup>b</sup> : Partie C-terminale

<sup>c</sup> : Séquence partielle

<sup>d</sup> : Numéro SWISS-PROT

<sup>e</sup> : numéro GenEMBL

## 5.0 STRUCTURE DES XYLANASES

### 5.1 Comparaison des structures primaires

Étant donné le nombre grandissant de séquences de xylanases publiées, la comparaison des séquences primaires devient un outil de plus en plus fiable quant à la classification ainsi qu'à l'identification des acides aminés pouvant être impliqués dans la catalyse enzymatique. Les comparaisons de séquences primaires chez les xylanases ont permis d'identifier cinq régions conservées formant possiblement le site actif et/ou le site de liaison au substrat de ces enzymes. Les régions possèdent les séquences consensus suivantes: **ENAMK**, **GHTLVWHS/NQ**, **WDVVNE**, **NDYN** et **TELD** (Figure 2). Quatre de ces séquences incluent quelques acides glutamiques et aspartiques ayant été identifiés comme essentiels à la catalyse chez plusieurs enzymes (section 6.2).

### 5.2 Organisation en domaines

#### 5.2.1 Domaine catalytique

Les xylanases, tout comme les cellulases, sont des protéines de tailles très variables. Par contre, les domaines catalytiques des ces enzymes sont de tailles similaires. Les domaines catalytiques d'une enzyme peuvent être situés n'importe où dans la

```

XlnA  mgsyalprsgvrirsrvllaalvvgvlgatetali.appgaha..aestl.....gaaaa 10
XlnAS  vpinvmp.r.gark..ralla.gavgl.taaalvapsava..aestl.....gaaa
XynA  ..mrclivcenleml.nsl..akt
CelB  mkrnlfriivrsvllafiasislvgamsyfpvetqaapdwsipsicesykddfmgvai
Cex  mprttppghpargartalrtrrrraatlvgatv.vlpe.qaattlke....aedg
Bacxyl mitlfrkpfvagielsllvggigrvaagppksgvfgenekrndqpfawqvaslse
XynZ  ....piptisgnalrdayeargikigtcmvmyfynn.s..dpty.....
Bf  asyntmet
Cal  sldyank

XlnA  qsgryfgtaiasgrlndstytsiagrefrmvtanenmKidepqrqgqfnfssedrvinw 70
XlnAS  qsgryfgtaiasgrlndstyttianrefnmvtaenemKidepqrqgqfnfslrrpplql
XynA  ykdyfkigaavtakdlegvhrdillkhfnsltpenamKfenihpeeqrynfveearikef
CelB  parcl.....sndtkamvllkhfnsi.aenamKudatepsqnsfsfgagdrvasy
Cex  agrd.fgfaldpnriseaqykaiadsefnlv.aenamKudatepsqnsfsfgagdrvasy
Bacxyl yqeqfdigaavepyqlgrqaqilkhhyalvaenamKpeelqpregeawegadklivef
XynZ  .....nsilqrefsmvcenamKfdalqprqrvfdksgdqllaf
Bf  ygakygyscnvhtalrsvivnaikkdsnvtlgnemKpd.y..k.idfrtvd.....
Orf4  mqq.ylidy.eat.Kaskhgmrvckfscip.....
Cal  agktylgtavsdqvpqsq..qileaqfdaitepenemKewveptegnfdfgtkivaee.
XylB  ..kfgnigttagav.rsdfrt...ynqitpenesKwgevegrnrvynwaplrdriya.

XlnA  Av.....qngkqvrqHtlvshsQq.Pgmqslsgrprlqam.id..... 107
XlnAS  Av.....qngkqvrqHtlvshsQq.Pgmqslsgrprlqam.id.....
XynA  Al.....kndmklrgHtlvshsQq.tPgwfldkngeeaskelvierlre.....
CelB  AfvdfastnkigirgHtlvshsQq.tPwffkdsngqriskdlarlakq.....
Cex  Aa.....dtgkelygHtlvshsQq.Pdwaknngsafesamv.....
Bacxyl A.....rkhnmelrfHtlvshsQq.Pewff.idedgnrmdetdpdkreankqllerne
XynZ  A.....erngqwrqHtlvshsQq.Pswltngrnwrds..llavka.....
Bf  Avk.fcyenglkwrqHtlvshsQq.tPwlfrnysgngrfvmtatnde.rlefvykavmg
Orf4  Alq.fckenglkwrqHtlvshsQq.tPwffhkdyd.vskplvdaatmarrlesyikvie
Cal  A.....ktgslrllgHtlvshsQq.tPwffhkdyd.vskplvdaatmarrlesyikvie
XylB  A.....rqnnipvkaHtlvshsQq.sPswltnng.p.evavelequir.....

XlnA  .hingvmahykgkivqDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAraadpsa 165
XlnAS  .hingvmahykgkivqDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtArnadpsa
XynA  .hikttlceryk.dvyaDvVNEafadgskteklresnrkligddyikiafeiareysgda
CelB  .yiydvgrgrykgyvyaDvVNEafadgspdsyrrstwyieicgpeyiekafiuAheadpsa
Cex  nhvtkvadhfeqkvasDvVNEafadgspdsyrrstwyieicgpeyiekafiuAheadpsa
Bacxyl nhiktverykddvtsDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa
XynZ  nhittvmthykgkiveDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa
Bf  .hfys..gkygstlvynDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa
Orf4  ..fcq..knypgvvycuDvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa
Cal  nhidnvigrykddlayfDivNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa
XylB  ....dyceryp.dtamidvVNEafadgsggrrrdsnlqrs.gndvievfrtAradpsa

```

```

XlnA  .....kLcyNDYH..venwtwaktqamymrvdfkqrG.vpidcvGfqshfnsgs.p.y 214
XlnAS  .....kLcyNDYH..fenwaktqgvymrvdfkqrG.vpidcvGfqshfnsgs.p.y
XynA  .....kLfyNDYH..empy..kkt.ykvlketlerGt.pidgGiqahniwdknlv
CelB  .....akLfyNDYH..eis..kkrdfiy.mvknkakG.lpihgGmqchirv.nupsv
Cex  .....kLciNDYH..vegfn.akanstydvlkdf.kaG.vpidcvGfqshlvqgvpG
Bacxyl .....akLyNDYH..ev..pakrddlynlvkdlleqG.vpidgVghqshiqig.wpsi
XynZ  .....lLfyNDYH..iedl.gpknavfrmikakerG.vpidgVghqchfingmspey
Bf  kltsvkLfyNDYHtymevndviklvn.y.inq.....GkvcagvGmqshlgtg.fpsv
Orf4  .....vaLfyNDYH..vflpkreaiynlaqllkekG.lidgGloqptvgl.nypel
Cal  .....mkLciNDYH..ietvn.aksqamakvaagllakG.aplhciGleahfiggstpk.
XylB  .....iLiNDYHn.ir...wqhne..fiala..kaqG.nyidavGloqhelkg..mta

XlnA  nsnftrttlqnsaal....GvdvaitEldi.....Gqepast 246
XlnAS  nsnftrttlqnsaal....GvdvaitEldi.....Gqesptt
XynA  .snlkkalevvasl....GleihiTEldiavfefedkrdtldfeptpe..mlelQ.a..kv
CelB  seiens.lklfssip....GleihiTEldimlyngsseny.stppqd..llkqQ.s..qk
Cex  ddrfnq.lqrfadl....GvdvaitEldim.....rt.....psdatklatQ.a.s.dr
Bacxyl edtres.fakftal....GldnqvtEldmlyguppptgaytdipaelleqQ.a.s.dr
XynZ  asidqn.lkryael....GvivasTEldiripq.....senpatafayQ.a.s.dr
Bf  ddyttnalnsfira....GfevqitElditnkgydl.....nn
Orf4  dsddidsfktttetfaklGiqihitEldifeikgdesnrt....pen....lkkQ.a.s.dr
Cal  dipae..mnlfsqd....GlevpmtEldvripvngndm....pen.atvakeQ.v..dd
XylB  avktaidniunqv....GkpiyisEydigtndq.....vqlQnfqs.h

XlnA  yanvndclavsr.....c.l.gltvgrvDdsu.rseqt.....pllfndg 287
XlnAS  yanvndclavsr.....c.l.gltvgrvD....
XynA  yedvfvavreykv.....itavtlwglDhrtw.kdn...fpvkgak.dwpllfvng
CelB  ykeifftmkkykn.....vkvavtfglkDdysulrs....fy.g.kn.dwpllfedy
Cex  ykvvqacmqvtr.....c..qgvvnglDkysvvpd....vfp.gegea...lwdasy
Bacxyl ydqfelyeelad.....isevtfgiaDhntwldgrareyngvgiddepfvfahny
XynZ  ykelakiclanpn.....c...tfvawgftDkytwipgt...fp.gygn...pliydsny
Bf  yayrlfkniakknngg..niscitwvgsDeatwlrnek.....pliusnig
Orf4  yyemklllkedtdngppcnictvtfvgicDdyplykn....f.k.....qcmvldknc
Cal  yytsvseclqndl....c..pgvsiwqfDpawipg....v.f.kygea...llydaqy
XylB  f.pvfyhphvh.....gitsgicgg.qDldrrlr.....fdpqqwha.pgnndvd

XlnA  skKa.aYtavldalnggdsseppadgqikvgsgrclDvpdestadgtqlQldchsgt 346
XynA  kpKealYr.ilr.f
CelB  saKp.aYvaviasgvttsptp.....
Cex  akKp.aYvaviasgvttsptp.....
Bacxyl rvKp.aYwrii
XynZ  npKp.aYvaviasgvttsptp.....
Bf  vaKp.aYdevvkaftetfngpsftpptitpaptptpgnt
Orf4  npKp.cYs.flqagldkasklls
Cal  qKstYf...vvaqelkdgkngskfhgikl

XlnA  nqqaatdagelrvygdcldeagtsngskvqiyiscvggdnkwrlnsdgavvqsglc 406
Cex  tvkntssapdvgtlftsfpgqyvqawstvtqsggavtrnrapngsipepgtaqfg

XlnA  ldavngtantgltlqlytcnsngnqrwtrt 436
Cex  fngshgtntaaptfslngtpctvg

```

Figure 2: Comparaison des séquences primaires de dix xylanases de la famille F. XlnA, *S. lividans*; XynZ, *Clostridium thermocellum*; Bacxyl, *Bacillus* sp. C-125; XynA, *Caldocellum saccharolyticum*; Cal, *Cryptococcus albidus*; CelB, exo-cellulase de *Caldocellum saccharolyticum*; Cex, exo-cellulase de *Cellulomonas fimi*; Bf, *Butyrivibrio fibrisolvens*; Orf4, *Caldocellum saccharolyticum*; XylB, Xln de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. Les acides aminés conservés sont en caractères gras. Tiré de Shareck *et al.* 1991.

séquence de la protéine, ce sont donc les séquences primaires des domaines catalytiques seulement qui sont utilisées pour la classification des glycanases (Gilkes *et al.*, 1991, section 4.3). La xylanase XynZ de *Clostridium thermocellum* possède un domaine catalytique en C-terminal et une région de 401 acides aminés de fonction encore inconnue en N-terminal (Grépinet *et al.*, 1988). La bactérie *Ruminococcus flavefaciens* possède une protéine contenant trois domaines différents. Un domaine catalytique en N-terminal homologue à ceux de la famille G, un domaine possédant une activité  $\beta(1,3-1,4)$ glucanase en C-terminal ainsi qu'une région centrale dont le rôle est encore inconnu (Flint *et al.*, 1993). Un autre exemple d'enzyme bifonctionnelle a été décrit par Zhang et Flint (1992) chez *Ruminococcus flavefaciens* 17, qui produit le gène *xynA* qui code pour une xylanase possédant deux domaines catalytiques différents, le domaine C-terminal appartenant à la famille F et le domaine N-terminal à la famille G.

### 5.2.2 Domaine de liaison au substrat

Plusieurs données sont disponibles au sujet de l'existence de domaines de liaison au xylane chez les xylanases. La xylanase B de *Streptomyces lividans* se lie au xylane insoluble contrairement à la xylanase C qui ne se lie pas au xylane insoluble. Shareck *et al.* (1991) proposent que le site de liaison au xylane serait situé dans la partie C-terminale de la xylanase B. Deux xylanases de *Aspergillus oryzae* possèdent des affinités différentes pour le xylane insoluble sans toutefois qu'un site spécifique de liaison au xylane n'ait été identifié dans la séquence de la protéine (Bailey *et al.*, 1991).



Les domaines de liaison à la cellulose (CBD) sont très bien caractérisés. Ce sont des séquences d'environ 100 acides aminés contenant peu d'acides aminés chargés, beaucoup de résidus hydroxylés (Ser et Thr) et dont certains résidus aromatiques (Trp; Din *et al.*, 1994) sont conservés entre les CBD de différentes enzymes. Ces domaines sont retrouvés en C ou N-terminal des protéines. Leur présence n'est pas essentielle à la catalyse enzymatique et plusieurs expériences de protéolyse ont démontré que même sans CBD, les enzymes étaient toujours efficaces. Leur rôle serait relié à l'activité spécifique des protéines envers différents substrats (Gilkes *et al.*, 1991). Les xylanases XynA, B et C de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contiennent chacune un domaine de liaison à la cellulose (Hall *et al.*, 1989; Kellett *et al.*, 1990). L'exoglucanase Cex de *Cellulomonas fimi* hydrolyse le xylane et la cellulose et possède un CBD (Gilkes *et al.*, 1984). Ce n'est pas surprenant puisque ces deux polymères sont étroitement liés dans la nature.

### 5.2.3 Séquences de jonction

Les séquences de jonction entre différents domaines d'une protéine peuvent varier de 6 à 59 acides aminés. En général, ces séquences sont formées de proline et de résidus hydroxylés comme la sérine et la thréonine. Leur rôle serait de séparer les différents domaines retrouvés dans une protéine. Entre autres, de séparer le domaine catalytique du domaine de liaison au substrat. Il n'existe pratiquement pas d'homologie de séquence entre les séquences de jonction des glycanases de différents microorganismes.

Leur rôle ne semble pas essentiel puisqu'elles ont été délétées chez CenA de *Cellulomonas fimi* et chez XynA de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* sans que l'activité enzymatique de ces protéines ne soit considérablement changée (Shen *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1990). Même si il n'y a pas de séquence de jonction dans une protéine, celle-ci peut posséder plusieurs domaines (Gilkes *et al.*, 1991).

#### 5.2.4 Autre domaine chez les xylanases

Lee *et al.* (1993) ont proposé l'existence de régions de thermostabilité dans l'endoxylyanase de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. Ils ont construit des mutants de délétion et ont trouvé qu'une délétion de 1,75 kpb de la région N-terminale du gène *xynA* diminuait la thermostabilité et la thermophilicité de l'enzyme sans toutefois modifier l'activité enzymatique. Des résultats similaires ont été observés chez l'amylopullulanase de *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E (maintenant nommée *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E) par Mathupala (1992). Il est donc possible que d'autres régions de thermostabilité soient identifiées à mesure que la caractérisation détaillée des xylanases progresse.

#### 5.3 Cristallographie et structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle d'une protéine aide à comprendre l'implication de certains acides aminés dans la catalyse en permettant de visualiser les interactions intra-

moléculaires de l'enzyme. La première structure de xylanase à être présentée fût celle de la xylanase de *Bacillus pumilus* par Katsube *et al.* (1990). C'est une xylanase de la famille G et elle est formée en majorité de feuillets  $\beta$ . Récemment, Campbell *et al.* (1993) ont publié la structure des xylanases de *Bacillus circulans* et de *Trichoderma harzianum*, deux autres xylanases de la famille G. Les deux enzymes possèdent des structures tridimensionnelles très similaires. Elles sont formées de trois feuillets  $\beta$  et d'une seule hélice  $\alpha$ . En comparant les séquences en acides aminés de dix xylanases de la famille G, les auteurs ont remarqué que les acides aminés hautement conservés sont situés dans le site catalytique. Par contre, même en possédant les structures tridimensionnelles, il n'a pas été possible d'expliquer les différences biochimiques observées au niveau de l'activité spécifique et du spectre de pH entre ces deux enzymes.

Wakarchuk *et al.* (1994) ont étudié le domaine catalytique de la xylanase de *Bacillus circulans*. Par mutagenèse dirigée, ils ont modifié les acides aminés Glu78 et Glu172, et sans que la structure de l'enzyme ait été modifiée, l'activité enzymatique des mutants était abolie. Les auteurs possèdent aussi la structure cristalline d'un complexe enzyme-substrat fait avec un mutant inactif leur permettant d'identifier deux tyrosines (positions 69 et 80) qui semblent avoir une importance dans la liaison au substrat ainsi qu'une arginine (position 112) jouant un rôle important dans le site actif. Ils ont donc attribué le rôle de nucléophile à Glu78 et le rôle de catalyseur acide-base à Glu172.

Chez les xylanases de la famille F, la structure cristalline du domaine catalytique

de la xylanase A de *Streptomyces lividans* est maintenant résolue (Derewenda *et al.*, 1994). L'enzyme possède la structure générale de baril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. La structure de XynZ, une xylanase de *Clostridium thermocellum* (Béguin *et al.*, 1994) a récemment été déterminée et aurait la même structure générale que la xylanase de *S. lividans* sans toutefois que les deux structures aient été comparées de façon détaillée. Plusieurs autres xylanases ont été cristallisées (voir Tableau 2), sans toutefois que la structure ait été élucidée. L'arrangement tridimensionnel des xylanases de la famille F permettra de confirmer les travaux visant à identifier les acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique et à approfondir la compréhension du mécanisme d'action des xylanases de cette famille.

## 6.0 MODE D'ACTION

### 6.1 Identification des acides aminés impliqués dans la catalyse

Pour réussir à élucider le mécanisme d'action des xylanases, il est très important de connaître les acides aminés impliqués dans la catalyse. Il existe plusieurs façons d'identifier ces résidus. Premièrement, il y a les inhibiteurs chimiques qui peuvent spécifiquement modifier la chaîne latérale de certains acides aminés. Deuxièmement, il est possible, par mutagénèse, de remplacer un acide aminé par un autre. Dans ces deux cas, il s'agit de faire les modifications et ensuite de conclure sur les modifications biochimiques conséquentes à ces changements. Les conclusions sont aussi basées sur des homologues de séquences entre différentes protéines de la même famille. Finalement, la

Tableau 2: Liste des xylanases cristallisées à ce jour.

Enzyme	Microorganisme	Famille	Référence
xylanase	<i>Bacillus pumilus IPO</i>	G	Moriyama <i>et al.</i> , 1987
xylanase	<i>Trichoderma harzanum</i>	G	Rose <i>et al.</i> , 1987
Cex	<i>Cellulomonas fimi</i>	F	Bedarkar <i>et al.</i> , 1992
XYLA	<i>Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa</i>	F	Pickersgill <i>et al.</i> , 1993a
xylanase	<i>Aspergillus oryzae</i>	---	Golubev <i>et al.</i> , 1993
xylanase	<i>Bacillus XE</i>	G	Pickersgill <i>et al.</i> , 1993b
xylanase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	G	Viswamitra <i>et al.</i> , 1993
XYN1, XYNII	<i>Trichoderma reesei</i>	G	Törrönen <i>et al.</i> , 1993
xylanase	<i>Bacillus pumilus IPO</i>	G	Katsube <i>et al.</i> , 1990
xylanase	<i>Bacillus circulans</i>	G	Campbell <i>et al.</i> , 1993
xylanase	<i>Trichoderma harzanum</i>	G	Campbell <i>et al.</i> , 1993
xyn Z	<i>Clostridium thermocellum</i>	F	Béguin <i>et al.</i> , 1994
xln A	<i>Streptomyces lividans</i>	F	Derewenda <i>et al.</i> , 1994

structure tridimensionnelle d'une protéine permet de visualiser le site catalytique et ainsi d'identifier les résidus possiblement impliqués dans la catalyse. Par contre, la structure à elle seule, ne permet pas de conclure sur l'implication des acides aminés dans le site catalytique, mais elle permet plutôt d'appuyer les résultats apportés par une des deux premières méthodes.

### 6.1.1 Par modifications chimiques

Tull et al. (1991) ont utilisé le 2',4'-dinitrophényl-2-déoxy-2-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranoside, un analogue du *para*-nitrophényl- $\beta$ -D-cellobioside (PNPC) qui agit comme inhibiteur en formant un intermédiaire glycosyl-enzyme stable (Withers et Street, 1988). Les auteurs ont fait réagir l'inhibiteur tritié avec l'exoglucanase Cex de *Cellulomonas fimi*, isolé le peptide radioactif par protéolyse et déterminé, par séquençage du peptide, que l'inhibiteur était lié à l'acide glutamique en position 274.

Keskar *et al.* (1989), travaillaient sur une xylanase de 20 kDa de *Streptomyces T<sub>7</sub>*. Ils ont utilisé le N-bromosuccinimide (NBS) reconnu comme un oxydant des tryptophanes, le 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromure (HNBB) ainsi que le *p*-hydroxymercuribenzoate (PHMB), deux oxydants des groupements thiols. Leurs résultats suggéraient la présence d'une cystéine et d'un tryptophane dans le site de liaison au substrat. En 1992, Keskar *et al.* utilisèrent le réactif N-(2,4-dinitroanilino)malcimide (DAM) qui se lie de façon covalente aux groupements thiols de la xylanase, ce qui l'inactive complètement. Ils ont donc séquencé un peptide qui contenait une cystéine ainsi qu'un acide aspartique hautement conservés à travers les séquences des xylanases, le reste des résidus de ce peptide étant de nature hydrophobe. Le xylane protégeait l'enzyme d'une inactivation par le DAM.

Bray et Clarke (1990) ont démontré par modification chimique l'importance de

groupements carboxyles chez la xylanase A de *Schizophyllum commune* en utilisant l'iodure de 1-(4-azonia-4,4-diméthylpentyl)-3-éthylcarbodi-imide (EAC), un agent spécifique aux groupements carboxyliques. Ils ont aussi utilisé le diéthylpyrocarbonate (DEPC) pour démontrer que la modification des trois résidus histidine n'avait pas d'effet sur l'activité enzymatique. Les auteurs ont également montré l'absence de groupement thiol libre réactif en utilisant le 5,5-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque) et l'iodoacétimide joint au *p*-chloromercuribenzoate. Finalement, la modification des tyrosines avec le tétranitrométhane modifie peu l'activité enzymatique de la protéine. En 1994, les mêmes auteurs ont voulu préciser quel était le groupement carboxyle impliqué dans la catalyse. Ils ont donc utilisé le réactif EAC tritié et séquencé, après protéolyse, un peptide radioactif leur permettant d'identifier le nucléophile de la xylanase A de *Schizophyllum commune*. C'était l'acide glutamique en position 87, un résidu hautement conservé dans la famille G des glycanases.

Chauthaiwale et Rao (1993), ont démontré l'implication d'un groupement carboxyle chez la xylanase d'une espèce alcalothermophile de *Bacillus* en utilisant l'hydrochlorure de guanidine. La présence de ce réactif diminuait considérablement l'activité enzymatique de l'enzyme.

### 6.1.2 Par mutagénèse

Ko *et al.* (1992) en se basant sur des comparaisons de séquences primaires, sur la

structure tridimensionnelle ainsi que sur le mécanisme d'action du lysozyme d'oeuf de poule, ont modifié, par mutagenèse dirigée, deux acides glutamiques (Glu93 et Glu182) et un acide aspartique (Asp21). Ils ont observé que ces mutations de Glu93 et de Glu182 diminuaient drastiquement l'activité spécifique de XynA de *Bacillus pumilus* IPO sans toutefois modifier significativement la structure tridimensionnelle de l'enzyme. La mutation de Asp21 ne semblait pas avoir un effet aussi drastique que dans le cas de Glu93 et de Glu182. Les auteurs ont aussi observé une légère modification de la structure dans le cas du mutant D21E. Ko *et al.* ont donc suggéré Glu93 et Glu182 comme résidus essentiels à la catalyse de XynA de *Bacillus pumilus* IPO.

Des travaux de mutagenèse dirigée ont également été faits chez la xylanase A de *Streptomyces lividans* permettant d'identifier le rôle probable de certains acides aminés. Moreau *et al.* (1994a) ont modifié le mode de clivage de la xylanase A en changeant l'asparagine 173 par un acide aspartique. L'enzyme mutante libérait 90% de xylobiose (X2) et 10% de xylotriose (X3) suite à l'hydrolyse du xylopentaose marqué tandis que l'enzyme de type sauvage (la terminologie sauvage est employée pour montrer que l'enzyme, dans ce cas-ci, provient de la souche d'origine et n'a subi aucune modification) produisait 56% de X2 et 44% de X3 dans les mêmes conditions. Les réactions de transglycosylation semblaient aussi grandement affectées par la mutation. Moreau *et al.* (1994b) ont également augmenté l'activité enzymatique et la thermostabilité de la xylanase A par mutagenèse dirigée. Les mutants F155Y, R156E, R156K et N173D possédaient des activités spécifiques de 10 à 50% supérieures à l'enzyme de type sauvage. Les



mutants R156E et N173D étaient également plus thermostables. Les auteurs ont aussi produit des doubles mutants (R156E/N173D et R156K/N173D) qui étaient moins actifs que l'enzyme sauvage, mais plus thermostables.

Arase *et al.* (1993), ont muté la xylanase XynA de *Bacillus pumilus* IPO par mutagenèse aléatoire en utilisant un traitement chimique. Ils ont obtenu quatre mutants plus résistants à la chaleur que l'enzyme sauvage appelés par les auteurs: N56, N102, N104 et F1. Les modifications apportées sont les suivantes: N56; S26W/G38D/T126S, N102; G38D, N104, G38S/R48K, F1; S12C.

Lee *et al.* (1993) ont également identifié, par mutagenèse dirigée, trois résidus essentiels à la catalyse de l'endoxyanase A de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. Leur choix des résidus à muter est basé sur des comparaisons de séquences hydrophobes ainsi que sur l'inactivation de l'enzyme par l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylamino propenyl)-3-éthyl carbodiimide (EDAC) qui modifie les groupements carboxyles (Glu ou Asp). Donc, la substitution des acides aminés Asp537, Asp602 et Glu600 par leur résidu isostérique respectif a complètement aboli l'activité enzymatique. Ces auteurs suggèrent donc que ces trois acides aminés forment une triade catalytique agissant par un mécanisme général acide (section 6.3).

D'autres travaux de mutagenèse pour identifier le rôle de certains résidus chez les xylanases ont été publiés par Poole *et al.* (1993). Leur étude portait sur cinq

tryptophanes conservés dans le CBD de la xylanase A de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. Ils ont substitué les tryptophanes par les résidus alanine ou phénylalanine. Pour tester l'effet de ces mutations, les auteurs ont fusionné les domaines mutés à la phosphatase alcaline mature et vérifié ensuite la capacité de la protéine de fusion à lier la cellulose. Les mutants contenant une Phe conservaient, dans tous les cas, une certaine affinité envers la cellulose et les Trp 13, 34 et 38 étaient essentiels pour que la xylanase A se lie à la cellulose. La mutation des Trp 49 et 66 ne semblait pas affecter grandement cette liaison. Ces résultats montrent qu'il y a une différence entre les mécanismes de liaison à la cellulose des xylanases de *Pseudomonas* et de *Cellulomonas* puisqu'une délétion des 66 premiers résidus de la partie N-terminale du CBD de CenA n'enlevait pas sa capacité de liaison à la cellulose (Gilkes *et al.*, 1989). Dans ce cas, l'enzyme tronquée contenait seulement le Trp en position 66 qui n'apparaît pas être important pour la liaison à la cellulose chez la xylanase A de *P. fluorescens* subsp. *cellulosa*. Récemment, Din *et al.* (1994) ont démontré, par mutagénèse dirigée, l'importance de deux résidus tryptophane (W14 et W68) dans le CBD de CenA de *Cellulomonas fimi*. Les mutations ponctuelles W14A et W68A ont diminué l'adsorption du CBD de CenA d'un facteur de 30 et 50, respectivement, sans modifier la conformation du domaine de liaison à la cellulose.

Lüthi *et al.* (1992) ont produit des mutants de la xylanase de *Caldocellum saccharolyticum* par mutagénèse *in vitro* en insérant des acides aminés dans la séquence native de la protéine. Des six mutants produits, deux avaient perdu presque toute leur

activité et, en alignant les séquences, les deux insertions étaient situées près des régions conservées ENAMK et TELD (section 5.1). Un des autres mutants avait une température optimale de 50 °C comparativement à 70 °C pour l'enzyme non modifiée. Les trois autres mutants avaient perdu leur stabilité thermique. D'après ces résultats, les auteurs pensent avoir localisé certains acides aminés importants pour la stabilité thermique de l'enzyme et d'autres mutants seront produits par mutagenèse dirigée pour vérifier leur hypothèse.

## 6.2 Stéréochimie de la réaction

Withers *et al.* (1986) ont suggéré que la stéréochimie de l'hydrolyse enzymatique serait un meilleur critère de ressemblance entre deux protéines que leur spécificité d'action. L'hydrolyse du lien  $\beta$ -1,4-glycosidique peut être faite avec inversion ou rétention de la configuration du carbone anomérique et cette particularité implique deux mécanismes différents qui seront détaillés dans la prochaine section. Gebler *et al.* (1992) ont appuyé cette hypothèse en déterminant la stéréochimie de l'hydrolyse de dix glycanases différentes grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN). En compilant leurs résultats avec d'autres déjà publiés, ils ont déterminé que les enzymes d'une même famille possèdent la même stéréosélectivité. Ces conclusions incluaient les familles A, B, C, E, F et G selon la classification de Gilkes *et al.* (1991, section 5.3). Les xylanases incluses dans l'étude étaient: Cex de *C. fimi* et XynZ de *C. thermocellum* dans la famille F ainsi que Xyn de *B. subtilis* et Xyn de *S. commune* faisant partie de la famille G.

### 6.3 Mécanisme proposé

Il y a plus de quarante ans (Koshland, 1952), il avait été proposé que toutes les glycosylases hydrolysant avec rétention de la configuration procédaient par un mécanisme de déplacement double tandis que les glycosylases inversant la configuration utilisaient un mécanisme de déplacement simple. Lorsque l'on parle d'un mécanisme de déplacement simple ou double, il s'agit d'une réaction à une ou deux étapes, respectivement, qui implique un ou deux déplacements d'électrons entre l'enzyme et le substrat. Aujourd'hui, il n'existe encore aucune preuve du contraire. Les xylanases de rétention impliqueraient l'attaque du substrat par un acide glutamique qui donnerait un proton à l'oxygène lié au carbone C-4 du sucre réducteur partant, laissant ainsi un intermédiaire oxocarbonium pouvant être stabilisé par des interactions électrostatiques ou par un lien covalent avec un nucléophile (Glu ou Asp) situé dans le site catalytique (Hardy et Poteete, 1991). Le deuxième déplacement implique une molécule d'eau polarisée par l'acide glutamique agissant maintenant comme base en captant un proton de l'eau, formant ensuite un nouveau sucre réducteur ayant la même configuration de départ (Figure 3). La réaction de simple déplacement implique un acide glutamique protoné agissant comme un acide et un acide glutamique ou aspartique agissant comme base en polarisant une molécule d'eau. La molécule d'eau étant polarisée par un acide aminé se situant de l'autre côté du site catalytique, il y a inversion de la configuration du nouveau sucre réducteur formé (Figure 4). Sinnott, (1990), a publié une excellente revue sur le mécanisme d'action des glycosylases en comparant le lysozyme, les amylases, les cellulases, les xylosidases, les xylanases, les galactosidases et les autres types d'enzymes hydrolysant les sucres.

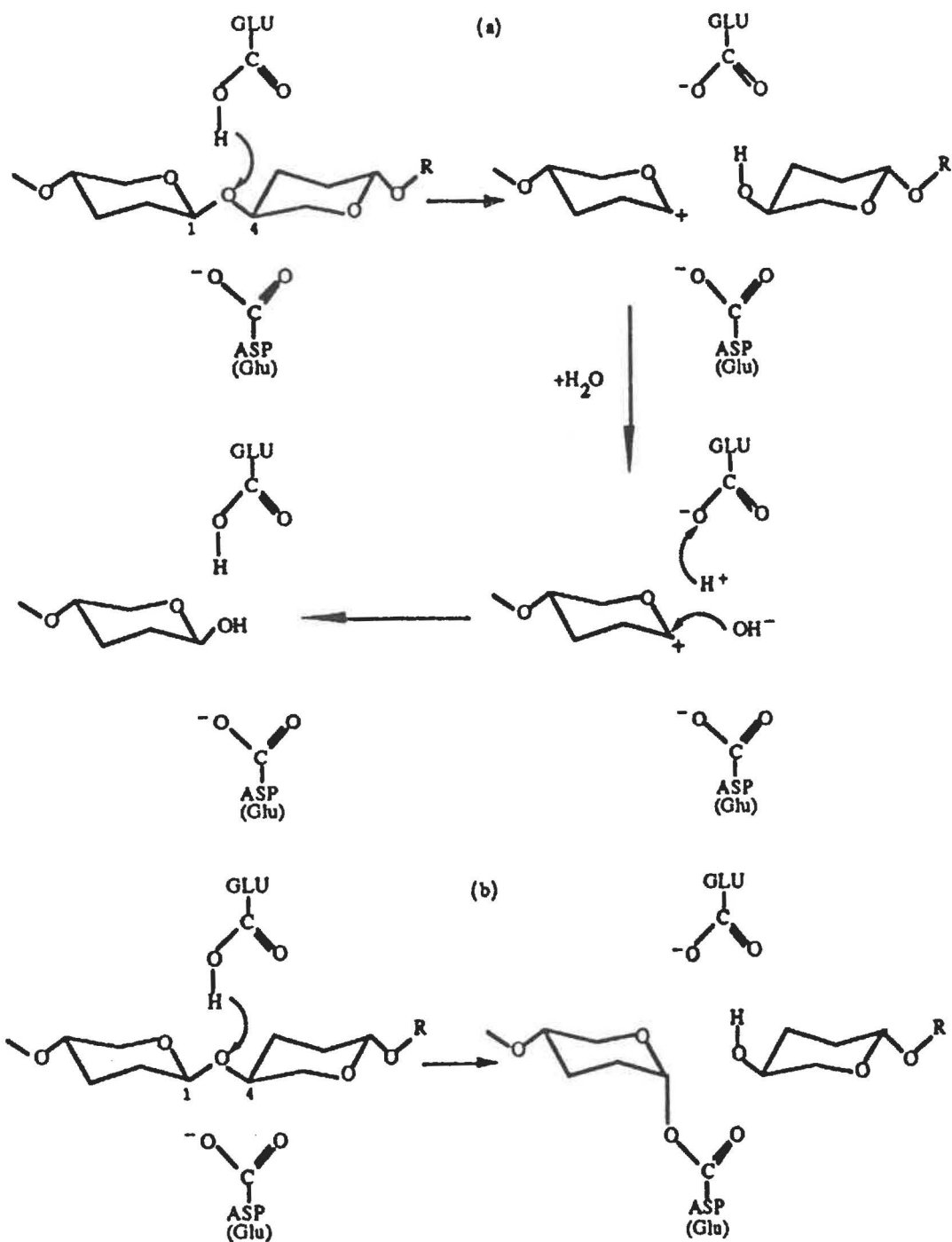


Figure 3: Mécanisme de déplacement double impliquant une rétention de la configuration du carbone anomérique. En (a), l'intermédiaire oxocarbenium est stabilisé par une interaction électrostatique avec un Asp ou Glu, en (b), la stabilisation de l'intermédiaire se fait grâce à une liaison covalente. Tiré de Sinnott, 1990.

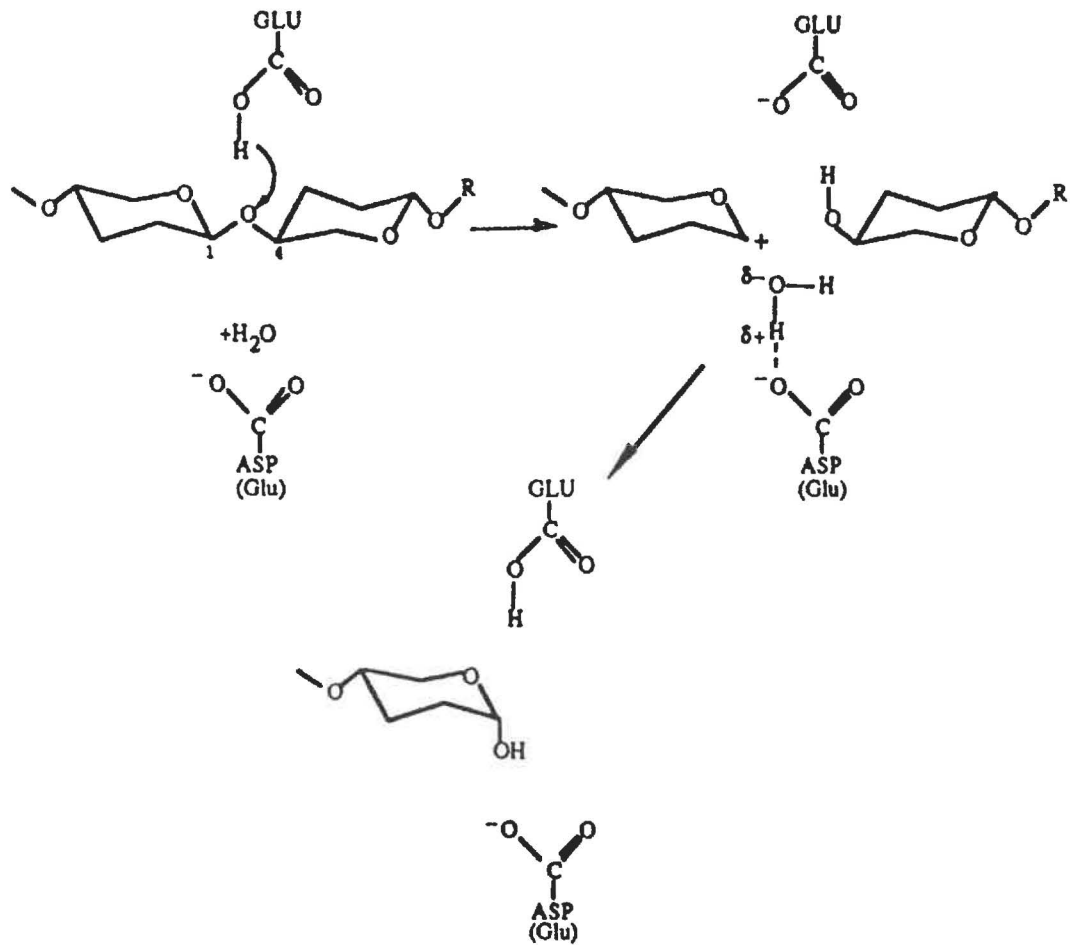


Figure 4: Mécanisme de déplacement simple impliquant l'inversion de la configuration du carbone anomérique. Tiré de Sinnott, 1990.

#### 6.4 Spécificité de substrat

L'utilité de plusieurs xylanases produites par un même organisme est l'hétérogénéité du xylane. Une enzyme pourrait reconnaître un type d'arrangement dans le substrat que les autres ne pourraient hydrolyser. Une xylanase de *Bacillus subtilis* ne peut hydrolyser le xylane linéaire ni les  $\beta$ -1,4-oligoxylosides linéaires, mais reconnaît le glucuronoxylane, c'est-à-dire que le substrat doit contenir un groupement acide glucuronique pour être hydrolysé (Nishitani et Nevins, 1991). C'est la seule xylanase connue ayant ce genre de spécificité. Un autre type de spécificité a été observé chez un champignon mésophile qui produit trois xylanases différentes: Xn-A, Xn-B et Xn-C (Mitsuishi *et al.*, 1988). Dans ce cas particulier, les trois endoxylanases hydrolysent de façon similaire les oligoxylosides plus grands que le xylo-tetraose. Les différences observées se situent au niveau de l'hydrolyse du xylo-triose, qui est hydrolysé plus facilement par Xn-B et Xn-C.

Le même phénomène a été observé par Biely *et al.* (1993) en comparant les modes d'action des trois xylanases de *Streptomyces lividans*: XlnA, XlnB et XlnC. Les auteurs montrent que la XlnA (famille F) semble avoir une plus grande affinité pour les petits oligoxylosides ainsi que pour d'autres substrats comme le rhodymenane et l'acétylxylane. Les xylanases B et C (famille G) de *S. lividans* ne semblent pas posséder de caractéristiques que la xylanase A ne possède déjà. La fonction de ces xylanases multiples reste donc inconnue pour les auteurs.

## 6.5 Activité transférase

L'activité transférase des xylanases est observée dans des conditions particulières seulement et semble être un mécanisme secondaire permettant l'hydrolyse de substrats difficilement utilisés par l'enzyme. Biely *et al.* (1981b), ont démontré que les réactions de transfert observées chez la xylanase de *Cryptococcus albidus* dépendaient de la concentration du substrat et qu'il était possible d'observer le transfert de groupements xyloxyles, xylobiosyloxyles et xylotriosyloxyles formant ainsi des xyloxyloxydes plus grands que le substrat initial. Les variations des fréquences de clivage en fonction de la concentration de substrat démontraient aussi qu'un phénomène bimoléculaire pouvait se produire à haute concentration de substrat. Biely *et al.* (1981b) proposent également une hypothèse mécanistique au phénomène de transglycosylation de cette xylanase. Les xylanases capables de transglycosylation feraient toutes partie des xylanases de rétention utilisant un mécanisme de déplacement double (Biely *et al.*, 1992). Le même genre de réactions a été observé par Vrsanska *et al.* (1982) chez la xylanase de *Aspergillus niger*. Les trois xylanases de *Streptomyces lividans* possèdent également la capacité de transglycosyler en présence de hautes concentrations de substrat (Biely *et al.*, 1993).



## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.0 SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

#### 1.1 *Streptomyces lividans*

La souche sauvage *Streptomyces lividans* 1326, provient du Dr. Hopwood de l'Institut John Innes, Norwich, Grande-Bretagne. La souche IAF10-164, qui n'a pas d'activité xylanase ni cellulosique, a été produite par mutagénèse de la souche sauvage avec le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), un agent mutagène puissant (Mondou *et al.*, 1986). La souche 10-164 sera utilisée pour la surproduction de xylanase, autant au niveau du laboratoire que de l'industrie. *S. lividans* 3131, obtenue du Dr. E. Katz a été conçue en transformant la souche sauvage 1326 avec le plasmide pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) et servira de contrôle en nous permettant de comparer avec la souche sauvage en tenant compte de l'effet de pIJ702. La souche *S. lividans* IAF18 a été formée en transformant IAF10-164 avec le plasmide pIAF18 contenant le gène *xlnA* (Mondou *et al.*, 1986).

#### 1.2 *Escherichia coli*

La souche *E. coli* MC1061 (*recA*<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>, *ara139*,  $\Delta$ (*ara*, *leu*)7697,  $\Delta$ (*lac*)X74, *galU*, *galK*, *hsdR2*, *strA*, *mcrA*, *mcrB1*) est utilisée pour la transformation ainsi que pour la

production des xylanases modifiées. La souche DH11S (*mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-RMS-mcrBC*),  $\Delta$ (*lac-proAB*),  $\Delta$ (*recA* 1398), *deoR*, *rpsh*, *srt*, *thi* /F', *proAB*+, *lac* I<sup>s</sup> Z $\Delta$ M15) est utilisée comme hôte du phage M13 pour la production d'ADN simple brin servant au séquençage des gènes.

## 2.0 PLASMIDES UTILISÉS

### 2.1 *S. lividans*

Chez *S. lividans*, pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) est le plasmide de base utilisé. C'est un plasmide à copies multiples qui contient l'origine de répllication des streptomycètes, un gène de résistance au thiostrepton permettant la sélection des transformants ainsi que le gène de la tyrosinase permettant la production de mélanine dans le milieu de culture. L'antibiotique thiostrepton sélectionne les bactéries non transformées en inhibant la synthèse protéique chez les cellules. Le plasmide pIAF18 contient un fragment de 5,9 kpb possédant le gène sauvage de la xylanase A de *S. lividans* ainsi que sa région promotrice (Mondou *et al.*, 1986). La souche transformée par pIAF18 ne produit pas de mélanine, car le gène de la tyrosinase est interrompu. Le plasmide pIAF11 provient d'une digestion de pIAF18 par l'enzyme *Sph*I suivie d'une ligation sur lui-même libérant ainsi le fragment de 3,2 kpb. Le fragment *Sph*I de 3,2 kpb contient le promoteur et le gène de la xylanase A. pIAF11 sera utilisé pour le sous-clonage des gènes de xylanase A mutés dans *Streptomyces lividans*.

## 2.2 *E.coli*

Deux plasmides sont utilisés chez *E.coli*. pAM19.1 est un plasmide dérivé de pTZ (Mead *et al.*, 1986) dans lequel le fragment *SphI* de 3,2 kpb contenant le gène de xylanase A a été inséré. Le plasmide pIAF217 a été conçu en délétant une partie du promoteur de la xylanase A pour permettre une meilleure expression du gène chez *E.coli* (Moreau, 1993). La liste des plasmides utilisés pour le sous-clonage des mutants de la xylanase A de *E.coli* à *S. lividans* est présentée dans le Tableau 3.

## 3.0 CONSERVATION DES SOUCHES

### 3.1 *S. lividans*

Les souches de *S. lividans* sont conservées (banque) sur un milieu Bennett solide (voir plus loin). La banque sert à ensemercer une boîte de Petri constituée également d'une gélose Bennett qui est incubée 7 jours à 34 °C et doit être utilisée dans les 7 jours suivants. Les souches sont aussi lyophilisées. Pour ce faire, une suspension de spores, préparée à partir d'un milieu Bennett (Jones, 1949) solide, dans une solution de lait écrémé 10% (Difco) est lyophilisée dans des ampoules de verre qui sont scellées sous vide, à la flamme. De cette façon, les souches peuvent être conservées à 4 °C. Le mycélium provenant d'une culture liquide dans un milieu Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) peut être récupéré par centrifugation et conservé dans une solution stérile de glycérol 20% à -70 °C.

Tableau 3: Liste des plasmides contenant le gène de la xylanase A muté (Moreau, 1993).

Plasmide	Mutation
pIAF217	gène sauvage
pIAF217-D50N	Asp remplacé par Asn
pIAF217-H86K	His remplacé par Lys
pIAF217-H86W	His remplacé par Trp
pIAF217-W85H	Trp remplacé par His
pIAF217-D124E	Asp remplacé par Glu
pIAF217-D124N	Asp remplacé par Asn
pIAF217-N127D	Asn remplacé par Asp
pIAF217-E128Q	Glu remplacé par Gln
pIAF217-R156E	Arg remplacé par Glu
pIAF217-T235Y	Thr remplacé par Tyr
pIAF217-E236Q	Glu remplacé par Gln
pIAF217-D270N	Asp remplacé par Asn

### 3.2 *E.coli*

Les cultures de *E.coli* peuvent également être conservées sur milieu solide comme le 2xTY ou bien lyophilisées dans une solution de lait écrémé 10%. Les cellules récupérées par centrifugation peuvent être gardées dans une solution de glycérol 20% à -70°C.

## 4.0 CONDITIONS DE CULTURE

### 4.1 De *S. lividans*

#### 4.1.1 Milieux liquides

Pour la production d'inoculum et la production de plasmide chez *S. lividans*, le milieu commercial TSB est utilisé et supplémenté de thiostrepton (5 mg/L) si nécessaire. La production d'enzymes se fait dans du milieu 14 dont la description est faite plus loin (Bertrand *et al.*, 1989).

#### 4.1.2 Milieux solides

Après transformation, les cellules sont régénérées sur le milieu R5 solide contenant pour un litre: 103 g de sucrose, 0,25 g de  $K_2SO_4$ , 10,12 g de  $MgCl_2$ , 10 g de glucose, 100 mg de "casamino acid", 5 g d'extrait de levures, 5,73 g de tampon TES, 2 mL de solution "trace elements" ( $ZnCl_2$ , 40 mg;  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ , 200 mg;  $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 10 mg;  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 10 mg;  $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ , 10 mg;  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ , 10 mg dans un volume de 1 L) et 22 g d'agar. La solution est autoclavée et on ajoute ensuite stérilement: 10 mL de  $KH_2PO_4$  0,5%, 4 mL de  $CaCl_2$  5 M, 15 mL d'une solution de L-proline 20 %, 1 mL de  $CuSO_4$  5 mg/mL, 10 mL d'une solution 1% de méthionine et 5 mL d'une solution de tyrosine (40% dans NaOH 1 N). Le milieu est réparti à raison de 20 mL par plaque

de Petri et séché à 85% du poids original (environ 5 jours à température de la pièce) (Hopwood *et al.*, 1985).

Le milieu Bennett (Jones, 1949) modifié est utilisé pour la conservation des souches ainsi que pour la production de suspensions de spores servant d'inoculum. Il est composé, pour un litre, de 1 g d'extrait de levures (Difco), 1 g d'extrait de boeuf (Difco), 2 g de NZ amine A (Sheffield Products), 10 g de maltose (BDH) et le pH du milieu est ajusté à 7,3 avec du NaOH avant d'ajouter 20 g de Bacto-agar (Difco) et d'autoclaver.

Finalement, le milieu RBB-xylane est utilisé pour le criblage des transformants actifs et aussi pour évaluer l'activité xylanasiq ue de façon qualitative. Ce milieu est en fait une modification du milieu Stewart (Daigneault-Sylvestre et Kluepfel, 1979) contenant 0,15% de RBB couplé de façon covalente avec du xylane (Biely *et al.*, 1985b). Il contient pour un litre de milieu; 1,5 g de RBB-xylane, 17 g de Bacto-agar (Difco), 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 d'extrait de levures (Difco) et 0,5 g de KCl (pH de 7,2). Après autoclavage, 10 mL de  $\text{MgSO}_4$  5% sont ajoutés ainsi que du thioestrepton (Squibb Canada Ltd, Montréal) à une concentration de 50 mg/L.

## 4.2 De *E. coli*

### 4.2.1 Milieu liquide

Le milieu liquide utilisé pour la croissance des cellules de *E.coli* est le 2xTY (Bacto-tryptone (Difco); 16 g, extrait de levures (Difco); 10 g, NaCl; 5 g) contenant, si

nécessaire, de l'ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Boehringer Mannheim, Laval, Canada). Pour la production des xylanases, ce même milieu est supplémenté de D-xylose (Sigma) à une concentration finale de 0,5%.

#### 4.2.2 Milieux solides

Comme milieu solide, on utilise le 2xTY (même recette que le milieu liquide contenant 15 g/L d'agar). Le milieu solide H est utilisé pour la croissance des cellules *E.coli* DH11S après transfection. Il est composé de 10 g de Bacto tryptone, 8 g de NaCl et 12 g d'agar dans un litre d'eau distillée (Sambrook *et al.*, 1989).

## 5.0 MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES DES SOUCHES

### 5.1 *S. lividans*

#### 5.1.1 Protoplastes et transformation

La préparation de protoplastes de *S. lividans* est basée sur la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985). Pour transformer une souche de *Streptomyces lividans*, 5 ou 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de ligation ou de plasmides sont mélangés doucement avec 50  $\mu\text{L}$  de protoplastes de la souche à transformer dans un tube Eppendorf stérile. Ensuite, 200  $\mu\text{L}$  d'une solution 25% de polyéthylène glycol (PEG) 1500 (Boehringer Mannheim, Laval,

Canada) stérile sont ajoutés et après avoir agité doucement, on incube une à deux min à la température de la pièce et il s'agit ensuite d'étaler les cellules sur le milieu de régénération R5 avec une tige de verre en forme de "L" préalablement flambée avec de l'éthanol 70%. Lorsqu'il y a sélection des transformants résistants au thiostrepton, une expression phénotypique de 16 heures est nécessaire avant l'ajout de l'antibiotique au milieu. Pour ce faire, une solution de 0,5 mg de thiostrepton par mL d'eau stérile est préparée et un mL de cette solution est réparti uniformément sur chacune des plaques R5. On permet à la solution d'antibiotique de pénétrer le milieu environ 30 min et on réincube le tout à 34°C jusqu'à l'apparition de colonies. Cette méthode a été décrite par Hopwood *et al.* (1985).

#### 5.1.2 Isolement de plasmides et digestion avec enzymes de restriction

L'isolement de plasmides est fait à partir d'environ 1 mL de culture en TSB avec thiostrepton contenant environ 10% de cellules. La méthode utilisant le lysozyme et la lyse alcaline décrite par Hopwood *et al.* (1985) est utilisée et l'ADN plasmidique est récupéré dans 50  $\mu$ L d'eau distillée. Cinq  $\mu$ L de plasmides sont ensuite digérés avec l'enzyme de restriction appropriée (le plus souvent *Bam*HI) dans un volume final de 20  $\mu$ L selon la méthode décrite par la compagnie Pharmacia. Après une à deux heures de digestion, on ajoute 4  $\mu$ L d'une solution de tampon de chargement 6X (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol et 30 % glycérol dans de l'eau distillée) et l'ADN est séparé sur un gel d'agarose 0,7% dans du tampon à électrophorèse TAE 1X (solution



50X: 242 g de Tris base, 57,1 mL d'acide acétique glacial et 100 mL d'EDTA 0,5 M, pH 8) selon Sambrook *et al.* (1989).

## 5.2 *E. coli*

### 5.2.1 Transformation

Toutes les manipulations génétiques chez *E.coli* sont faites selon les méthodes décrites dans Sambrook *et al.* (1989) en utilisant les enzymes de la compagnie Pharmacia. Les transformants de la souche *E.coli* MC1061 sont sélectionnés sur le milieu solide 2xTY-ampicilline (100 µg/mL).

### 5.2.2 Isolement de plasmides

L'isolement de plasmides chez *E.coli* MC1061, comme chez toutes les souches de *E.coli* utilisées, se fait en suivant les instructions du "Mini-prep kit" de Pharmacia. Une partie des plasmides récupérés est digérée avec une enzyme de restriction comme décrit auparavant.

## 6.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES DE *E. COLI* À *S. LIVIDANS*

Tous les mutants du gène de la xylanase A ont été produits dans le phagemide pIAF217 (Figure 5) provenant d'une délétion de la région promotrice de la xylanase A dans le phagemide pAM19.1 permettant ainsi une meilleure expression du gène *xlnA* sous le contrôle du promoteur *lacZ* dans *E.coli*. Il s'agissait donc de refaire l'inverse de la procédure, c'est-à-dire de récupérer la région promotrice du gène en remplaçant le fragment *NotI-EcoRI* de pAM19.1 par le fragment *NotI-EcoRI* de pIAF217 qui contient la mutation désirée. Environ un  $\mu\text{g}$  de pIAF217 correspondant à chacun des mutants est digéré avec *EcoRI* et *NotI* (Pharmacia) dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ , puis on ajoute 4  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement 6X et l'ADN est séparé sur gel d'agarose 0,7% contenant du bromure d'éthidium dans le TAE 1X durant 16 heures à 30 V. Les fragments d'ADN, de 2,1 kpb, sont visualisés et découpés aux U.V. L'élution de l'ADN du gel d'agarose se fait à l'aide de la trousse "Band Prep" de Pharmacia. Le fragment *NotI-EcoRI* est ensuite ligué dans le plasmide pAM19.1 (Figure 5) digéré avec les mêmes enzymes de restriction, à l'aide de la ligase du phage T4 (Pharmacia). La souche *E.coli* MC1061 compétente est transformée avec 5  $\mu\text{L}$  de la réaction de ligation selon la méthode décrite dans Sambrook *et al.* (1989). Après 16 heures d'incubation à 37°C sur le milieu 2xTY solide avec ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quelques colonies sont repiquées, avec des cure-dents stériles dans 1,5 mL de 2xTY liquide avec ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). L'ADN plasmidique est ensuite extrait de un mL de culture avec le "Mini Prep kit" de Pharmacia. Le patron de digestion des plasmides isolés des différentes colonies nous permet d'en choisir une

contenant l'insert de 2,1 kpb. Cette colonie est repiquée dans 100 mL de milieu liquide et incubée à 37°C avec agitation durant 16 heures. L'ADN plasmidique est extrait par la méthode "Maxi-prep" décrite dans Sambrook *et al.* (1989) et la préparation de plasmides est purifiée sur un gradient de chlorure de césium par ultracentrifugation à 450 000 x g (Beckman TL-100) durant trois heures.

Après avoir digéré les plasmides pAM19.1 correspondant à chacune des mutations choisies avec l'enzyme *SphI* (Pharmacia), on purifie le fragment *SphI* de 3,2 kpb à partir du gel d'agarose de la même façon. Le fragment de 3,2 kpb contient le promoteur ainsi que le gène de structure de la xylanase A.

Finalement, pour permettre l'expression des gènes mutants dans *S. lividans*, il s'agit de remplacer le fragment *SphI* de 3,2 kpb de pIAF18, qui contient le gène sauvage par le fragment *SphI* de pAM19.1 qui contient la mutation d'intérêt. Pour ce faire, le fragment *SphI* est ligué dans le plasmide pIAF11 (Figure 5) préalablement digéré avec l'enzyme *SphI* et traité à la phosphatase alcaline (CIP ou BAP de Pharmacia). pIAF11 correspond au plasmide pIAF18 dont le fragment *SphI* de 3,2 kpb a été enlevé. Après 16 heures de ligation à 13°C, 5 µL du mélange réactionnel sont utilisés pour transformer 50 µL de protoplastes de la souche de *S. lividans* IAF10-164, xylanase et cellulase-négative, en utilisant la méthode au PEG décrite à la section 5.1.1. On sélectionne les transformants en présence de thiostrepton. La Figure 5 résume les étapes du sous-clonage.

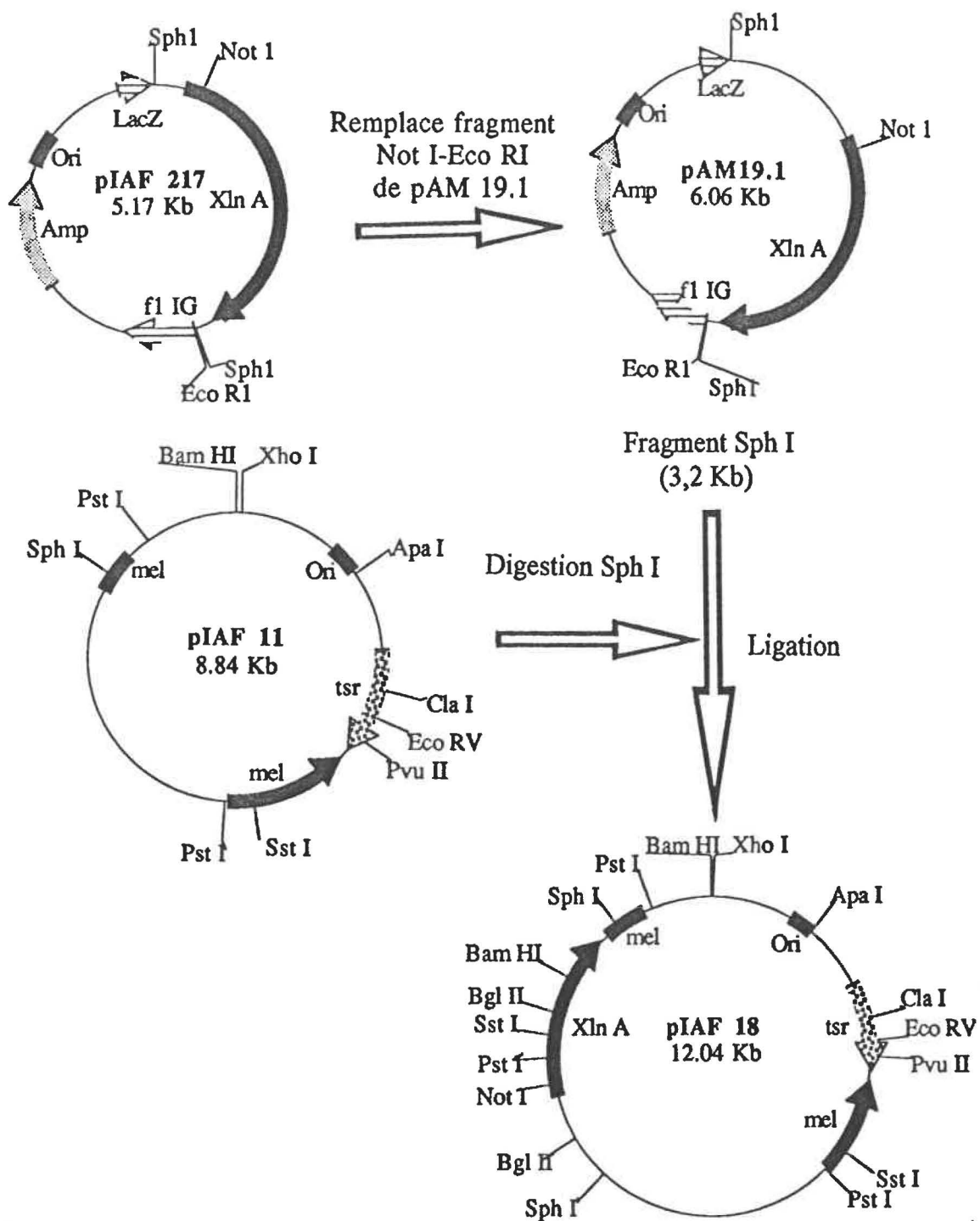


Figure 5: Sous-clonage des gènes mutants de la xylanase A de *E. coli* à *S. lividans*.

## 7.0 CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS

### 7.1 Criblage selon l'activité enzymatique

Après trois jours d'incubation sur le milieu solide R5, quelques dizaines de colonies sont repiquées sur des plaques de milieu RBB-xylane contenant du thiostrepton ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) et incubées à  $34^\circ\text{C}$ . Si un gène de xylanase actif a été inséré dans le plasmide pIAF11, une zone d'hydrolyse claire apparaît autour de la colonie. Les plasmides des colonies ayant une zone d'hydrolyse sont ensuite analysés. Pour permettre le criblage d'un plus grand nombre de colonies, toujours selon l'activité enzymatique, les colonies sur R5 sont incubées jusqu'à sporulation (environ 7 jours) et répliquées sur velours, sur géloses RBB-xylane et incubées jusqu'à apparition d'une zone claire autour des colonies exprimant le gène de la xylanase. Cette méthode est utilisée pour le criblage des mutants qui possèdent une activité xylanasiq ue détectable sur RBB-xylane.

### 7.2 Criblage par isolement de plasmides

Après environ trois jours d'incubation sur géloses R5, les colonies sont étalées, avec des cure-dents stériles, sur géloses Bennett avec thiostrepton et incubées à  $34^\circ\text{C}$ . Les spores et/ou le mycélium sont utilisés pour ensemen cer 12,5 mL de TSB avec thiostrepton et sont incubés de 24 à 48 heures à  $34^\circ\text{C}$ . La culture est utilisée directement pour isoler le plasmide selon la méthode décrite plus haut. Le profil de digestion avec

enzyme de restriction nous indique les colonies exprimant le gène de xylanase A modifié.

### 7.3 Criblage par hybridation de colonies

À partir des géloses R5, un certain nombre de colonies (environ 50 par filtre) sont repiquées, au cure-dent, sur un filtre Whatman #541 ou sur nitrocellulose 0,8  $\mu\text{m}$  (0,45) préalablement déposé sur une gélose Bennett avec thiostrepton. Les colonies sont incubées environ 48 heures afin d'obtenir une croissance contrôlée en un point (le plus petit possible). L'ADN est ensuite extrait et fixé à la membrane en suivant la méthode décrite dans Hopwood *et al.* (1985).

Pour l'hybridation, les filtres sont incubés une heure à 42°C dans la solution de préhybridation (Sambrook *et al.*, 1985). Pendant ce temps, la sonde d'oligonucléotide (21 nucléotides), synthétisée à l'aide du synthétiseur automatique Gene Assembler II de Pharmacia, est marquée en phosphorylant l'extrémité 5' avec du  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (4500 Ci/mole) en utilisant la polynucléotide kinase du phage T4 (Pharmacia). La sonde radioactive est purifiée sur Sephadex G-25 et ajoutée au tampon de préhybridation, ce qui constitue maintenant le tampon d'hybridation. L'hybridation dure 16 heures à 42°C.

Les filtres sont ensuite lavés pour éliminer l'hybridation non-spécifique. Premièrement 3 fois 20 min à température de la pièce dans une solution de SSC 6X, SDS 0,1% et ensuite 2 fois 10 min à 58°C dans une solution de chlorure de

tetraméthylammonium (TEMAC) 3 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, SDS 0,1%. Le TEMAC élimine le troisième lien entre les bases G et C. La température de dénaturation devient donc dépendante de la longueur de l'oligonucléotide et de la concentration en sels. La valeur de 58°C est déterminée en enlevant 5°C à la température de dénaturation (Td) de l'oligonucléotide déterminée en utilisant la table de Wood *et al.* (1985). Les filtres sont ensuite exposés avec un film photo (Kodak X-OMAT AR) entre deux écrans intensifiants durant 3 à 16 heures. Le film est ensuite développé et les colonies ayant le plasmide contenant le gène entier, sont visualisées par une tache noire sur le film.

## 8.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES

### 8.1 Sous-clonage dans M13

Le séquençage des gènes mutants de la xylanase A exprimés dans *S. lividans* permet de démontrer qu'il n'y a pas eu d'autre mutation involontaire lors du sous-clonage de *E. coli* à *Streptomyces lividans*, et en même temps, de s'assurer que la mutation prévue est encore présente dans le gène. Il s'agit donc de digérer le plasmide pIAF18 ou pIAF81 (fragment *SphI* dans l'orientation inverse) possédant la mutation dans le gène *xlnA* avec les enzymes de restriction *SphI* et *BamHI*, ce qui libère un fragment de 2,5 kpb comprenant tout le gène. Le fragment de 2,5 kpb est élué et purifié du gel d'agarose 0,7% dans le tampon TAE 1X avec la trousse "Qiaex" de Qiagen ou avec la trousse "Band

Prep" de Pharmacia qui sont basées sur le même principe. Par la suite, on digère M13mp18 et M13mp19 (Pharmacia) avec *SphI* et *BamHI* et on inactive les enzymes en chauffant 20 min à 85 °C selon les instructions de Pharmacia. Ensuite, on fait la ligation entre le vecteur M13 digéré et le fragment *SphI-BamHI* à séquencer avec la ligase du phage T4 de Pharmacia dans un volume final de 20  $\mu$ L.

## 8.2 Transfection

Des cellules compétentes de la souche *E.coli* DH11S sont préparées selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1985) et transfectées avec 5  $\mu$ L de la solution de ligation. Les cellules transfectées sont mélangées dans 3 mL de gélose molle (Bacto-tryptone (Difco); 10 g, NaCl; 8 g, Bacto-agar (Difco); 8 g dans un litre d'eau distillée) auxquels 300  $\mu$ L de cellules de fond *E.coli* DH11S provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle, 10  $\mu$ L d'IPTG 100mM et 50  $\mu$ L de Xgal 2% dans du diméthylformamide (DMF) sont ajoutés. Le mélange est aussitôt réparti sur une plaque de milieu H solide. On laisse le milieu gélifier de 15 à 30 min à la température de la pièce et on incube 16 heures à 37°C.

## 8.3 Production et purification de l'ADN simple brin

Les colonies blanches sont repiquées avec des cure-dents stériles dans 1,5 mL de milieu 2xTY contenant un inoculum de 1% de cellules DH11S provenant d'une culture de



16 heures. On incube 5 à 6 heures à 37°C avec agitation. Ensuite, la culture est transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et centrifugée 10 min à 15 000 x g. Environ 1 mL du surnageant contenant les particules phagiques est transvidé dans 250 µL d'une solution de PEG 6000 20%-NaCl 2,5 M, mélangé et incubé à 4°C au moins 60 min. Le culot de cellules ainsi que le surnageant phagique restant sont conservés à 4°C pour l'isolement de la forme répliquative du phage dans la cellule infectée. Après l'incubation à 4°C, les phages sont récupérés en centrifugeant 10 min à 15 000 x g. Après avoir séché le culot à l'air, celui-ci est dissout dans 100 µL de tampon Tris-EDTA (TE: Tris-HCL 10 mM et EDTA 1 mM, pH 8). Pour extraire les protéines et les impuretés, 50 µL de phénol saturé sont ajoutés, le mélange est agité 10 sec. et incubé 15 min à la température de la pièce. 50 µL de chloroforme sont ensuite ajoutés et après avoir agité, on incube 5 min à la température de la pièce. La phase aqueuse contenant l'ADN est ensuite récupérée en centrifugeant 5 min à 15 000 x g et transférée dans un tube neuf. L'ADN est précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95% pendant 30 min à -20°C. L'ADN est récupéré par une centrifugation de 15 min à 15 000 x g, séché et resuspendu dans 30 µL d'eau distillée.

#### 8.4 Protection à la nucléase S1

Pour vérifier que l'ADN simple brin contient le fragment *SphI-BamHI*, une expérience de protection à la nucléase S1 est utilisée. La méthode consiste en l'hybridation de 1 µL d'ADN simple brin provenant du sous-clonage dans M13mp18 avec

1  $\mu\text{L}$  du brin complémentaire provenant de M13mp19. Pour faciliter l'hybridation, 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 2 M est ajouté dans un volume final de 8  $\mu\text{L}$ , complété avec de l'eau distillée, et le tube est placé dans un bain d'eau à 90°C et lentement refroidi à la température de la pièce. Ensuite, il s'agit de centrifuger 5 secondes, d'ajouter 1  $\mu\text{L}$  de tampon S1 10X (NaAcétate 0,5 M, pH 4,5, ZnSO<sub>4</sub> 45 mM) et 1  $\mu\text{L}$  de nucléase S1 (diluée à 2 U/ $\mu\text{L}$  avec du tampon S1 1X). Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. La nucléase S1 digère l'ADN simple brin présent, mais pas l'ADN double brins. Finalement, 3  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement pour électrophorèse sont ajoutés et l'ADN est séparé sur un gel d'agarose 0,7%. Où il y a eu hybridation, les fragments sont protégés de l'attaque de la nucléase S1 et un fragment de 3,2 kpb est observé sur le gel d'agarose.

## 8.5 Séquençage du gène de la xylanase A

L'ADN simple brin est ensuite séquençé selon la méthode de Sanger en utilisant différents oligonucléotides produits par le "Gene Assembler II" de Pharmacia-LKB.

## 9.0 PRODUCTION DE L'ENZYME

### 9.1 Conditions de culture

#### 9.1.1 *S. lividans*

Toutes les productions des xylanases A mutantes se font dans un milieu 14

contenant  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g; solution de sels minéraux ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 140 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 160 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 500 mg;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 200 mg dissous dans 100 mL d'eau distillée), 1 mL et Tween 80, 2mL dans un litre d'eau distillée. On obtient un milieu à pH 7,3 avant autoclavage. Le milieu est ensuite réparti dans des fioles Erlenmeyer de 2 L à raison de 400 mL par fiole. Après autoclavage, on ajoute 16 mL d'une solution stérile de D-xylose (25%), 2,4 mL d'une solution de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (5%), 4 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (3%) et 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de thiostrepton. L'inoculum de 8% provenant d'une préculture en TSB est ajouté et incubé 72 heures à 34 °C dans un incubateur à 240 rpm (Bertrand *et al.*, 1989)

### 9.1.2 *E.coli*

La production est faite dans 25 mL de milieu 2xTY contenant de l'ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et du xylose (0,5%). Un inoculum de 1% (v/v) provenant d'une culture de 16 heures dans le milieu 2xTY avec ampicilline est utilisé. La production dure de 6 à 8 heures à 37°C à 240 rpm.

## 9.2 Récupération de l'enzyme

### 9.2.1 *S. lividans*

Comme la xylanase A est sécrétée, on récupère le surnageant de culture par une centrifugation de 30 min à 11 300 x g à 4°C dans des bouteilles de 500 mL suivie d'une filtration sur laine de verre. Les protéines totales sont précipitées dans trois volumes

d'éthanol 95% froid en ajoutant doucement environ 200 mL de surnageant à toutes les 10 min avec une légère agitation. Le précipité sédimente pendant au moins 16 heures à 4°C. Un maximum de surnageant d'éthanol est enlevé par siphonnage et le précipité est récupéré à l'aide d'une centrifugation de 30 min à 11 300 x g à 4°C. Le culot de protéines est par la suite transféré sur un entonnoir de verre fritté et séché à l'acétone en écrasant la poudre. L'extrait brut de protéines est séché à l'air de 24 à 48 heures, pesé et conservé à 4°C jusqu'à la purification de l'enzyme.

### 9.2.2 *E.coli*

La fraction périsplasmique d'une culture de *E.coli* est isolée selon la méthode décrite par Ames *et al.* (1984). Les cellules provenant d'une culture de 25 mL sont récupérées par une centrifugation de 10 min à 10 000 x g. Le surnageant est décanté et le culot séché sur un papier absorbant. Le culot est ensuite resuspendu dans 200 µL de chloroforme et incubé 15 min à la température de la pièce. Ensuite, deux mL de tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0 contenant de l'azotate de sodium (0,05%) sont ajoutés. Le tout est transféré dans un tube Corex de 15 mL et centrifugé 10 min à 10 000 x g. Les protéines périsplasmiques sont récupérées dans la phase aqueuse, aliquotées et congelées à -20°C.

## 10.0 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

### 10.1 Tests quantitatifs

#### 10.1.1 Sucres réducteurs

La méthode développée par Miller *et al.* (1960) mesure la quantité de sucres réducteurs libérés avec l'acide dinitrosalicylique (DNS) par rapport à une courbe standard de D-xylose. Le test est fait dans un volume final de 1 mL contenant 0,5% de xylane dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0. Après avoir préincubé le substrat 3 min à 60°C, 100  $\mu$ L d'enzyme sont ajoutés pour démarrer la réaction. Le test dure 10 min à 60°C avec agitation. La réaction est arrêtée dans un bain d'eau glacée en ajoutant un mL d'une solution de DNS (H<sub>2</sub>O, 700 mL; NaOH, 10 g; acide dinitrosalicylique, 10 g; phénol, 2 g; sodium potassium tartrate, 200 g; complétée à un litre et conservée à l'obscurité à la température de la pièce) contenant du sulfite de sodium (0,05%) qui est ajouté juste avant utilisation. Les échantillons sont bouillis 15 min, refroidis et la densité optique (D.O.) est lue au spectrophotomètre à 575 nm, ou à 540 nm si les échantillons sont lus dans des plaques de 96 puits. Un témoin d'échantillon est utilisé pour déterminer le bruit de fond où la solution d'enzyme est ajoutée après avoir arrêté la réaction. La différence entre la D.O. de l'échantillon et la D.O. de son témoin respectif est employée pour calculer la quantité de sucres réducteurs libérés. Pour ce calcul, la courbe standard de xylose est utilisée. Des quantités de D-xylose variant de 1 à 6  $\mu$ moles pour le test lu à 575 nm et de 0,4 à 1,4  $\mu$ mole pour le test lu à 540 nm sont utilisées pour les courbes standards. Une unité enzymatique internationale (U.I.) correspond à une micromole de

sucres réducteurs libérés par minute.

### 10.1.2 Hydrolyse du PNPC

L'hydrolyse du *para*-nitrophényl- $\beta$ -D-cellobioside (PNPC de Sigma) est effectuée dans un tube éprouvette dans un volume final de un mL contenant une concentration finale de PNPC de 1 mM dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0. La réaction est amorcée en ajoutant 100  $\mu$ L de la dilution de l'enzyme à tester. L'hydrolyse est réalisée avec agitation à 50°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 mL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 M. Le contenu des tubes est mélangé, et la D.O. est lue à 405 nm. Les échantillons sont lus contre un témoin ne contenant pas d'enzyme et les valeurs de D.O. sont rapportées sur une courbe standard de *para*-nitrophénol.

### 10.2 Test qualitatif

Pour évaluer l'activité enzymatique des xylanases de façon qualitative, on utilise une plaque du milieu RBB-xylane (pour composition, voir plus haut) dans laquelle des puits de 0,5 cm de diamètre sont creusés. L'échantillon est déposé au fond d'un puits et la plaque est incubée à 40°C. L'activité enzymatique est observée par l'apparition d'une zone claire d'hydrolyse autour du puits et cette activité peut être appréciée par la taille et la clarté de la zone d'hydrolyse.

## 11.0 PURIFICATION DES ENZYMES

### 11.1 Dialyse

Avant de passer un échantillon sur une colonne échangeuse d'ions, il faut s'assurer que la concentration de sels dans l'échantillon est égale à celle du tampon, car la concentration en sels influence la liaison des protéines à la colonne. Deux à trois grammes d'extrait brut sont solubilisés dans environ 150 mL de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, froid et agités doucement pendant environ 30 min en brisant les agrégats. Les particules insolubles sont éliminées en centrifugeant la suspension 20 min à 21 300 x g à 4°C. Le surnageant limpide est décanté directement dans un sac à dialyse SpectraPor (Spectrum) de "molecular weight cut-off" de 6-8 kDa de 32 mm de largeur, pré-traité par la compagnie et rincé à l'eau déionisée Milli-Q (Millipore). La solution est dialysée 48 heures dans trois fois 4 litres d'un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 à 4°C qui est remplacé après 2 et 12 heures. Pour s'assurer que l'échantillon est assez dialysé, on compare sa conductivité avec celle du tampon seul.

### 11.2 Échangeurs d'ions

La colonne échangeuse d'anions AP2 DEAE 15HR (Waters) est montée sur l'appareil HPLC de Waters (Millipore) modèle 510. Le contre-ion est accroché à la colonne en passant une solution de NaCl 1 M dans du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5,

à un débit de 8 mL/min. Avant d'injecter l'échantillon, la colonne est équilibrée dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, à un débit de 8 mL/min jusqu'à ce que la conductivité à la sortie soit égale à la conductivité initiale. Le débit est amené à 0. Pour charger l'échantillon sur la colonne, l'échantillon dialysé est filtré sur un filtre (Acrodisc, Gelman Sciences) de 0,45  $\mu\text{m}$ . L'adsorption de l'échantillon, environ 50 mL, est effectuée à un débit de 2,5 mL/min en position de chargement. La colonne est ensuite lavée avec 1% de la solution 1 M NaCl dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, et 99% de tampon Tris seulement à un débit de 3 mL/min pour éliminer les protéines qui ne s'accrochent pas à la colonne, c'est-à-dire jusqu'à ce que la ligne de base de l'intégrateur revienne à zéro. Le débit est augmenté à 8 mL/min avant de sélectionner le programme de gradient d'élution de l'appareil "Automated Gradient Controller" de Waters, modèle 680 (Tableau 4). Pour démarrer le programme de séparation, l'injecteur est placé en position d'injection (temps = 0 min).

Tableau 4: Programme d'élution de la xylanase A sur la colonne AP2 DEAE 15 HR.

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B	Courbe
initial	8	95	5	---
5	8	85	15	6
15	8	85	15	11
55	8	81	19	6
60	8	0	100	6
75	8	0	100	11
80	8	100	0	6



Les fractions sont récupérées à l'aide du collecteur de fractions Retriever II de ISCO à toutes les 30 secondes. L'élution des protéines est suivie par absorbance à 280 nm sur le détecteur U.V. de Waters, modèle 441. La colonne est lavée avec 100% de la solution NaCl 1 M dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, à 8 mL/min jusqu'à ce que la ligne de base revienne à zéro et rééquilibrée à 8 mL/min dans 100% de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, jusqu'à conductivités égales. La colonne est maintenant prête pour une nouvelle séparation.

Les fractions contenant la xylanase A, déterminées par SDS-PAGE sur "Phast System" de Pharmacia (voir dans "Analyse des protéines") et par le profil d'élution, constitué du graphique de la densité optique à 280 nm en fonction du temps, sont dialysées contre 2 fois 20 litres d'eau Milli-Q, 48 heures, à 4 °C dans un sac à dialyse de "molecular weight cut-off" de 6-8 kDa pour enlever les sels contenus dans le tampon d'élution. Le dialysat est lyophilisé avec un appareil à lyophilisation Virtis (no. 10-147 MR-BA).

### 11.3 Tamis moléculaire

L'enzyme en poudre est dissoute dans du tampon phosphate de sodium (NaP) 0,1 M, pH 7,0, froid à une concentration d'environ 16 mg/mL et centrifugée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL avant d'être filtrée avec une seringue de 1 mL à travers un filtre ACRO™ LC13 0,45 µm de Gelman Sciences. Les deux colonnes SW300 en série sont

montées sur l'appareil HPLC de Waters modèle 541 et lavées avec deux volumes d'eau Milli-Q filtrée à 0,5 mL/min. Les colonnes sont ensuite équilibrées dans le tampon NaP 0,1 M, pH 7,0, à un débit de 0,5 mL/min. L'échantillon à purifier est injecté à raison de 250  $\mu$ L (environ 4 mg) par injection et les différentes fractions sont récupérées avec le collecteur de fraction Retriever II réglé à 30 secondes par fraction. Après environ 55 min, lorsque toutes les protéines sont passées, les colonnes sont prêtes pour une nouvelle injection. Les fractions pures déterminées par SDS-PAGE et grâce au graphique de la  $D.O._{280\text{ nm}}$  en fonction du temps sont réunies et dialysées contre 2 fois 20 litres d'eau déionisée Milli-Q à 4°C durant 48 heures dans un sac à dialyse de "molecular weight cut-off" de 6-8 kDa. Le dialysat est ensuite lyophilisé. L'enzyme pure est pesée et conservée à -70°C pour prévenir sa dénaturation.

## 12.0 ANALYSE DES PROTÉINES

### 12.1 Dosage des protéines

Les protéines totales sont dosées en utilisant la méthode développée par Lowry *et al.* (1951) en utilisant la fraction V de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard. Selon la concentration de protéines dans l'échantillon, 25, 50 ou 100  $\mu$ L de surnageant de culture ou d'échantillon sont utilisés pour faire le dosage.

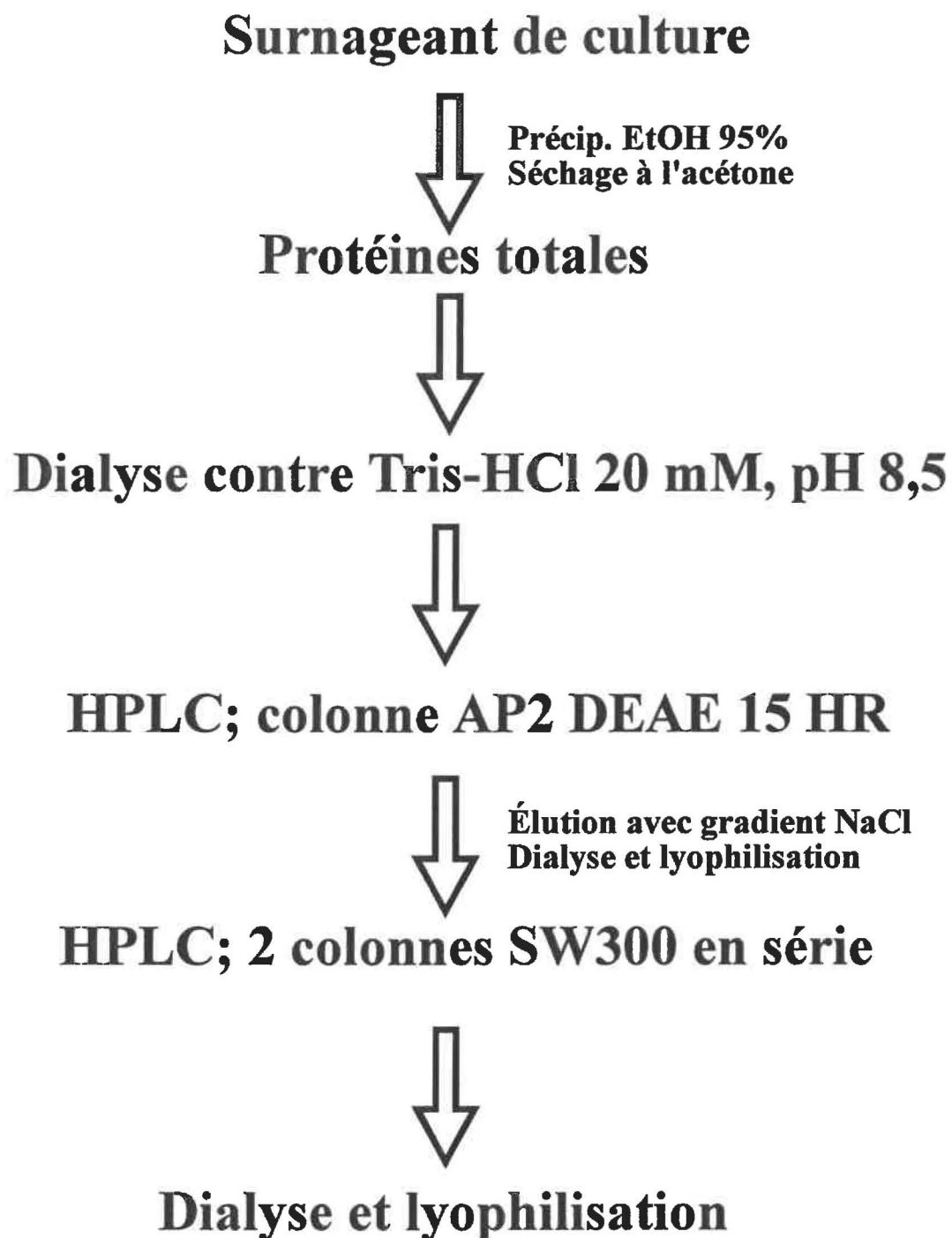


Figure 6: Résumé des étapes de purification de la xylanase A de *Streptomyces lividans*.

## 12.2 SDS-PAGE

Deux techniques ont été utilisées pour les SDS-PAGE. Premièrement, certaines ont été faites sur Phast Gel de 12,5% de Pharmacia avec l'appareil Phast System de Pharmacia. 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont ajoutés à 5  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement 3X (concentration finales: SDS, 2,5%; Tris-HCl-EDTA, 10 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol, 5%; bleu de bromophénol, 0,0075% dans de l'eau distillée), et bouillis 7 min. Quatre  $\mu\text{L}$  sont chargés sur le peigne ("Sample Applicator" de 4 $\mu\text{L}$ , Pharmacia) et séparés jusqu'à 70 mV·h selon le programme de l'appareil. La coloration du gel au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie se fait selon la méthode du "Development Unit" de l'appareil Phast System de Pharmacia en utilisant les standards de poids moléculaires "Electrophoreses calibration kit" de Pharmacia-LKB comprenant: la phosphorylase b de 94 kDa, l'albumine de sérum bovin de 67 kDa, l'ovalbumine de 43 kDa, l'anhydrase carbonique de 30 kDa, l'inhibiteur de trypsine de soya de 20,1 kDa et l' $\alpha$ -lactalbumine de 14,4 kDa. Deuxièmement, pour la détection de la xylanase A avec les anticorps (section 12.4), les protéines ont été séparées par SDS-PAGE de 12,5% en utilisant la technique décrite par Laemmli *et al.* (1970).

## 12.3 Détermination du point isoélectrique

Les échantillons à analyser sont séparés sur un gel contenant des ampholytes de pH 3 à 10 (Phast Gel de Pharmacia) dans l'appareil Phast System. Quatre  $\mu\text{L}$

d'échantillon sont déposés sur le gel avec l'applicateur et la séparation est effectuée selon le programme de l'appareil pour la détermination du point isoélectrique. Le gel est ensuite coloré en suivant les indications de la compagnie.

#### 12.4 Immunobuvardage

La technique pour le transfert "Western" et la réaction avec les anticorps est basée sur la publication de Towbin *et al.* (1979). Les protéines du gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (S&S NC<sup>MC</sup>, Schleicher et Schuell, 45  $\mu\text{m}$ ) en utilisant un courant électrique généré par l'appareil Novablot-Multiphor II de Pharmacia-LKB à 0,8 mA par  $\text{cm}^2$  de gel pendant une heure. Les sites non spécifiques de la membrane séchée sont bloqués par une incubation dans 50 mL d'une solution fraîche de tampon phosphate salin (PBS)-lait écrémé 3% pendant 30 min. La solution est ensuite remplacée par 35 mL de PBS-lait écrémé 3% auxquels 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps polyclonaux anti-xylanase A y sont ajoutés. Les anticorps réagissent deux heures à la température de la pièce avec légère agitation. La membrane est lavée trois fois 10 min avec 50 mL de PBS-triton X-100 0,5% et une fois 10 min avec 50 mL de PBS. Quatre  $\mu\text{L}$  de protéine A-<sup>125</sup>I (Amersham) sont ajoutés à 35 mL de la solution PBS-lait écrémé 3% et la membrane est incubée 16 heures à la température de la pièce avec une légère agitation. La membrane est ensuite lavée comme décrit précédemment et séchée avant d'être exposée entre deux écrans avec un film Kodak X-OMAT AR environ 72 heures à -70°C. Le film est ensuite développé pour visualiser les bandes radioactives.

## 13.0 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE

### 13.1 Détermination du pH optimal

L'activité enzymatique est dosée sur une échelle de pH allant de 4 à 8 à l'aide du test des sucres réducteurs pendant 10 min à 60°C en utilisant une U.I. de l'enzyme. Le tampon citrate de sodium 50 mM est utilisé de pH 4 à pH 7 et un tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  50 mM est utilisé de pH 6,5 à pH 8. On s'assure que le tampon utilisé n'affecte pas l'activité enzymatique en entrecoupant les courbes de pH des différents tampons.

### 13.2 Détermination de la température optimale

La température optimale de la réaction est déterminée dans du tampon citrate de sodium 50 mM à pH 6,0 pendant 10 min en utilisant une U.I. de l'enzyme à des températures variant de 30 à 78°C par la méthode des sucres réducteurs (section 10.1.1).

### 13.3 Thermostabilité en présence de substrat

La thermostabilité est évaluée en incubant une dilution de l'enzyme dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0, en présence de xylane de bouleau 3% dans un volume final de 5 mL. A différents temps, on prélève 0,5 mL du mélange réactionnel qui est transféré dans une éprouvette contenant 0,5 mL d'une solution de DNS (voir test

des sucres réducteurs). La solution est bouillie 15 min et la densité optique à 540 nm est ensuite lue au spectrophotomètre contre un "blanc" contenant seulement du tampon et contre un témoin d'échantillon ne contenant pas l'enzyme. L'enzyme est considérée stable tant que l'hydrolyse en fonction du temps reste linéaire.

#### 13.4 Thermostabilité en absence de substrat

La thermostabilité des enzymes est évaluée en pré-incubant une solution de 1 mg/mL de l'enzyme dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0. Des échantillons sont prélevés à différents temps, dilués dans du tampon et l'activité enzymatique résiduelle est dosée par la méthode des sucres réducteurs (section 10.1.1).

#### 13.5 Détermination des paramètres cinétiques

Pour obtenir les constantes cinétiques, il s'agit de déterminer la vitesse initiale d'hydrolyse à différentes concentrations de substrat. La représentation graphique de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat permet de déterminer la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) ainsi que la vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_{max}$ ). Les paramètres cinétiques sont déterminés par le programme Enzfitter version 1.03 (Elsevier). Le  $V_{max}$  est la vitesse d'hydrolyse lorsque l'enzyme est complètement saturée en substrat. Le  $K_m$  indique l'affinité de l'enzyme envers le substrat, et représente graphiquement la concentration en substrat qui donne la moitié de la vitesse maximale

( $V_{max}$ ). Pour la détermination de ces paramètres cinétiques, des concentrations de xylane de bouleau (Sigma no.X-0205, lot: 69F-0410) variant de 0,25 à 15 mg/mL dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0, sont utilisées. Les vitesses initiales sont déterminées à chacune des concentrations de substrat en mesurant la quantité des sucres réducteurs libérés au cours du temps. Il est très important de se situer dans la zone de linéarité de l'enzyme, c'est-à-dire que la production des sucres réducteurs doit être fonction linéaire du temps d'hydrolyse. L'évaluation de l'activité enzymatique est faite en utilisant la méthode des sucres réducteurs (section 10.1.1). La comparaison des constantes cinétiques entre les différents mutants de la xylanase A est une très bonne façon de connaître le rôle d'un acide aminé dans l'hydrolyse enzymatique.

#### 14.0 DÉTERMINATION DU MODE D'HYDROLYSE

##### 14.1 Profil d'hydrolyse sur HPLC

Le principe de la méthode, basée sur celle décrite par Kluepfel *et al.* (1990), est d'observer les produits d'hydrolyse de la réaction enzyme-substrat au cours du temps. Pour le xylane, la réaction est effectuée dans un volume final de 1 mL dans 0,5 % de xylane. L'enzyme est diluée à une concentration de 1 UI/mL (unité déterminée en utilisant le xylane de bouleau comme substrat) et 100  $\mu$ L (0,1 UI) sont ajoutés au mélange. Pour le xylopentaose, la réaction se passe dans un volume final de 150  $\mu$ L contenant 5 mM de xylopentaose avec une unité de l'enzyme. Dans les deux cas, l'incubation est faite à 60°C dans du tampon citrate de sodium 0,05 M à pH 6,0. Des échantillons de 100  $\mu$ L et de 30  $\mu$ L dans le cas du xylane et du xylopentaose respectivement, sont prélevés au



cours du temps, transférés dans des tubes Eppendorfs de 1,5 mL et immédiatement bouillis 10 min. Avant d'être injectés sur la colonne, les échantillons à analyser sont centrifugés 30 secondes et filtrés sur un filtre "Acro Disk" 0,45  $\mu\text{m}$  de Gelman Sciences avec une seringue de un mL. Les sucres contenus dans 10  $\mu\text{L}$  du filtrat sont séparés par HPLC (Waters, Millipore, modèle 510) en utilisant la colonne HPX 42A (300 x 7,8 mm) de BIO-RAD chauffée à 80°C avec comme éluant, l'eau Milli-Q (filtrée 0,45  $\mu\text{m}$  et dégazée) à un débit de 0,5 mL/min. Les différentes fractions sont détectées à l'aide d'un réfractomètre différentiel de Waters (Millipore) modèle 410 et intégrées par l'appareil Shimatzu CR4AX.

## 14.2 Détermination de la fréquence de clivage du xylopentaose

Cette méthode permet de déterminer quels sont les liens  $\beta$ -1,4 préférentiellement coupés par les xylanases, permettant ainsi la caractérisation de leur mode d'action vis-à-vis le xylopentaose. C'est une méthode qui a été développée par Biely *et al.* (1980 a,b, 1981 a,b).

### 14.2.1 Purification des oligoxylosides tritiés

Le mélange d'oligoxylosides tritiés est concentré jusqu'à un volume d'environ 75  $\mu\text{L}$  (entre 50 et 100  $\mu\text{L}$ ) sous un jet d'azote ultra pur (Medigas). Le mélange ainsi qu'un standard sont ensuite chargés à la base d'une plaque de silice 20 x 20 cm (Merck,

Darmstadt, Allemagne) et chromatographiés de 7 à 10 heures dans un solvant (acétate d'éthyle : acide acétique : eau, 3 : 2 : 2). La plaque est séchée 16 heures sous la hotte chimique et chromatographiée dans du solvant frais. A la fin de la séparation, la partie de la plaque contenant les standards, xylose à xylopentaose (X1 à X5), est découpée et leurs positions sont révélées en versant une solution d'acide phtalique (1% dans l'acétone), à laquelle on ajoute 9 mL d'aniline par litre sur la plaque. Cette opération est suivie d'une incubation de 5 min à 100°C. La partie de la plaque contenant les oligoxylosides tritiés est exposée sur un film Kodak X-OMAT AR entre deux écrans intensifiants à la température de la pièce durant une semaine. Après avoir développé le film, chacune des fractions radioactives est découpée. Le contenu de la plaque est élué en y faisant migrer de l'eau Milli-Q. L'eau passe d'un tube éprouvette, par un papier filtre Whatman #1, à la plaque et à un autre tube éprouvette situé plus bas que le niveau d'eau initial. L'opération se fait dans un contenant fermé à la température de la pièce et dure environ deux jours. Les oligoxylosides étant très solubles dans l'eau vont migrer avec le front d'eau et tomberont avec les premières gouttes. Une deuxième purification peut être nécessaire dans le cas des oligoxylosides de degré de polymérisation supérieur à trois.

#### 14.2.2 Détermination de la fréquence de clivage du xylopentaose

Pour déterminer la fréquence de clivage du xylopentaose par les xylanases, du xylopentaose linéaire non marqué à une concentration finale de 1 mM ainsi qu'une petite

quantité de xylopentaose tritié à son extrémité réductrice, servant de traceur dans la réaction, sont utilisés. On suppose ainsi que le X5 radioactif sera reconnu de la même façon que le X5 froid. La réaction enzymatique est effectuée dans un tube Eppendorf de 0,5 mL contenant le xylopentaose dans du tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0, ainsi qu'une quantité d'enzyme équivalente à 0,2 unité par mL (unités déterminées selon la méthode décrite à la section 2.10.1.1 avec du xylane de bouleau) dans un volume final de 10  $\mu$ L à 50°C. Des échantillons de 1,5  $\mu$ L sont prélevés au cours du temps et déposés sur une couche mince de cellulose de 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les différents produits d'hydrolyse de chacun des échantillons sont séparés par une chromatographie dans un solvant composé d'acétate d'éthyle / d'acide acétique / d'eau (3 : 2 : 2, v/v/v) pendant 7 à 10 heures. Ensuite, la plaque de cellulose est séchée sous la hotte chimique durant 30 min. C'est à l'aide de la position de migration des standards que chacune des fractions des produits d'hydrolyse (X1 à X5) est découpée. La radioactivité des différentes fractions est déterminée dans un contenant à scintillation dans lequel 3 mL de cocktail à scintillation SigmaFluor<sup>MC</sup> (Sigma Chem. Co.) sont ajoutés. Le compteur à scintillation Beckman UV1701 est utilisé pour le comptage de la radioactivité. La fraction de radioactivité d'un produit d'hydrolyse est déterminée par rapport à la radioactivité totale de l'échantillon (somme des produits de X1 à X5) au cours du temps. L'augmentation de la fraction d'un produit d'hydrolyse en fonction de la fraction du xylopentaose hydrolysée permet d'obtenir une droite dont la pente représente la fréquence de clivage du lien  $\beta$ -1,4 responsable de la production de ce produit d'hydrolyse.

### III. RÉSULTATS

La partie "Résultats" est divisée en fonction des étapes suivies par l'ensemble des protéines mutantes. Dans chacune des sections, on retrouve les résultats obtenus pour chacune des protéines mutantes pour un type d'analyse.

#### 1.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES

Le fragment *NotI-EcoRI* provenant du plasmide pIAF217 correspondant à chacun des mutants a été remplacé dans le plasmide pAM19.1. Cette étape permet ainsi de récupérer la région promotrice de la xylanase A chez *Streptomyces lividans*, partie qui avait été délétée pour permettre une meilleure expression chez *E.coli* (Moreau, 1993). La souche de *E.coli* transformée par pAM19.1 exprime donc le gène de la xylanase A sous le contrôle de la région promotrice de *S. lividans*.

Dans l'étape suivante, il s'agissait de remplacer le gène de type sauvage de la xylanase A par le gène muté. Les fragments *SphI* de 3,2 kpb provenant d'une digestion des plasmides énumérés précédemment, purifiés par gradient de chlorure de césium, ont été utilisés pour une ligation dans le plasmide pIAF11, provenant d'une délétion de pIAF18, pré-traité à la phosphatase alcaline. La solution de ligation a ensuite servi à transformer la souche *S. lividans* IAF10-164. Le rendement de cette étape fut d'environ 5%, c'est-à-dire que seulement 5% des colonies transformées exprimaient un gène de la

Tableau 5: Liste des plasmides dérivés de pAM19.1 contenant les gènes mutants de la xylanase A de *S. lividans*.

Plasmide	Mutation	Référence
pAM19.1-D50N	Asp remplacé par Asn	ce travail
pAM19.1-W85H	Trp remplacé par His	ce travail
pAM19.1-H86K	His remplacé par Lys	ce travail
pAM19.1-H86W	His remplacé par Trp	ce travail
pAM19.1-D124N	Asp remplacé par Asn	Moreau <i>et al.</i> , 1994c
pAM19.1-D124E	Asp remplacé par Glu	Moreau <i>et al.</i> , 1994c
pAM19.1-N127D	Asn remplacé par Asp	ce travail
pAM19.1-E128Q	Glu remplacé par Gln	Moreau <i>et al.</i> , 1994c
pAM19.1-R156E	Arg remplacé par Glu	ce travail
pAM19.1-T235Y	Thr remplacé par Tyr	ce travail
pAM19.1-E236Q	Glu remplacé par Gln	Moreau <i>et al.</i> , 1994c
pAM19.1-D270N	Asp remplacé par Asn	ce travail

xylanase A muté, les autres n'ayant pas inséré le fragment *SphI* et n'exprimant donc pas la protéine de 43 kDa. Les transformants positifs pouvaient être facilement identifiés sur milieu solide RBB-xylane où ils formaient dans tous les cas une zone d'hydrolyse du substrat. Les colonies possédant le gène de la xylanase A pouvaient avoir inséré le fragment de 3,2 kpb dans les deux orientations possibles puisque ce fragment contenait le gène entier ainsi que la région promotrice. L'orientation de ce fragment était déterminée par une digestion *Bam*HI suivie d'une séparation sur gel d'agarose 0,7% comme décrit dans la section 6.0 de la partie "Matériel et Méthodes". pIAF81 et ses dérivés contiennent les mêmes éléments que pIAF18, sauf que l'orientation du fragment *SphI* de 3,2 kpb est inversée.

Dans le cas des mutants inactifs, E128Q et E236Q, le rendement de l'insertion du fragment *SphI* a été de seulement 1% dans les conditions de ligation utilisées. Les transformants positifs, ont été identifiés par hybridation des colonies et l'autoradiogramme est présenté à la Figure 6.

Le rendement de transformation a été comparé avec un contrôle négatif où le plasmide pIAF11 traité à la phosphatase était ligué sur lui-même et utilisé pour transformer la souche *S. lividans* IAF10-164. Les contrôles contenaient autant de colonies que les échantillons. La phosphatase alcaline n'avait donc pas eu l'effet désiré. La description des plasmides et des souches formées lors de cette étape est donnée dans le Tableau 6.

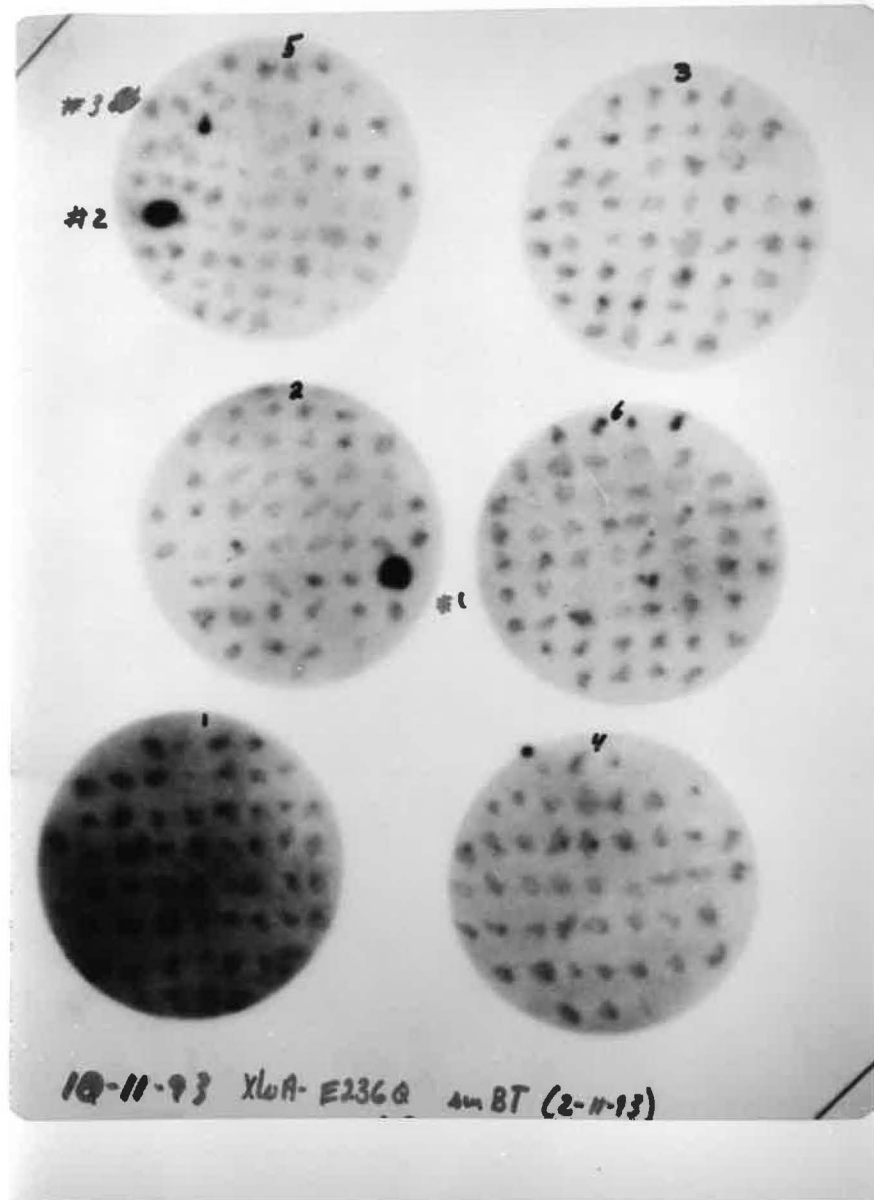


Figure 7: Autoradiogramme de l'hybridation de colonies des transformants de la souche de *S. lividans* IAF10-164 dans le cas du mutant E236Q. Les grosses colonies noires expriment le gène de la xylanase A-E236Q.

Tableau 6: Liste des souches exprimant un dérivé du plasmide pIAF18 contenant un gène muté de la xylanase A de *S. lividans*.

Souche	Plasmide
IAF18	pIAF18
IAF18-D50N	pIAF18-D50N
IAF18-W85H	pIAF81-W85H
IAF18-H86K	pIAF18-H86K
IAF18-H86W	pIAF18-H86W
IAF18-D124E	pIAF81-D124E
IAF18-D124N	pIAF81-D124N
IAF18-N127D	pIAF81-N127D
IAF18-E128Q	pIAF81-E128Q
IAF18-R156E	pIAF81-R156E
IAF18-T235Y	pIAF81-T235Y
IAF18-E236Q	pIAF81-E236Q
IAF18-D270N	pIAF18-D270N

## 2.0 PRODUCTION DES ENZYMES

Pour vérifier la production d'enzyme par chacune des souches dans le milieu 14, l'activité enzymatique des surnageants de culture a été suivie à 34, 37 et 40°C de 48 à 120 h. Ce milieu est optimal pour la production de xylanase A sauvage. La quantité d'enzyme atteint un plateau après 48 h et augmente faiblement par la suite. Dans la majorité des cas, la production d'enzyme a une faible tendance à augmenter avec la température. Les souches exprimant une xylanase mutante se comportent de la même façon que la souche IAF18 portant le gène non modifié.



Tableau 7: Activité enzymatique déterminée par la méthode des sucres réducteurs sur les surnageants de culture des différentes souches à différents temps et températures d'incubation dans le milieu 14, contenant 1% xylose.

Souches	Activité enzymatique (UI/mL)											
	48 h			72 h			96 h			120 h		
	34°	37°	40°	34°	37°	40°	34°	37°	40°	34°	37°	40°
IAF-D50N	72	82	93	99	87	105	111	114	109	127	146	130
IAF-W85H	38	35	37	47	43	41	45	36	44	51	43	46
IAF-H86K	82	148	108	118	126	128	123	131	123	153	180	179
IAF-H86W	35	40	38	47	65	43	50	60	65	73	79	62
IAF-T235Y	85	118	111	136	140	133	137	139	147	143	147	144
IAF18	111	122	125	125	138	157	129	169	173	150	168	181
3131	2.3	2.7	1.8	1.5	1.6	1.8	<1	<1	<1	2.4	.5	.5

Suite à la production d'enzyme, les protéines totales contenues dans le surnageant de culture ont été précipitées à l'éthanol 95%, récupérées par centrifugation et séchées à l'acétone. La quantité de poudre brute de protéines ainsi que l'activité spécifique des surnageants de culture sont montrées dans le Tableau 8. Dans tous les cas, on obtient entre deux et trois grammes de poudre brute d'enzymes par litre de culture.

Tableau 8: Comparaison de l'activité spécifique des surnageants de culture et du rendement en poudre brute des différentes xylanases.

Enzyme	Activité spécifique (UI/mg)	% de la XlnA sauvage	Litres de culture	Quantité de poudre (g)
Xln A	120	100	---	---
D50N	107	89	6	19,8
W85H	34	28	6	20,1
H86K	51	43	6	12,8
H86W	30	25	10	21,6
N127D	6,1	5,1	6	20,0
E128Q	3,1	2,6	6	17,6
R156E	124	103	6	17,2
T235Y	48	40	6	12,7
E236Q	1,6	1,3	6	12,2
N270D	16	13	6	14,7

### 3.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES

La séquence entière du gène *XlnA-E128Q* a été vérifiée. Cette vérification a permis de montrer que la perte de l'activité enzymatique était causée par le remplacement de l'acide glutamique par une glutamine à la position 128 et qu'aucune autre mutation n'a été introduite durant le sous-clonage.

#### 4.0 PURIFICATION DES ENZYMES MODIFIÉES

La purification peut être divisée en trois cas différents: la purification des mutants actifs en utilisant l'échangeur d'ions, la purification des mutants en une seule étape n'utilisant pas l'échangeur d'ions, et la purification des mutants inactifs (E128Q et E236Q). Dans tous les cas, deux à trois g de l'enzyme brute ont été utilisés pour la purification et le calcul du rendement de purification tient compte de cette valeur.

Dans le cas des mutants D50N, W85H et N127D, on obtient un facteur de purification entre deux et trois et le rendement de purification est d'environ 15 %. Le faible rendement du mutant W85H a été causé par une perte au niveau de la concentration des protéines entre l'étape de la DEAE et le tamis moléculaire. Dans les trois cas, la perte de rendement se situe surtout au niveau de l'étape de l'échangeur d'ions DEAE.

Les mutants T235Y et D270N ont été purifiés en une seule étape. Le précipité à l'éthanol a été dissous directement dans le tampon citrate de sodium 50 mM, pH 6,0, filtré et injecté sur tamis moléculaire en utilisant le même tampon comme éluant. Les fractions de protéines récoltées sont ensuite concentrées par ultrafiltration. Dans les deux cas, le facteur de purification est plus grand que lorsqu'une étape d'échangeur d'ions précède le tamis moléculaire, c'est-à-dire que l'activité spécifique de l'enzyme purifiée par rapport à celle du surnageant de culture augmente plus lorsque l'enzyme est purifiée en une seule étape. Par contre, le rendement de purification est inférieur.

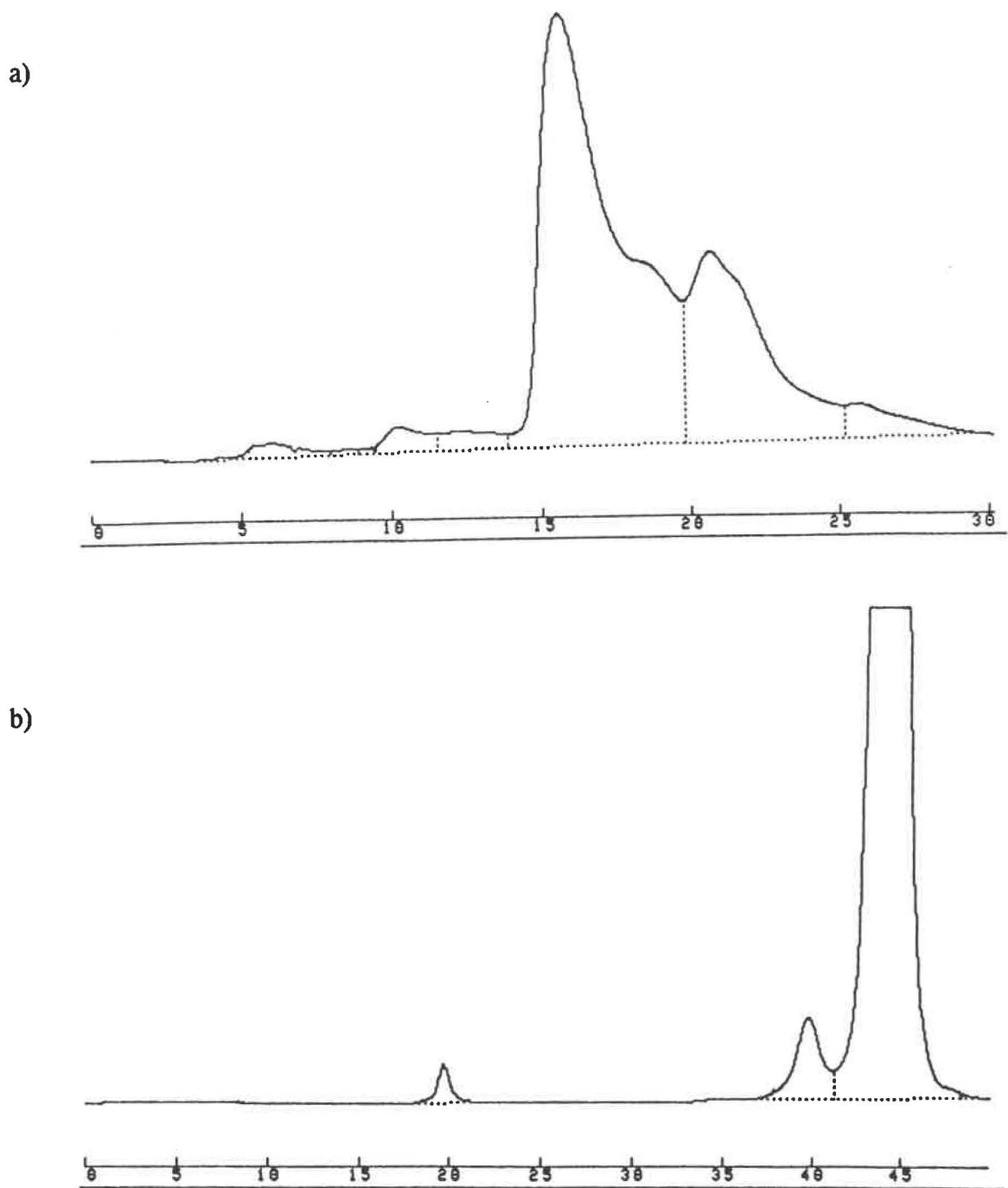


Figure 8: Profils d'élution typiques de la xylanase A par HPLC sur DEAE (a), suivie d'un tamis moléculaire (b).

Tableau 9: Tableau de purification des mutants de la xylanase A. DEAE-1 et DEAE-2 sont deux fractions différentes récoltées lors de cette étape (voir Figure 7).

## Xln A-D50N

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. spéc. (UI/mg)	Rendement
surnageant	5 800	140	1,16	120	100
dialyse	143	311	2,48	125	54
DEAE	156	83	0,765	108	16
dialyse	164	76	0,565	135	15
SW300	22	526	1,70	309	14

## Xln A-W85H

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. spéc. (UI/mg)	Rendement
surnageant	5 820	38	0,951	40	100
dialyse	193	111	1,22	91	65
DEAE	142	40	0,406	98	17,2
tamis	16	108	1,01	107	5,2

## Xln A-N127D

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. Spéc. (UI/mg)	Rendement
surnageant	5880	1,5	1,068	1,4	100
dialyse	186	8,0	1,844	4,3	56
DEAE-1	77	4,6	0,928	5,0	15,3
DEAE-2	88	2,7	0,476	5,7	17,6
tamis	13	14,2	3,208	4,4	15,4

## Xln A-T235Y

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. Spéc. (UI/mg)	Rendement
surageant	9 600	80	1,33	60.2	100
Tamis	2	930	3,64	256	8

## Xln A-D270N

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. Spéc. (UI/mg)	Rendement
surageant	5880	7	0,378	18,5	100
Tamis	1	3,1	0,18	173	0,02

## Xln A-E128Q

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act. spéc. (UI/mg)	Rendement
surageant	5880	3,66	0,81	4,52	100
dialyse	188	3,97	1,07	3,71	20
DEAE-1	63	1,74	0,78	2,23	3,0
DEAE-2	148	1,12	0,54	2,07	4,5
tamis	12	5,3	2,89	1,83	1,7

## Xln A-E236Q

Étape	Volume (mL)	Activité (UI/mL)	[prot] (mg/mL)	Act.Spéc. (UI/mg)	Rendement
surageant	5990	1,92	0,49	3,92	100
dialyse	188	2,64	1,02	2,59	17,5
DEAE-1	66	0,81	0,77	1,05	1,9
DEAE-2	96	0,65	0,41	1,59	2,2
tamis	9,5	2,6	2,73	0,952	1,0

Lors de la purification des mutants inactifs, l'activité spécifique diminuait à mesure que la purification avançait. Cela s'explique par l'élimination d'une certaine activité xylanasiq ue contaminante, possiblement due à l'expression chromosomique d'un faible taux de xylanases A, B ou C par la souche mutante IAF10-164. Dans le cas des mutants inactifs, le facteur de purification pourrait être calculé à l'inverse des enzymes actives, c'est-à-dire à la diminution de l'activité spécifique. Dans le cas des mutants de la xylanase A, E128Q et E236Q, le facteur de purification se situerait entre trois et quatre. Les rendements de purification présentés au Tableau 9 pour ces deux mutants reflètent donc l'élimination des contaminants.

## 5.0 CARACTÉRISATION DES ENZYMES PURIFIÉES

### 5.1 Activité spécifique

L'activité spécifique de chacune des enzymes mutantes de la xylanase A a été comparée à celle de la xylanase A sauvage en utilisant le xylane de bouleau comme substrat. Ces résultats sont montrés dans le Tableau 10. L'activité spécifique conserve les mêmes proportions par rapport à l'enzyme de type sauvage lorsque l'on utilise le xylane de glumes d'avoine comme substrat.

Tableau 10: Activité spécifique des enzymes mutantes purifiées, en utilisant le xylane de bouleau comme substrat.

Enzyme	Act. Spéc. (UI/mg)	% de XlnA
XlnA sauvage	441	100
D50N	324	73
W85H	88	20
N127D	7,7	2
E128Q	1,8	0,4
T235Y	256	58
E236Q	0,95	0,2
D270N	173	39

Certaines protéines mutantes ont été produites chez *E.coli* pour s'assurer que l'enzyme produite chez *S.lividans* possédait les mêmes caractéristiques que chez *E.coli*. Les activités spécifiques des enzymes produites par les deux organismes avec le xylane de bouleau et avec le PNPC étaient comparables. Par exemple, les xylanases W85H et N127D récupérées de l'espace périplasmique de *E.coli* étaient 5 et 50 fois moins actives, respectivement, que l'enzyme de type sauvage produite dans les mêmes conditions. Ces résultats, comparables à ceux obtenus avec la protéine purifiée, confirmaient que les xylanases produites par ces deux microorganismes possédaient les mêmes caractéristiques.



## 5.2 Caractéristiques physico-chimiques

L'analyse des protéines mutantes purifiées sur SDS-PAGE et par immunobuvardage montre, dans tous les cas, la présence d'une bande correspondant à une masse moléculaire de 43 kDa (Figures 9 et 10, respectivement). Les protéines mutées ont été placées sur des gels contenant des ampholytes de pH 3 à 9 pour la détermination de leur point isoélectrique. Aucun des mutants testés n'est plus acide que la xylanase A sauvage qui a un point isoélectrique de 5,1. Les mutants W85H et T235Y ont des points isoélectriques de 5,1 également, tandis que D50N, N127D, E128Q ET E236Q ont des valeurs de pI de 5,6, 5,5, 5,5 et 5,3, respectivement.

Pour démontrer que la perte d'activité observée chez les mutants E128Q et E236Q était causée par la mutation des résidus catalytiques proposés, et non par un changement de conformation de la protéine, il fallait montrer que la structure des protéines n'avait pas été modifiée par la mutation. La fluorométrie différentielle a été choisie et exécutée à l'Institut de Biotechnologie de Montréal dans le laboratoire du Dr. Robert Ménard sous la supervision du Dr. Éric Dufour. Les résidus tryptophane de la protéine sont excités à 295 nm et l'émission de photons est balayée dans un intervalle de longueur d'onde. À une même concentration de protéines (96 µg/mL), les spectres des mutants devraient être identiques à celui de la protéine sauvage (Figure 11).

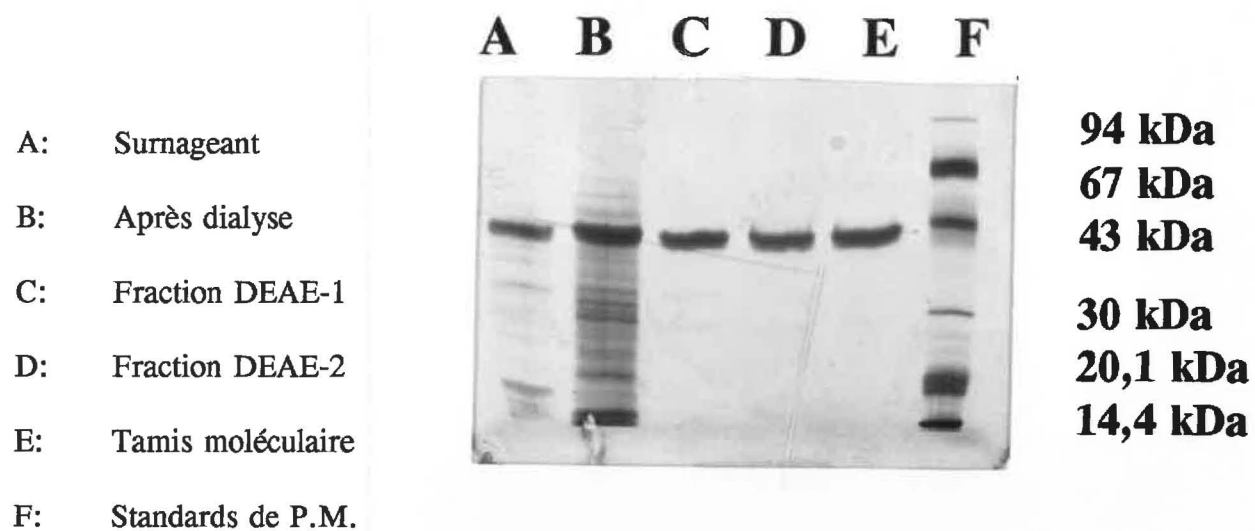


Figure 9: SDS-PAGE de chacune des étapes de purification du mutant N127D, coloré au nitrate d'argent.

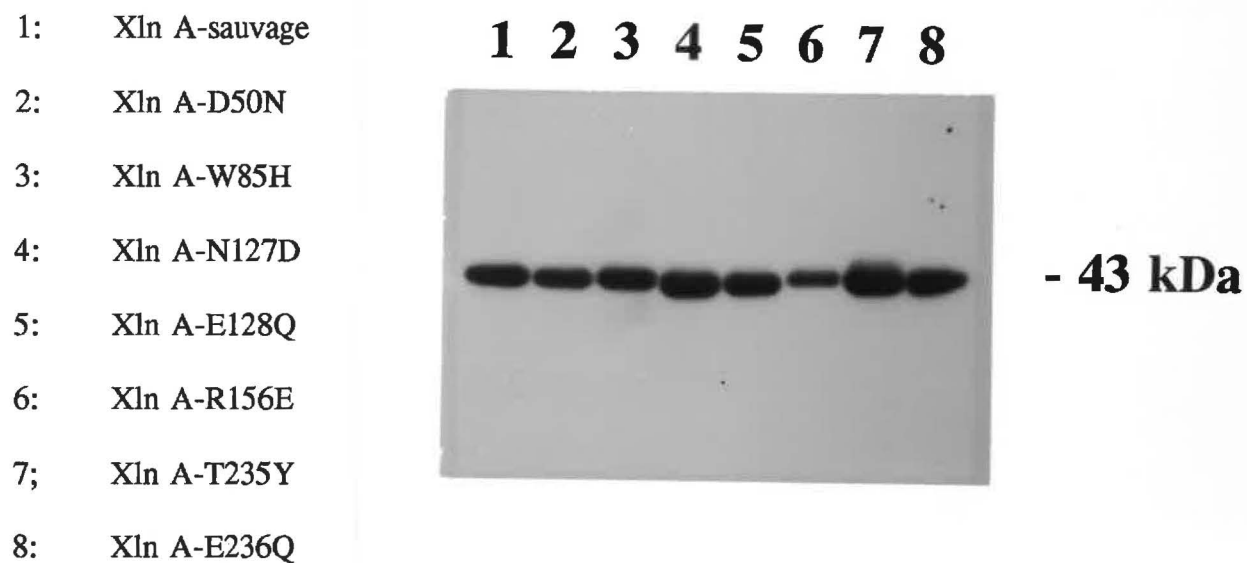


Figure 10: Immunobuvardage des protéines mutantes purifiées de la xylanase A.

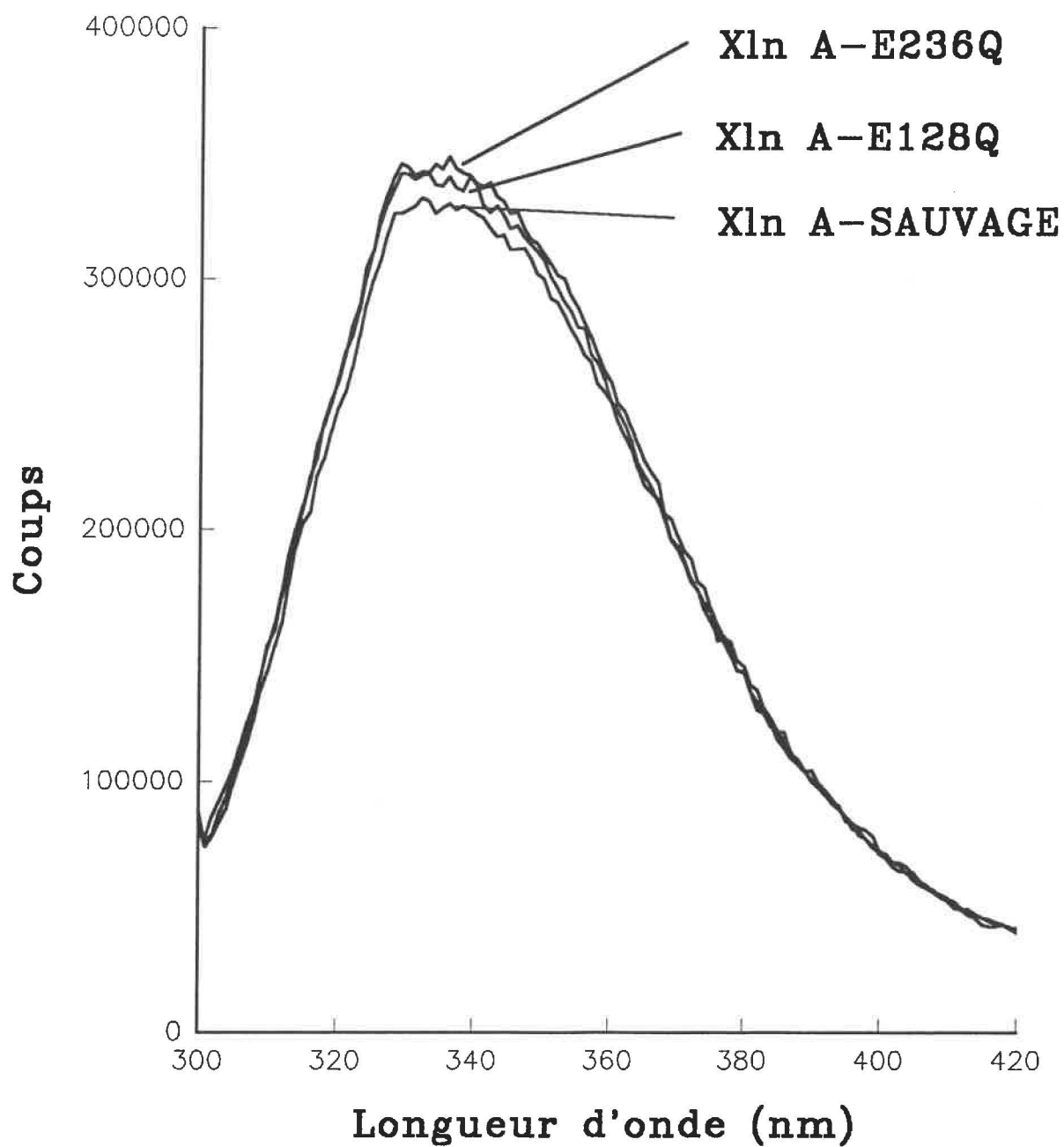


Figure 11: Spectres de fluorométrie différentielle de la xylanase A et des mutants E128Q et E236Q à une émission de 295 nm.

### 5.3 Température optimale

La température optimale d'hydrolyse du xylane de bouleau de chacun des mutants a été déterminée et comparée à celle de la xylanase A sauvage. Dans tous les cas, les courbes de température optimale sont en forme de cloche et très similaires (Figure 12). La température optimale du mutant D50N est de 55°C tout comme celle de la xylanase A sauvage. Par contre, les températures optimales des mutants W85H et N127D sont de 60 et 65°C, une augmentation de 5 et 10°C respectivement, par rapport à l'enzyme de type sauvage. Une autre différence a été observée à 70°C. Les enzymes mutantes D50N et W85H conservent seulement 20% de leur activité à cette température, tandis que l'enzyme de type sauvage possède encore 70% de son activité et que le mutant N127D fonctionne à 90% de son activité maximale.

### 5.4 pH optimal

Les pH optimaux des mutants ont été déterminés à 60°C en utilisant le xylane de bouleau comme substrat et ces courbes sont montrées à la Figure 13. Les pH optimaux de la xylanase A et des mutants D50N et W85H sont de 6,0, tandis que celui de la protéine mutante N127D est de 5,5. La xylanase A et le mutant N127D sont plus alcalinophiles que D50N et W85H, possédant toutes deux 50% de leur activité maximale à pH 8,0, tandis que les deux autres ont perdu environ 90% de leur activité enzymatique à pH 8,0.

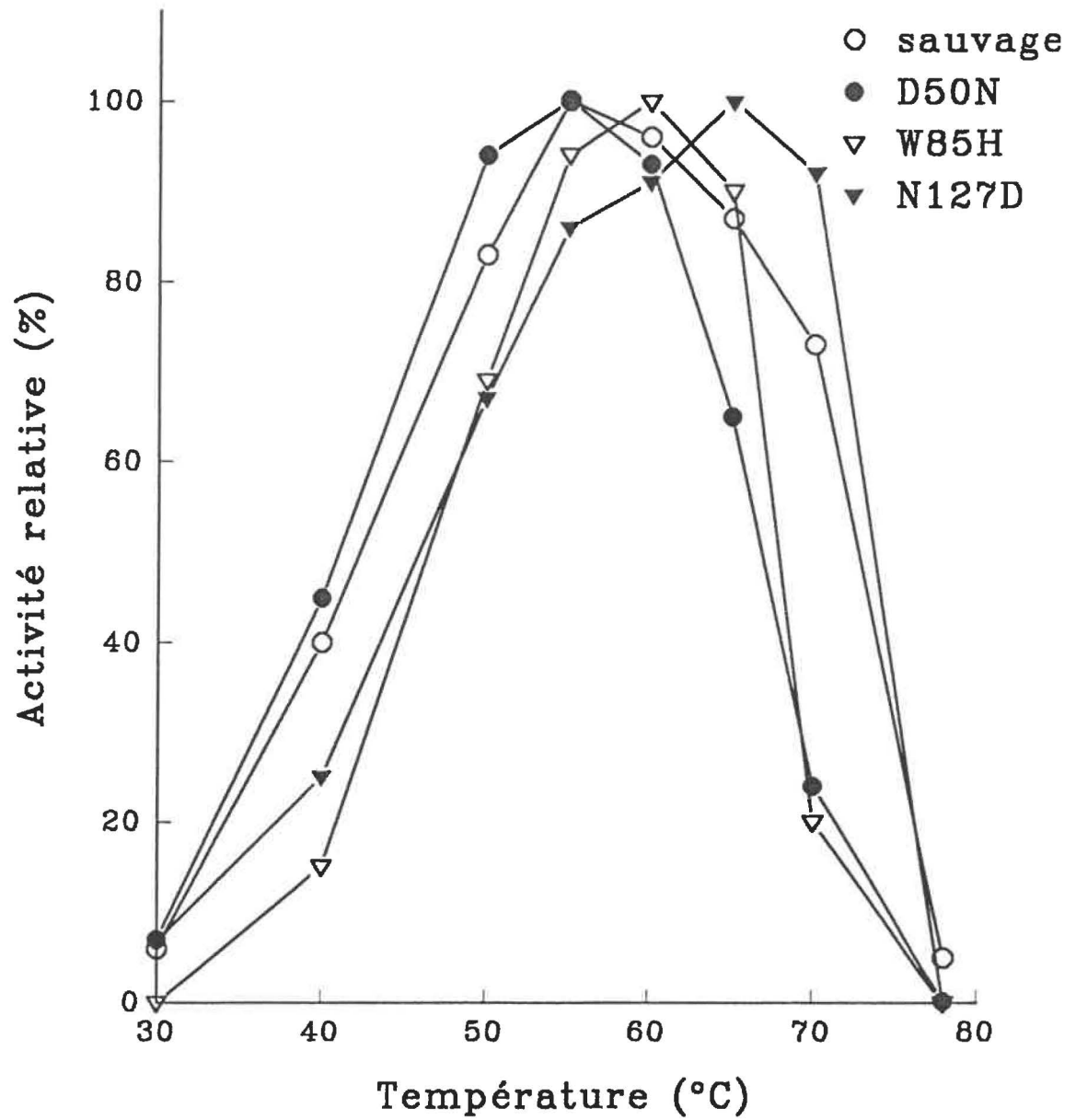


Figure 12: Détermination de la température optimale d'hydrolyse du xylane de bouleau à pH 6,0.

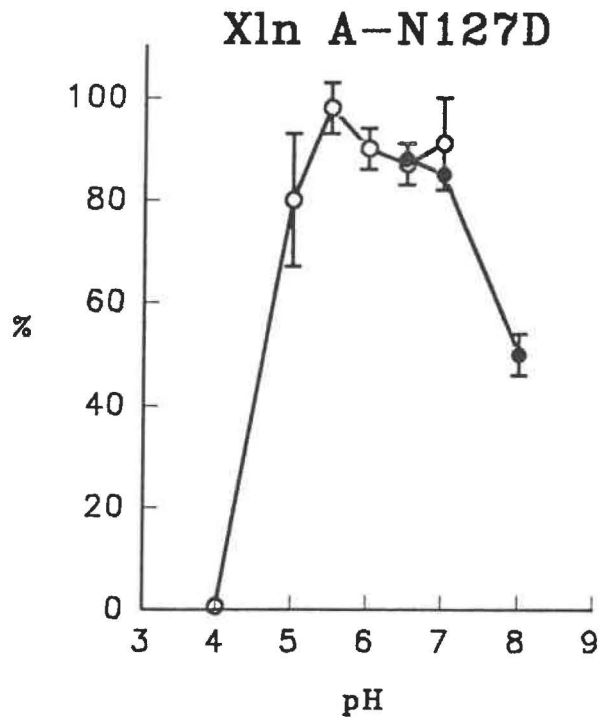
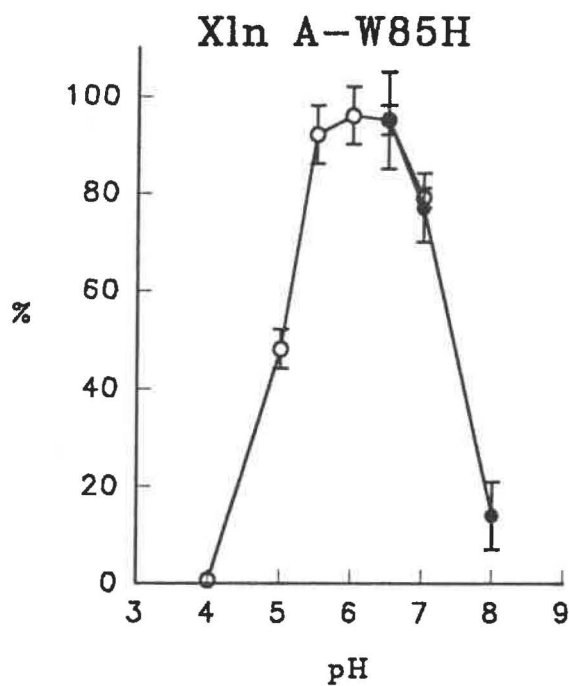
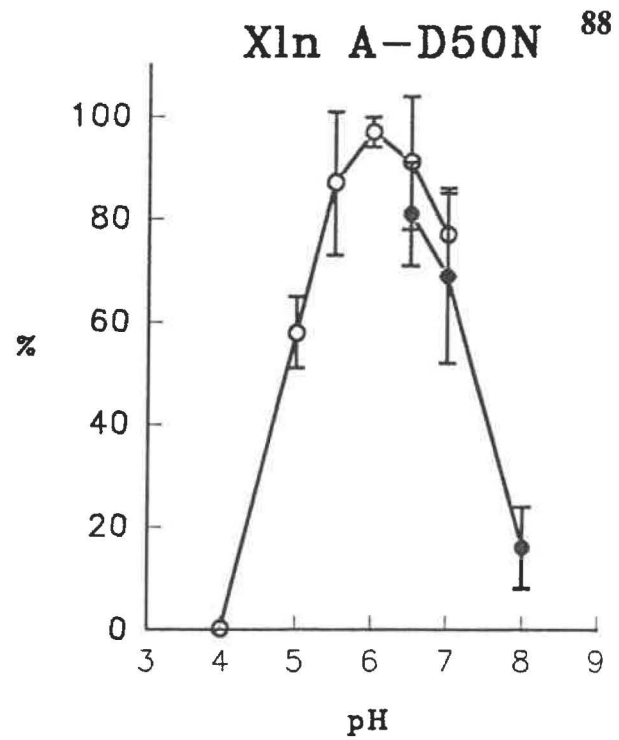
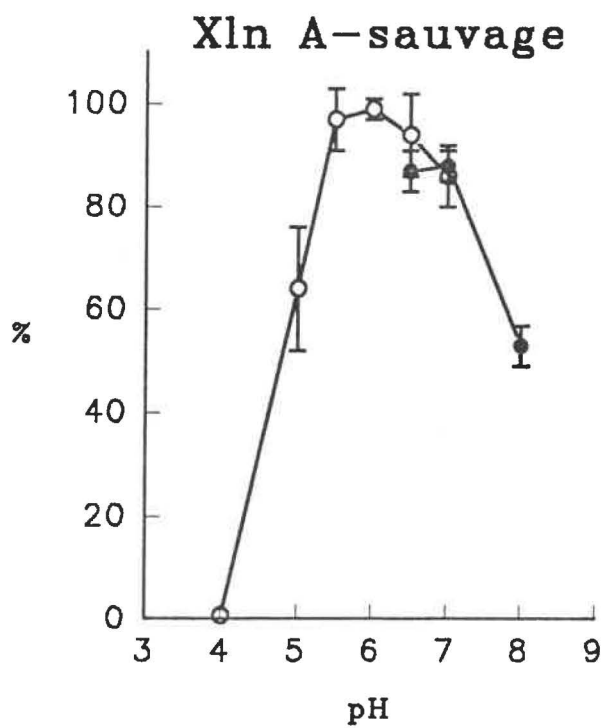


Figure 13: Détermination du pH optimal d'hydrolyse du xylane de bouleau à 60°C. Ronds vides; tampon citrate de sodium 50 mM, ronds pleins; tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 50 mM.

## 5.5 Thermostabilité

La stabilité thermique des mutants a été déterminée en présence et en absence de xylane de bouleau, ces résultats sont présentés aux Figures 14 et 15, respectivement. La stabilité thermique des mutants en présence de substrat ne semble pas avoir été affectée par les mutations puisque la courbe de libération des sucres réducteurs en fonction du temps est linéaire durant environ trois heures dans tous les cas (Figure 14). Par contre, une baisse évidente de stabilité est observée en absence de substrat chez tous les mutants testés. Les temps de demi-vie à 60°C en absence de substrat sont de 99 min pour la xylanase A sauvage, de 74 min pour le mutant R156E, 27 min pour N127D, 18 min pour W85H et de 12 min seulement pour le mutant D50N (Figure 15).

## 5.6 Paramètres cinétiques

L'affinité de l'enzyme vis-à-vis un substrat donné ainsi que sa vitesse maximale d'hydrolyse, sont des éléments très importants dans l'étude comparative des enzymes. Dans le cas des xylanases, dont le substrat naturel est très hétérogène, il est très difficile de comparer différentes enzymes caractérisées dans différents laboratoires, à cause des variations entre les différentes méthodes utilisées et du substrat utilisé. Les  $K_m$  et  $V_{max}$  calculés ici, ont été déterminés en utilisant les mêmes solutions de substrat, dans les mêmes conditions les uns par rapport aux autres.

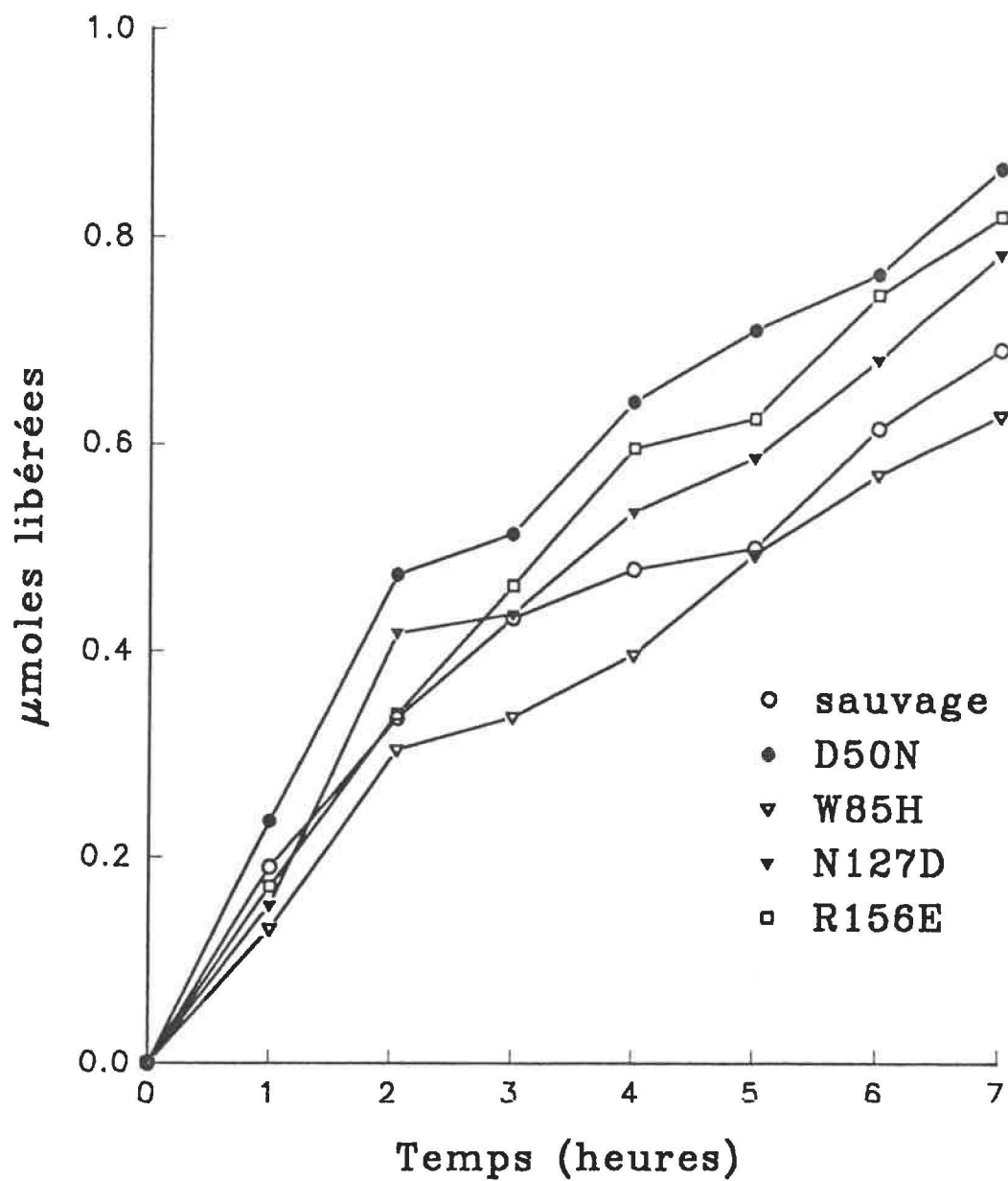


Figure 14: Thermostabilité des xylanases à 60°C en présence de xylane de bouleau 5% à pH 6,0.



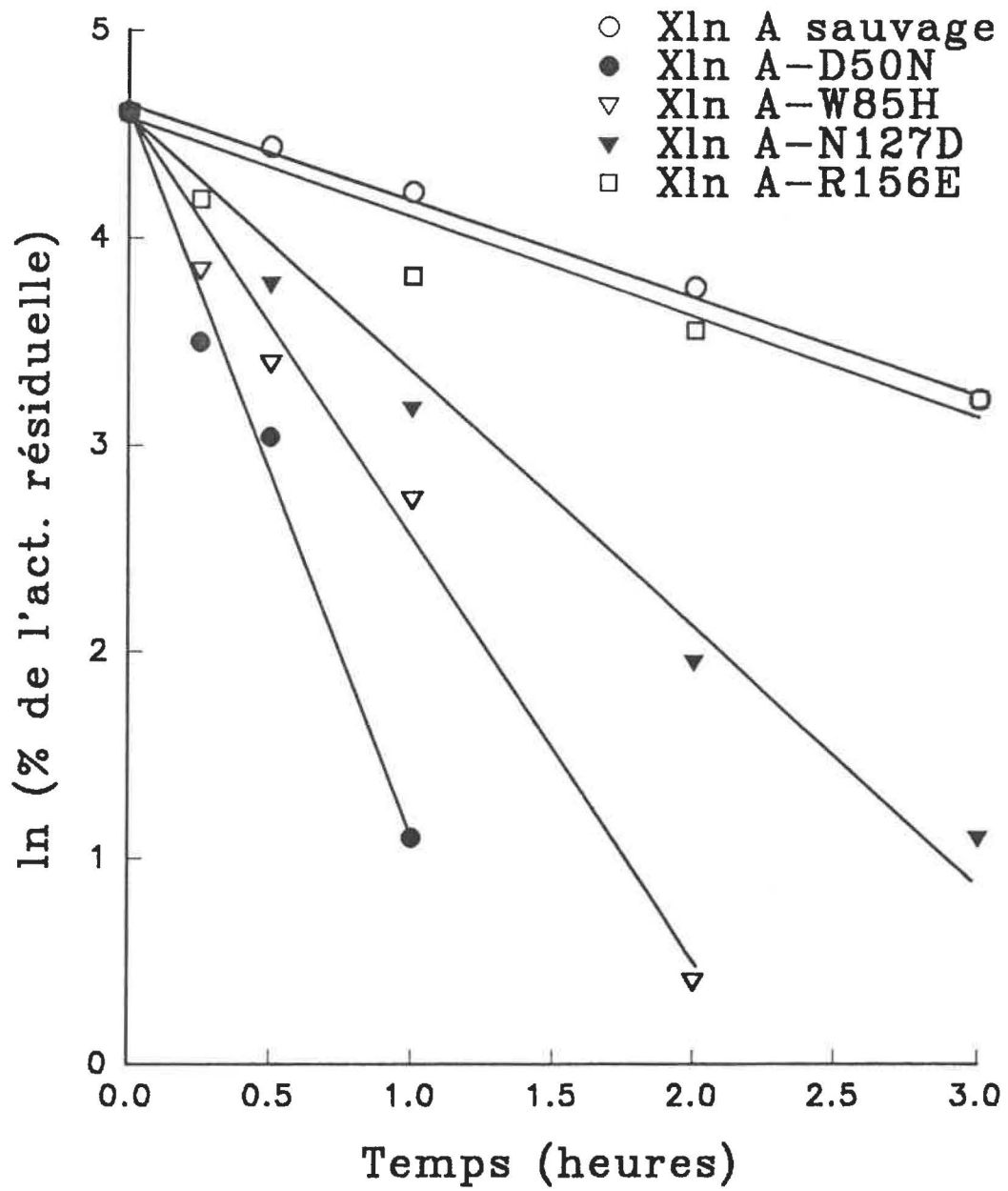


Figure 15: Thermostabilité des xylanases à 60°C en absence de substrat à pH 6,0.

Les résultats présentés dans le Tableau 11 pour les mutants D50N, W85H, N127D et T235Y sont comparés à la xylanase A sauvage. L'affinité des mutants pour le xylane de bouleau n'a été affectée par aucune des mutations. Par contre, la vélocité maximale a été réduite de 13 à 99%. La constante de spécificité ( $k_{cat}/K_m$ ) de la xylanase A-T235Y est la seule à être comparable à celle de l'enzyme de type sauvage, puisque dans tous les autres cas, on observe une baisse de la spécificité.

Tableau 11: Comparaison des constantes cinétiques des mutants de la xylanase A de *S. lividans*, déterminées avec du xylane de bouleau, à celles de l'enzyme de type sauvage.

Enzyme	$K_m$ (mg/mL)	$V_{max}$ (UI/mg)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$
Xln A-sau	$3,8 \pm 1,0$	$516 \pm 21$	$404 \pm 16$	106
Xln A-D50N	$3,9 \pm 0,4$	$406 \pm 50$	$318 \pm 39$	82
Xln A-W85H	$3,3 \pm 0,4$	$66 \pm 3$	$52 \pm 2$	15,8
Xln A-N127D	$3,7 \pm 0,6$	$6,6 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,3$	1,40
Xln A-T235Y	$3,3 \pm 0,5$	$450 \pm 40$	$352 \pm 31$	107

### 5.7 Profils d'hydrolyse

Les profils d'hydrolyse du xylane et du xylopentaose par les mutants de la xylanase A de *Streptomyces lividans* ont été déterminés pour connaître les produits libérés par ces enzymes au cours du temps (Figure 16). Dans le cas des mutants D50N, W85H et N127D. Les profils d'hydrolyse du xylane de bouleau, de glumes d'avoine et du xylopentaose ont été étudiée.

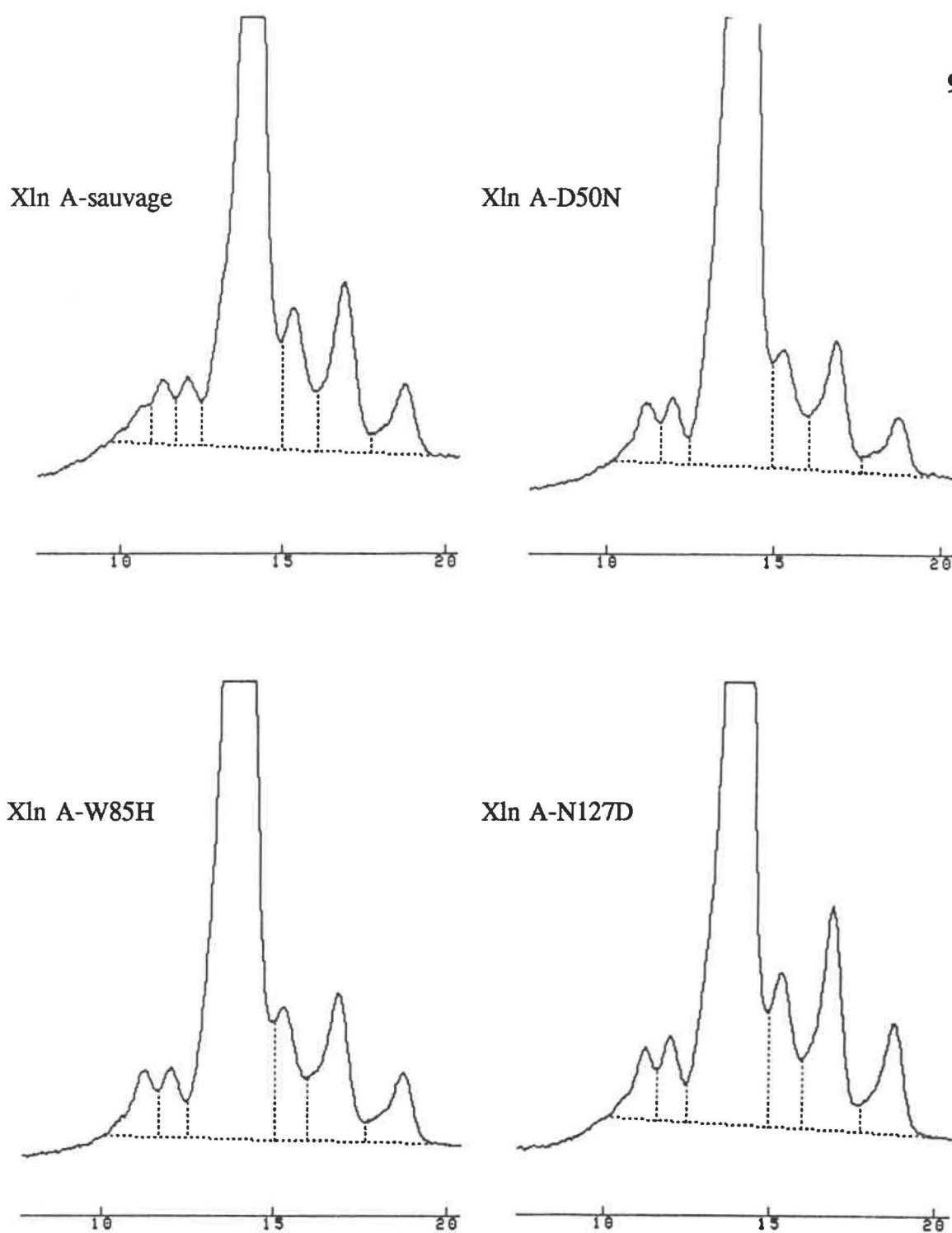


Figure 16: Profils d'hydrolyse du xylopentose par la xylanase A et les mutants D50N, W85H et N127D. Ceux des xylanases A-T235Y et D270N sont identiques à ceux de la xylanase A sauvage.

Aucune différence significative n'a été observée en comparaison avec l'hydrolyse de ces substrats par la xylanase A sauvage. Dans le cas des mutants T235Y et D270N, l'étude de l'hydrolyse du xylane de bouleau et du xylopentaose a montré que les profils d'hydrolyse de ces substrats au cours du temps sont identiques à ceux de la xylanase A sauvage.

Dans tous les cas, on observe au début, la formation d'oligoxylosides allant du xylobiose (X2) au xylodecaose (X10), jusqu'à la formation exclusive de X2 et X3. Aucun pic de xylose n'a été observé durant la réaction. Lors de l'hydrolyse du xylopentaose en fonction du temps, on observe la formation de produits de transglycosylation dès le début de la réaction dont la quantité reste constante jusqu'à épuisement du xylopentaose. Les deux produits majeurs de transglycosylation sont le xyloheptaose (X7) et le xylooctaose (X8) qui sont produits en quantités équivalentes. La production de xylohexaose (X6) n'a pas été observée. Il est toutefois possible que le pic de X6 soit caché par le pic de X5 qui est très intense. Les produits d'hydrolyse du xylopentaose sont donc le xylotriose et le xylobiose.

## 5.8 Fréquence de clivage

### 5.8.1 Purification des oligoxylosides tritiés

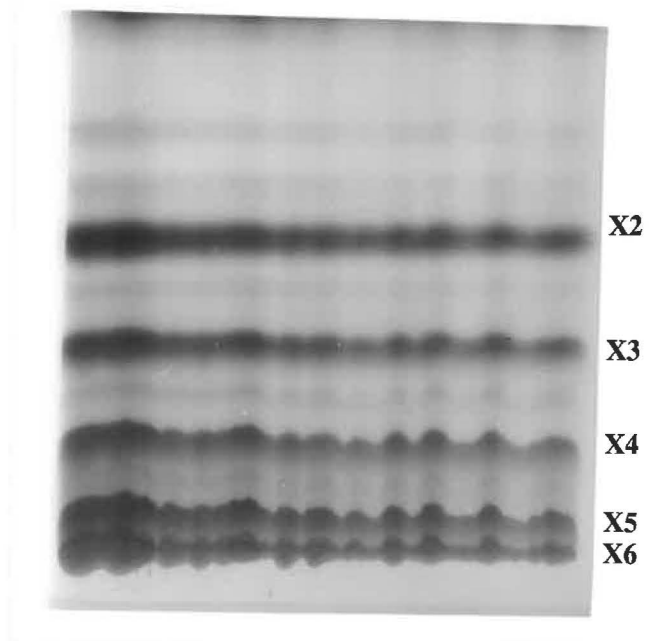
La première séparation sur couche mince a permis de séparer le mélange radioactif

en cinq fractions différentes représentant, selon le standard non marqué: le xylobiose (X2), xylotriose (X3), xylo-tetraose (X4), xylopentaose (X5) et le xylohexaose (X6), (Figure 17a). Le xylopentaose a ensuite été purifié une seconde fois et le résultat de cette deuxième purification est montré à la Figure 15b. Cette deuxième purification a permis de récolter 50  $\mu\text{L}$  de xylopentaose contenant 630 000 coups par minute (cpm) /  $\mu\text{L}$  pour un total de plus de 30 millions de cpm. Une partie du xylopentaose tritié a été diluée à une concentration de 100 000 cpm/ $\mu\text{L}$  pour la détermination de la fréquence de clivage des enzymes sur le xylopentaose. Pour déterminer la pureté du xylopentaose tritié, un échantillon fût déposé sur plaque de cellulose et séparé dans les conditions décrites plus haut, servant de témoin négatif aux expériences de fréquence de clivage. Le xylopentaose est donc pur à plus de 95%.

### 5.8.2 Fréquence de clivage du xylopentaose

La détermination de la fréquence de clivage des xylanases sur un substrat défini comme le xylopentaose est une méthode très sensible pour l'observation de variations entre différentes enzymes puisqu'on étudie directement l'hydrolyse du substrat et non la somme des produits finaux comme dans le cas de la détermination du profil d'hydrolyse par HPLC. La fréquence de clivage du xylopentaose a donc été étudiée en utilisant du xylopentaose tritié pour les mutants D50N, W85H, T235Y et D270N et ces fréquences de clivage sont comparées à celles de la xylanase A sauvage à la Figure 18.

a)



b)

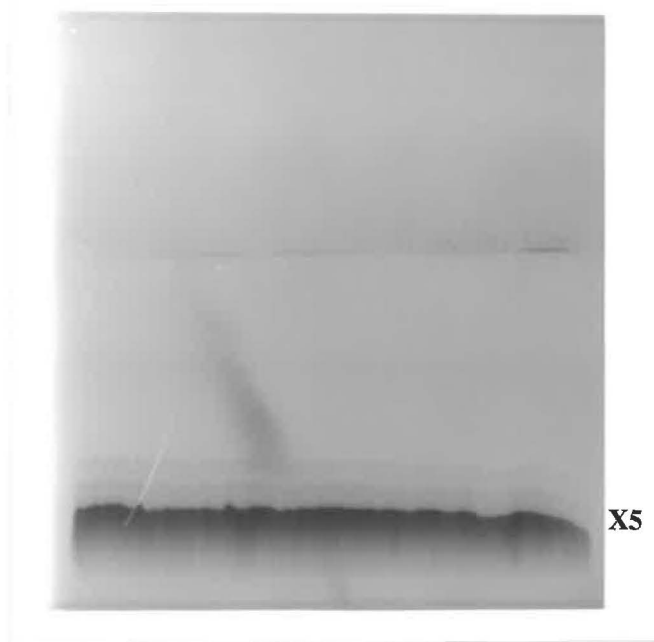


Figure 17: Autoradiogrammes de la chromatographie sur couche mince du mélange d'oligosides tritiés (a) et de la deuxième migration du  $^3\text{H}$ -xylopentaose (b).

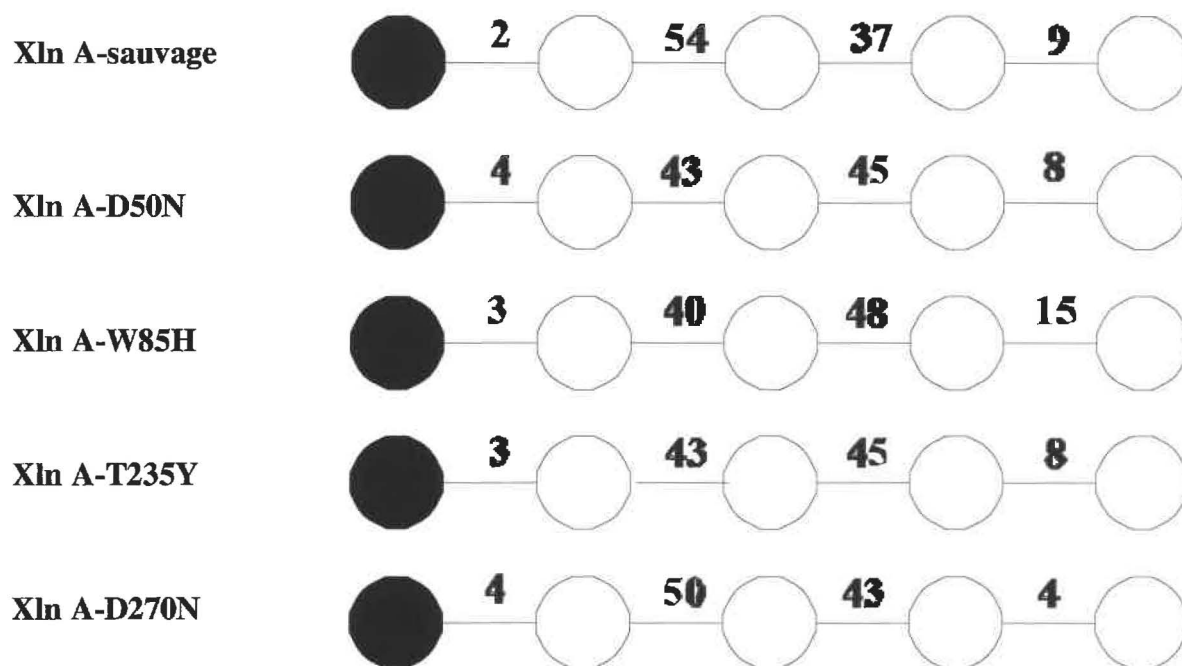


Figure 18: Fréquence de clivage (%) du xylopentaose par la xylanase A et certains mutants. Chaque cercle représente une unité xylose, l'extrémité réductrice étant noire.

## IV. DISCUSSION

### 1.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES ET PRODUCTION D'ENZYMES

Les mutations ont toutes été produites chez *E.coli*, et même s'il existe une panoplie de systèmes d'expression chez cet organisme, l'expression homologue de la xylanase A par *S. lividans* est beaucoup plus efficace. Malgré le faible rendement et les nombreuses étapes de ce sous-clonage, il est quand même avantageux de produire la xylanase A chez *S. lividans*, car les conditions de culture optimales pour la production de protéines sont bien connues. Les améliorations à apporter à ce système d'expression se situent au niveau du passage du plasmide pAM19.1 à pIAF18 (Figure 5), où un clonage "forcé", c'est-à-dire le clonage d'un fragment d'ADN digéré avec deux enzymes de restriction différentes, augmenterait le rendement lors du criblage des transformants. Ces modifications pourraient être faites dans la partie *SstI-SphI* du plasmide pIAF18 (Figure 5) qui contient des éléments encore inconnus n'affectant ni la production d'enzymes, ni la région promotrice, ni le gène de structure de la xylanase A.

L'efficacité de la production d'enzymes par ce système est démontrée par les résultats présentés au Tableau 8 où une moyenne d'environ 2,5 g de protéines par litre de culture sont récupérées du surnageant de culture dans les conditions décrites plus haut. Ce haut niveau de production peut également être visualisé sur gel de polyacrylamide



(Figure 9, ligne A de la partie "Résultats") où approximativement 80% des protéines totales sont de la xylanase A1 ou de la xylanase A2 (un produit de protéolyse de la A1) en proportions d'environ deux pour un. La production presque exclusive de xylanase A dans le surnageant de culture est donc un très grand avantage lorsqu'on arrive à la purification de cette enzyme.

## 2.0 CARACTÉRISTIQUES DES MUTANTS

### 2.1 Température optimale

La détermination de la température optimale d'une enzyme indique le degré de thermophilicité de celle-ci. Une enzyme thermophile est donc active à haute température. La xylanase A de *S. lividans* est une enzyme relativement thermophile avec une température optimale de 60°C (Mondou *et al.*, 1986). Par contre, une augmentation de sa thermophilicité pourrait avoir des intérêts industriels étant donné que la plupart des procédés industriels dans lesquels les xylanases pourraient être utilisées se font à haute température. La mutation D50N n'a pas affecté la température optimale de l'enzyme, par contre, le remplacement du résidu tryptophane en position 85 par une histidine (W85H) a augmenté la température optimale de 5°C tandis que la mutation N127D l'a augmentée de 10°C. En plus, la protéine mutante N127D conservait 90% de son activité maximale à 70°C, ce qui est 20% de plus que l'enzyme sauvage. Lüthi *et al.* (1992) ont réussi à

diminuer la thermophilicité de la xylanase de *Caldocellum saccharolyticum* par mutagénèse *in vitro*, et un des mutants avait une température optimale de 20°C inférieure à celle de l'enzyme de type sauvage. Dans le cas de la xylanase A, deux mutations sur les trois ayant été examinées augmentent la température optimale d'hydrolyse du xylane de bouleau. Ces résultats sont significatifs et représentent un progrès intéressant.

## 2.2 pH optimal

Du point de vue de l'industrie, pour le blanchiment de la pâte à papier, une enzyme agissant à un pH alcalin (autour de pH 9) serait très avantageuse. Seule la mutation N127D a eu un effet sur le pH optimal de l'enzyme en le faisant passer de 6,0 à 5,5 impliquant ainsi un changement dans le pKa de la poche catalytique de l'enzyme. La baisse d'activité à pH 8,0 observée pour D50N et W85H est certainement due à une modification du réseau de charge du site actif.

## 2.3 Thermostabilité

La thermostabilité d'une enzyme dépend d'un certain nombre de facteurs dont les liaisons ioniques, les ponts hydrogène, les liens disulfure ainsi que les molécules d'eau présentes dans la protéine. La mutagénèse dirigée pourrait permettre d'accroître certaines de ces interactions intra-moléculaires, par exemple en solidifiant un réseau de

liens hydrogène sans toutefois que les autres caractéristiques de l'enzyme ne soient modifiées. Moreau *et al.* (1994b) ont réussi à augmenter la thermostabilité de la xylanase A de *Streptomyces lividans* par mutagénèse dirigée. Lüthi *et al.* (1992), par mutagénèse *in vitro*, ont obtenu trois mutants de la xylanase de *Caldocellum saccharolyticum* dont la thermostabilité avait été diminuée. Il était donc important de tester la thermostabilité des enzymes mutantes pour connaître l'effet des mutations sur le phénomène de thermostabilité.

La thermostabilité des mutants de la xylanase A analysés n'a pas été modifiée de manière significative en présence de xylane de bouleau à 60°C. En absence de substrat, la thermostabilité a diminué dans tous les cas et surtout dans le cas de la mutation D50N. La présence du substrat dans le site catalytique stabilise donc la structure de l'enzyme et compense pour la perte de stabilité due aux mutations. Étant donné que l'affinité des mutants de la xylanase A pour le xylane de bouleau n'a pas été modifiée, tous les mutants bénéficient probablement de la stabilisation par le xylane de bouleau.

#### 2.4 Paramètres cinétiques

La détermination des paramètres cinétiques est un outil très important lors de la comparaison de mutants. Grâce à ces résultats, il est possible d'évaluer l'implication, dans la catalyse enzymatique, de l'acide aminé ayant été modifié, que ce soit au niveau

de l'affinité envers un substrat ou bien au niveau de la vitesse maximale d'hydrolyse. L'utilisation d'un substrat hétérogène comme le xylane complique l'interprétation des résultats puisque la structure exacte du xylane est inconnue. La mise au point d'une méthode de détermination des constantes cinétiques utilisant un substrat simple et bien défini serait souhaitable pour simplifier l'interprétation des résultats.

Une méthode de détection plus sensible permettrait également d'augmenter la précision des résultats lors de l'utilisation de faibles concentrations de substrat. Lorsqu'on veut comparer des enzymes ayant des activités spécifiques inégales, il est essentiel d'utiliser des concentrations différentes de protéines. Ceci implique donc l'introduction d'un autre facteur d'erreur. La réponse au DNS est aussi dépendante de la longueur des oligoxylosides. Ainsi, la réponse d'une certaine concentration de xylobiose au DNS, est différente de celle de la même concentration de xylopentaose par exemple. Alors, si deux enzymes libèrent différents produits d'hydrolyse, un autre facteur d'erreur est introduit rendant la comparaison des résultats plus difficile. Le Dr. Dupont de l'Institut Armand-Frappier a récemment mis au point une méthode utilisant l'hydrazide de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (PAHBAH, Lever, 1971) qui permet de détecter de plus faibles concentrations de sucres réducteurs (C. Dupont, communication personnelle).

Lorsqu'on regarde les résultats du Tableau 11, aucune mutation ne semble affecter l'affinité de l'enzyme pour le xylane de bouleau. En analysant les résultats, on remarque

qu'il y a une assez grande marge d'erreur dans les valeurs de  $K_m$  calculées. Cette marge d'erreur est due au manque de sensibilité de la méthode de détection à des concentrations faibles en substrat. Cette affirmation est amplifiée par le fait que les variations observées au niveau du  $V_{max}$  sont beaucoup plus faibles. En utilisant la méthode au DNS, il devient donc impossible d'apprécier de faibles différences au niveau du  $K_m$  des enzymes.

La valeur du  $k_{cat}$  reflète le  $V_{max}$  puisque dans le cas des glycanases en général, le  $V_{max}$  est exprimé en  $\mu\text{moles}$  d'unités xyloses libérées par min, par mg d'enzyme tandis que le  $k_{cat}$  s'exprime en  $\mu\text{moles}$  d'unités xyloses libérées par seconde, par  $\mu\text{mole}$  d'enzyme. Le  $k_{cat}$  représente donc la quantité de liens  $\beta$ -1,4 étant hydrolysés par molécule d'enzyme par seconde. La valeur de  $k_{cat}/K_m$  indique la spécificité de l'enzyme vis-à-vis un substrat et est surtout utilisée pour comparer l'efficacité d'une enzyme envers différents substrats. Cette valeur permet de comparer l'efficacité de l'hydrolyse du xylane de bouleau par la xylanase A de type sauvage et les différentes protéines mutantes et de déterminer si la mutation introduite a été bénéfique pour la catalyse enzymatique de ce substrat. Ainsi, une baisse d'efficacité est observée chez les mutants D50N, W85H, N127D et D270N. Quand à elle, la mutation T235Y n'affecte pas l'efficacité de l'enzyme envers le xylane de bouleau.

### 3.0 PROFILS D'HYDROLYSE ET FRÉQUENCE DE CLIVAGE DU XYLOPENTAOSE

Le suivi du profil d'hydrolyse du xylopentaose par les enzymes mutantes a permis d'observer différents phénomènes importants. Tout d'abord aucune des protéines mutantes ne montre un profil d'hydrolyse différent de celui de la xylanase A sauvage. À 5 mM de substrat, toutes les enzymes utilisent le mécanisme de transglycosylation pour produire des oligoxylosides de degré de polymérisation supérieur à cinq (Figure 16) permettant d'affirmer que toutes ces enzymes utilisent le même mécanisme dans ces conditions.

La fréquence de clivage du xylopentaose par certains mutants a aussi été déterminée et comparée à celle de la xylanase A sauvage (Figure 18). La concentration de 1 mM de xylopentaose est utilisée pour éliminer la transglycosylation, et permet d'observer uniquement les produits de l'hydrolyse du xylopentaose. La présence de produits de transglycosylation nous empêche de tirer des conclusions quant à l'absence de différence dans la fréquence de clivage du xylopentaose. L'implication exacte de la transglycosylation dans le mécanisme d'hydrolyse des xylanases étant encore inconnue, il est impossible de savoir si les produits d'hydrolyse observés proviennent de l'hydrolyse du xylopentaose ou bien de l'hydrolyse d'oligoxylosides d'un degré de polymérisation supérieur à cinq. Peut-être que les xylanases transglycosylent "par erreur" à une faible

fréquence, ce mécanisme étant secondaire et donc peu utile à l'enzyme. Il est possible que les xylanases synthétisent des oligoxylosides de tailles supérieures pour accélérer leur hydrolyse éventuelle. L'hydrolyse directe du xylopentaose serait donc un mécanisme secondaire. Les xylanases utiliseraient plutôt la transglycosylation pour former des produits plus facilement hydrolysables. Pour étudier la fréquence de clivage du xylopentaose, il est préférable de travailler dans des conditions où la transglycosylation est défavorisée.

#### 4.0 STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Récemment, la structure cristalline du domaine catalytique de la xylanase A de *Streptomyces lividans* a été élucidée à 2,6 Å par Derewenda *et al.* (1994). C'est la première structure d'un membre de la famille F à être publiée. Contrairement aux xylanases de la famille G formées en majorité de feuilletts  $\beta$ , la xylanase A de *S. lividans* est formée d'une structure  $(\alpha/\beta)_8$ . Ce type d'arrangement est très fréquent chez les enzymes en général, mais c'est la première fois qu'on l'observe chez une  $\beta$ -1,4-D-glycanase. Cette structure représente le domaine catalytique de la xylanase A, c'est-à-dire les acides aminés 5 à 299. Vue de côté, l'enzyme ressemble à un saladier et le site actif de la protéine est situé à l'entrée de la plus grande ouverture du saladier (Figure 19b). La distance entre les carbones de la fonction acide des résidus catalytiques proposés est de 7 Å, ce qui ressemble beaucoup au lysozyme. L'environnement des acides aminés

a)



b)

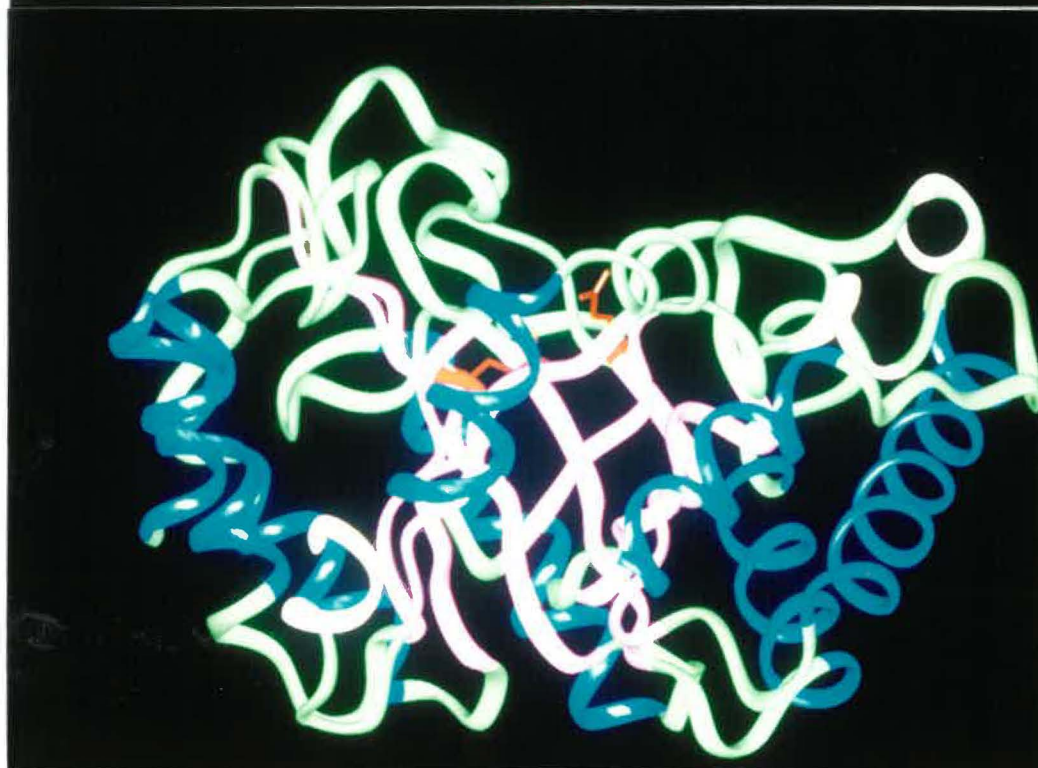


Figure 19: Structure  $(\alpha/\beta)_8$  de la xylanase A de *S. lividans* ressemblant à un saladier. Les hélices- $\alpha$  sont en bleu, les feuillets- $\beta$  en rose, les boucles en vert et les hélices- $\alpha$  en dehors de la structure  $(\alpha/\beta)_8$  sont en blanc. Les résidus catalytiques (Glu 128 et Glu 236) proposés sont en rouge. En (a), une vue de haut du saladier où les acides aminés mentionnés dans ce travail sont identifiés. En (b), une vue de côté de l'enzyme.



catalytiques E128 et E236 correspond également à ceux des résidus 35 et 52 du lysozyme d'oeuf de poule confirmant ainsi la ressemblance entre les deux types d'enzymes (Derewenda *et al.*, 1994).

L'élucidation de la structure de la xylanase A permettra l'interprétation des résultats de cette étude sur une base conformationnelle. En plus, ces données structurales permettront de développer des stratégies pour l'étude des différents résidus situés dans le site catalytique de l'enzyme ou impliqués dans le maintien de la conformation de la protéine. Ces données conformationnelles ont permis de connaître l'implication de certains acides aminés dans le réseau des liens hydrogène du site actif.

## 5.0 MUTANT D50N

L'acide aspartique en position 50 de la xylanase A de *Streptomyces lividans* est conservé dans les séquences des xylanases de cette famille, mais n'est pas invariable. Par contre, la fonction acide à cette position semble importante puisqu'elle est conservée dans 80% des cas. Cet acide aminé a donc été changé par mutagenèse dirigée pour étudier sa fonction. Cette mutation a seulement eu pour effet de diminuer l'activité enzymatique de 25% par rapport à celle de l'enzyme de type sauvage. L'acide aspartique en position 50 joue donc un rôle mineur dans l'activité de la xylanase A. Il est fort probable que cet acide aminé joue un rôle dans le maintien de la structure protéique. Cette hypothèse est confirmée lorsque l'on observe la perte de stabilité thermique en absence de substrat du

mutant D50N par rapport à l'enzyme sauvage. L'étude d'un mutant D50E serait très utile pour confirmer l'importance de la charge dans le maintien de la structure.

## 6.0 MUTANT W85H

Le tryptophane en position 85 de la xylanase A de *S. lividans* est conservé dans les séquences des xylanases de cette famille (Figure 2). Les résidus tryptophane, à cause de leur structure, possèdent la propriété de lier les sucres. Il était donc possible que la mutation de cet acide aminé entraîne des changements au niveau de la liaison enzyme-substrat dans le site catalytique. Sans que l'affinité de l'enzyme ne soit changée, on observe une perte d'activité de 80% chez le mutant W85H. Des résultats similaires ont été obtenus par Sierks *et al.* (1993) qui n'observaient aucune variation de  $K_m$  chez un mutant (W178R) de l' $\alpha$ -1,4-glucoamylase de *Aspergillus awamori* envers un substrat  $\alpha$ -1,4 tandis que le  $k_{cat}$  de l'enzyme était diminué d'un facteur de cinq. Keskar *et al.* (1989) ont démontré l'implication d'un résidu tryptophane dans la catalyse de la xylanase de *Streptomyces* T7 par modification chimique. Clarke (1987) arrive également à la même conclusion avec une cellulase. Si l'hypothèse du rôle de liaison au substrat est vraie, l'histidine en position 85 remplace le tryptophane de très belle manière. La structure tridimensionnelle de la xylanase A de *S. lividans* nous indique la présence du tryptophane 85 à proximité du site catalytique (Figure 19a). D'autres mutants à cette position ainsi que des tests cinétiques avec des substrats simples seraient nécessaires pour approfondir

le rôle de ce résidu dans la catalyse.

## 7.0 MUTANT N127D

L'asparagine en position 127 est aussi conservée dans les séquences des xylanases de cette famille faisant partie de la séquence **wDvvNE** (Figure 2). L'introduction d'une fonction acide au lieu d'une fonction amine a un effet très important sur l'activité de la protéine contre tous les substrats testés. Encore une fois, l'effet de cette mutation est ciblé sur le  $V_{max}$ , diminué de 98% par rapport à celui de la xylanase A de type sauvage, sans affecter le  $K_m$ . Avec les résultats obtenus, il est très difficile d'identifier la cause exacte de cette baisse d'activité. Cette perte d'activité à pH 6,0 n'est pas causée par une variation du  $pK_a$  de l'enzyme puisque la courbe de pH optimal ressemble à celle de l'enzyme de type sauvage et que N127D possède plus de 90% de son activité à pH 6,0. Par contre, la mutation isostérique en position 127 augmente la température optimale de l'enzyme de 10°C. L'introduction d'une charge négative voisine de l'acide glutamique 128 a certainement modifié l'orientation de ce dernier résidu dans le site catalytique diminuant ainsi l'efficacité de la catalyse. La hausse du  $pI$  causée par la mutation N127D reflète certainement une variation dans le réseau de charges autour du site actif. La structure, ainsi que les données sur l'environnement de l'acide glutamique 128, semblent appuyer cette hypothèse en indiquant l'implication de ce résidu en tant qu'acide dans la catalyse enzymatique (Derewenda *et al.*, 1994). L'importance de l'asparagine en position 127 a

clairement été démontrée. D'autres mutations à cette position sont donc nécessaires pour expliquer le rôle exact de ce résidu.

## 8.0 MUTANTS E128Q ET E236Q

Les acides glutamiques en positions 128 et 236 de la xylanase A de *Streptomyces lividans* ont été proposés comme résidus essentiels à la catalyse (Moreau *et al.*, 1994c). Une mutation isostérique à l'une ou l'autre de ces positions provoque une baisse drastique de l'activité enzymatique due à la fonction de l'acide aminé et non à un changement conformationnel. Une étude comparative de spectrophotométrie différentielle avec les protéines mutantes et la protéine sauvage a permis de démontrer qu'aucune modification conformationnelle majeure n'a été provoquée par les mutations (Figure 11). L'excitation de la solution à 295 nm, active principalement les résidus tryptophane de la protéine. Puisque la xylanase A de *S. lividans* possède 13 de ces acides aminés dans sa séquence, il est possible que la perturbation de l'environnement d'un seul de ces résidus tryptophane n'entraîne pas une modification majeure dans le spectre d'émission de la protéine. Dans notre cas, cette méthode n'était donc pas adéquate pour étudier des changements conformationnels mineurs. Comme alternative, une courbe d'inhibition aux anticorps ainsi que des tests de compétition entre les mutants et la xylanase A sauvage ont démontré l'absence de différence structurelle majeure entre les différentes protéines (Moreau *et al.*, 1994c). Les mutants inactifs possèdent donc les mêmes épitopes que la protéine sauvage.

Il est probable qu'un changement conformationnel mineur ne soit pas détectable par cette méthode. La combinaison de deux méthodes différentes donnant les mêmes résultats permettrait donc de proposer le rôle d'acides aminés catalytiques aux acides glutamiques 128 et 236. L'acide glutamique 236 serait le nucléophile de la réaction (Moreau *et al.*, 1994c). Le dichroïsme circulaire serait une autre alternative fréquemment utilisée pour ce genre d'étude, mais la méthode de choix restera toujours l'étude de la structure tridimensionnelle.

Les données structurales sur le domaine catalytique de la xylanase A de *Streptomyces lividans* appuient la proposition des acides glutamiques 128 et 236 comme résidus catalytiques de l'enzyme. L'étude de l'environnement de ces acides aminés permet, en plus, de supporter le rôle du résidu 236 comme nucléophile de la réaction qui, étant situé dans une région hautement polaire, serait présent sous forme ionisée. Par contre, l'environnement du résidu 128 est moins polaire et cet acide aminé serait protoné et agirait en tant qu'acide dans la catalyse enzymatique (Derewenda *et al.*, 1994).

## 9.0 MUTANT T235Y

La thréonine en position 235 de la xylanase A fait partie d'une séquence hautement conservée parmi les enzymes de la famille F comprenant six acides aminés: **itEldi**. L'importance de cette séquence est basée sur le fait que l'acide glutamique situé dans cette

région, serait le nucléophile de la réaction (Moreau *et al.*, 1994c). La thréonine en position 235 est conservée dans 90% des cas (Figure 2). Les optimums de température et de pH ainsi que la stabilité thermique du mutant T235Y n'ont pas encore été déterminés. L'activité spécifique ainsi que les paramètres cinétiques contre le xylane de bouleau de ce mutant sont semblables à ceux de la xylanase A sauvage. Dans ce cas, le remplacement d'un résidu thréonine par une tyrosine n'a pas affecté les propriétés catalytiques de la xylanase. Étant donné que cette position est immédiatement voisine du nucléophile de la réaction, il est probable que la chaîne latérale de l'acide aminé en position 235 ne fasse pas partie intégrante de la poche catalytique de l'enzyme, expliquant ainsi la ressemblance du mutant T235Y avec la protéine de type sauvage.

## 10.0 MUTANT D270N

La position occupée par l'acide aspartique 270 est invariable dans les séquences des enzymes de la famille F. L'importance de la fonction acide à cette position de la protéine a été étudiée. La souche IAF18-D270N est une souche instable et la production d'enzyme a été très faible. Il a donc fallu concentrer les protéines contenues dans la poudre brute avant de purifier l'enzyme, ce qui a conduit à des pertes imprévues baissant énormément le rendement de purification. Les paramètres cinétiques du mutant ainsi que les optimums de température, de pH et de stabilité thermique n'ont pas été déterminés lors de cette étude. Par contre, la mutation a entraîné une perte de l'activité spécifique de l'enzyme

de l'ordre de 75% sans toutefois modifier le mode d'hydrolyse. D'autres analyses seront nécessaires pour comprendre le rôle de ce résidu dans le mode d'action de la xylanase A.

## V. CONCLUSION

L'étude structure/fonction de la xylanase A de *Streptomyces lividans* est l'une des plus avancées dans le domaine des xylanases. L'absence de structure tridimensionnelle connue chez les xylanases de la famille F a empêché, jusqu'à maintenant, l'exploration moléculaire de ces enzymes. Presque tous les résidus conservés parmi les séquences primaires des xylanases de la famille F se retrouvent près du site catalytique de l'enzyme. Jusqu'à maintenant, l'analyse de la xylanase A par mutagenèse dirigée a permis d'augmenter la thermostabilité de l'enzyme sans modifier l'activité enzymatique (Moreau *et al.*, 1994b). Il a également été possible de modifier le mode d'action de l'enzyme en permettant la production presque exclusive de xylobiose à partir de xylopentaose (Moreau *et al.*, 1994a). Mais surtout, la mutagenèse dirigée des résidus conservés a permis d'identifier deux acides aminés essentiels à l'activité enzymatique de la xylanase A (Glu 128 et Glu 236, Moreau *et al.*, 1994c).

L'hypothèse de départ de ce travail était également basée sur des comparaisons de séquences. Il avait été postulé que le changement d'un acide aminé conservé de la séquence de la xylanase A de *Streptomyces lividans* entraînerait des modifications au niveau des propriétés biochimiques de l'enzyme permettant d'identifier le rôle de certains résidus dans le mode d'action de l'enzyme.



Pour parvenir à la caractérisation de certains mutants de la xylanase A, il était nécessaire de développer une stratégie de sous-clonage permettant la production d'enzyme chez *S. lividans*. Cette stratégie reste à être améliorée.

Ces travaux ont permis d'attribuer un rôle secondaire à l'acide aspartique en position 50 grâce à l'analyse des propriétés du mutant D50N, qui malgré le changement important de la fonction de l'acide aminé conservait 73% de l'activité spécifique de l'enzyme sauvage. Étant donné que seule la thermostabilité de l'enzyme avait été affectée par la mutation, il est fort probable que la fonction acide de l'aspartate en position 50 soit importante pour la structure de la protéine.

Le tryptophane en position 85 a été remplacé par une histidine. Cette mutation a eu pour effet d'abolir 80% de l'activité enzymatique sans affecter l'affinité de l'enzyme envers le xylane. Ce résidu est situé à proximité du site catalytique (Figure 19a) et pourrait participer à la stabilisation du substrat dans la poche catalytique. Même si l'affinité de l'enzyme pour le xylane, reflétée par le  $K_m$  de l'enzyme n'a pas été modifiée par la mutation, d'autres mutants à cette position seraient nécessaires afin d'éclaircir la fonction de cet acide aminé dans le mode d'action de l'enzyme.

L'asparagine en position 127 est très importante pour l'activité enzymatique de la xylanase A. Étant le résidu voisin de l'acide glutamique 128, l'acide de la réaction, cet

acide aminé pourrait être impliqué dans la fixation du substrat autant que dans un réseau de charges permettant l'orientation exacte des acides aminés catalytiques dans le site actif de l'enzyme. La perte de 98% de l'activité du mutant N127D permet de confirmer l'importance de ce résidu dans la catalyse enzymatique sans toutefois que les propriétés du mutant nous indiquent la nature de son rôle.

Ces travaux ont également permis de proposer le rôle d'acides aminés catalytiques aux acides glutamiques 128 et 236 de la xylanase A de *S. lividans* (Moreau *et al.*, 1994c). La perte d'activité enzymatique et l'absence de perturbation structurale ont permis d'en arriver à cette conclusion.

La thréonine en position 235 est voisine du nucléophile proposé (Glu 236). Le remplacement de la thréonine par une tyrosine n'affecte pas le mode d'action de l'enzyme. Même si on observe une perte d'activité spécifique de 42%, l'efficacité de la protéine envers le xylane de bouleau reflétée par la valeur de  $k_{cat}/K_m$  demeure semblable à celle de la protéine de type sauvage. D'autres mutations à cette position seront nécessaires pour attribuer un rôle exact à ce résidu qui fait partie d'une séquence hautement conservée chez les xylanases de la famille F.

L'acide aspartique en position 270 est assez éloigné du site catalytique de l'enzyme (Figure 19a). Peu de travaux ont été faits dans l'étude du mutant D270N. Cependant,

cette mutation affecte l'activité spécifique de l'enzyme en la diminuant de 61%. L'importance de ce résidu pourra être confirmée par l'étude des caractéristiques optimales de l'enzyme ainsi que par l'étude des paramètres cinétiques de la protéine.

Tous ces travaux ont été faits avant que la structure tridimensionnelle de l'enzyme ne soit connue. Cette information a permis, dans la plupart des cas, de confirmer et d'appuyer les conclusions obtenues par l'analyse des caractéristiques des protéines mutantes obtenues par mutagenèse dirigée. La connaissance de la structure tridimensionnelle de la xylanase A permettra, dans un avenir rapproché, la caractérisation détaillée du mécanisme d'action en raffinant l'analyse du rôle des acides aminés de la protéine.

## REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mes parents pour leur support financier et pour m'avoir encouragé à poursuivre mes buts. Je les remercie également pour la confiance qu'ils m'ont accordée même s'il était souvent difficile de me faire parler. Merci aussi pour l'intérêt porté à l'égard de mes études.

Je tiens aussi à remercier le docteur Dieter Kluepfel pour m'avoir permis de faire mes études dans ses laboratoires, pour l'aide financière apportée ainsi que pour ses nombreux conseils lors de la rédaction de ce mémoire. Je désire également remercier l'Institut Armand-Frappier pour le support financier apporté tout au long de la maîtrise.

Je veux dire merci tout particulièrement à Liette Biron pour son aide et ses précieux conseils ainsi qu'à Nicole Daigneault, Serge Durand, Lise Trempe et Yvon Lamontagne pour leurs nombreux conseils et pour l'aide apportée. Finalement je désire remercier Claude Dupont, François Shareck et Rolf Morosoli pour avoir toujours répondu à mes innombrables questions.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ames, G. F. L.; Prody, C.; Kustu, S. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 1984; **160**: 1181-1183.
- Apel, P. C.; Panaccione, D. G.; Holden, F. R.; Walton, J. D. Cloning and targeted gene disruption of XYL1, a beta-1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. *Molecular Plant - Microbe Interactions.* 1993; **6**: 467-473.
- Arase, A.; Yomo, T.; Urabe, I.; Hata, Y.; Katsube, Y.; Okada, H. Stabilization of xylanase by random mutagenesis. *FEBS Letters.* 1993; **316**: 123-127.
- Bailey, M. J.; Puls, J.; Poutanen, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1991; **13**: 380-389.
- Bastawde, K. B.; Tabatabaia, L. B.; Meagher, M. M.; Srinivasan, M. C.; Vartak, H. G.; Rele, M. V.; Reilly, P. J. Catalytic properties and partial amino acid sequence of an actinomycetes endoxylanase from *Chaina* sp. *Am. Chem. Soc. Symp. Series.* 1991; **460**: 417-425.
- Bedarkar, S.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Kwan, E.; Rose, D. R.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the catalytic domain of Cex, an exo- $\beta$ -1,4-glucanase and  $\beta$ -1,4-xylanase from the bacterium *Cellulomonas fimi*. *J.Mol.Biol.* 1992; **228**: 693-695.
- Bertrand, J-L; Morosoli, R.; Shareck, F.; Kluepfel, D. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 1989; **33**: 791-794.
- Béguin, P.; Chauvaux, S.; Salamitou, S.; Lemaire, M.; Millet, J.; Alzari, P.; Gounon, P.; Aubert, J. P. The multienzyme cellulolytic complexes of *Clostridium thermocellum*. *7e Symposium international sur la génétique des microorganismes d'intérêt industriel.* Montréal, Canada; 1994.
- Béguin, Pierre. Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 1990; 219-248.
- Biely, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.* 1985a; **3**: 286-290.

- Biely, P.; Kluepfel, D.; Morosoli, R.; Shareck, F. Mode of action of three endo- $\beta$ -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; **1162**: 246-254.
- Biely, P.; Kratky, Z.; Vrsanska, M.; Urmanicova, D. Induction and inducers of endo-1,4- $\beta$ -xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* 1980a; **108**: 323-329.
- Biely, P.; Kratky, Z.; Vrsanska, M. Substrate-binding site of endo-1,4- $\beta$ -xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* 1981a; **119**: 559-564.
- Biely, P.; Mislovicova, D.; Toman, R. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanases and endo-1,4- $\beta$ -glucanases. *Anal. Biochem.* 1985b; **144**: 142-146.
- Biely, P.; Vrsanska, M.; Kratky, Z. Complex reaction pathway of aryl  $\beta$ -xyloside degradation by  $\beta$ -xylanase of *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* 1980b; **112**: 375-381.
- Biely, P.; Vrsanska, M.; Kucar, S. Identification and mode of action of endo (1-4)- $\beta$ -xylanases. *Xylans and xylanases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992: 81-95.
- Biely, P.; Vrsanska, M.; Kratky, Z. Mechanisms of substrate digestion by endo-1,4- $\beta$ -xylanase of *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* 1981b; **119**: 565-571.
- Boucher, F.; Morosoli, R.; Durand, S. Complete nucleotide sequence of the xylanase gene from the yeast *Cryptococcus albidus*. *Nucl. Acids Res.* 1988; **16**: 9874.
- Bray, M. R.; Clarke, A. J. Essential carboxy groups in xylanase A. *Biochem. J.* 1990; **270**: 91-96.
- Bray, M. R.; Clarke, A. J. Identification of a glutamate residue at the active site of xylanase A from *Schizophyllum Commune*. *Eur. J. of Biochem.* 1994; **219**: 821-827.
- Campbell, R. L.; Rose, D. R.; Wakarchuk, W. W.; To, R.; Sung, W.; Yaguchi, M. A comparison of the structure of the 20 kd xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Bacillus circulans*. *Proceedings of the second TRICEL symposium on Trichoderma ressei cellulases and other hydrolases*. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research: Espoo; 1993; **8**: 63-72.

- Chauthaiwale, J.; Rao, M. Specific interaction of guanidine hydrochloride with essential carboxyl group of xylanase from alkalothermophilic *Bacillus* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **3**: 922-927.
- Clarke, A. J. Essential tryptophan residues in the function of cellulase from *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; **912**: 424-431.
- Daigneault-Sylvestre, N.; Kluepfel, D. Method for the rapid screening of cellulolytic Streptomycetes and their mutants. *Can. J. Microbiol.* 1979; **25**: 858-860.
- De Graaff, L. H.; Vandenbroeck, H. C.; Vanooijen, A. J. J.; Visser, J. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigenis*. *Mol. Microbiol.* 1994; **12**: 479-490.
- Derewenda, U.; Swenson, L.; Green, R.; Wei, Y.; Morosoli, R.; Shareck, F.; Kluepfel, D.; Derewenda, Z. S. Crystal structure, at 2.6 Å resolution of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 20811-20814.
- Deshpande, V.; Lachke, A.; Mishra, C.; Keskar, S.; Rao, M. Mode of action and properties of xylanase and β-xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng.* 1986; **28**: 1832-1837.
- Din, N.; Forsythe, I. J.; Burtnick, L. D.; Gilkes, N. R.; Miller, R. C.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G. The cellulose-binding domain of endoglucanase a (*Cena*) from *Cellulomonas Fimi* - evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.* 1994; **11**: 747-755.
- Ferreira, L. M. A.; Durrant, A. J.; Hall, J.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. *Biochem. J.* 1990; **269**: 261-264.
- Flint, H. J.; Martin, J.; McPherson, C. A.; Daniel, A. S.; Zhang, J. X. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and β-(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* 1993; **175**: 2943-2951.
- Fukusaki, E.; Panbangred, W.; Shinmyo, A.; Okada, H. The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (*xynA*) of *Bacillus pumilus*. *FEBS Lett.* 1984; **171**: 197-200.

- Ganju, R. K.; Vithayathil, P. J.; Murthy, S. K. Purification and characterization of two xylanases from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. *Can. J. Microbiol.* 1989; **35**: 836-842.
- Gat, O.; Lapidot, A.; Alchanati, I.; Regueros, C.; Shoham, Y. Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothersophilus* T-6 xylanase. *App. Environ. Microbio.* 1994; **60**: 1889-1896.
- Gebler, J.; Gilkes, N. R.; Claeysens, M.; Wilson, D. B.; Béguin, P.; Wakarchuk, W. W.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related  $\beta$ -1,4-glucanases and  $\beta$ -1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 12559-12561.
- Ghangas, G. S.; Hu, Y. J.; Wilson, D. B. Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 1989; **171**: 2963-2969.
- Gilbert H.J.; Hazlewood G.P.; Laurie J.I.; Orpin C.G.; Xue G.P. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol. Microbiol.* 1992; **6**: 2065-72.
- Gilbert, M.; Morosoli, R.; Shareck, F.; Kluepfel, D. Production and secretion of proteins by Streptomyces. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* accepté pour publication.
- Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J. Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbial. Rev.* 1991; **55**: 303-315.
- Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C.; Warren, R. A. J. Structural and functional analysis of a bacterial cellulase by proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 17802-17808.
- Gilkes, N. R.; Langsford, M. L.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.* 1984; **259**: 10455-10459.
- Golubev, A. M.; Kilimnik, A. Y.; Neustroev, K. N.; Pickersgill, R. W. Crystals of beta-xylanase from *Aspergillus oryzae*. *J. Mol. Biol.* 1993; **230**: 661-663.
- Graham, R. W.; Atkinson, T.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C.; Warren, R. A. J. Rational design and PCR-based synthesis of an artificial *Schizophyllum commune* xylanase gene. *Nucl. Ac. Res.* 1993; **21**: 4923-4928.



- Greve, L. C.; Labavitch, J. M.; Hungate, R. E.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; **47**: 1135-1140.
- Grépinet, O.; Chebou, M-C; Béguin, P. Purification of *Clostridium thermocellum* xylanase Z expressed in *Escherichia coli* and identification of the corresponding product in the culture medium of *C. thermocellum*. *J. Bacteriol.* 1988; **170**: 4576-4581.
- Gusek, T. W.; Kinsella, J. E. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* 1992; **18**: 247-260.
- Haas, H.; Herfurth, E.; Stoffler, G.; Redl, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; **1117**: 279-286.
- Hall, J.; Hazlewood, G. P.; Huskisson, N. S.; Durrant, A. J.; Gilbert, H. J. Conserved serine-rich sequences in xylanase and cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*: internal signal sequence and unusual protein processing. *Mol. Microbiol.* 1989; **3**: 1211-1219.
- Hamamoto, T.; Honda, H.; Kudo, T.; Horikoshi, K. Nucleotide sequence of the xylanase A gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125. *Agric. Biol. Chem.* 1987; **51**: 953-955.
- Hardy, L. W.; Poteete, A. R. Reexamination of the role of Asp20 in catalysis by bacteriophage T4 lysozyme. *Biochemistry.* 1991; **30**: 9457-9463.
- Henrissat, B. Analysis of hemicellulases sequences. Relationships to other glycanases. Xylans and xylanases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992: 97-110.
- Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 1991; **280**: 309-316.
- Henrissat, B.; Claeyssens, M.; Tomme, P.; Lemesle, L.; Mornon, J. P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene.* 1989; **81**: 83-95.
- Honda, H.; Kudo, T.; Ikura, Y.; Korikoshi, K. Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* sp. No. C-125. *Can. J. Microbiol.* 1985; **31**: 538-542.

- Hopwood, D. A.; Bibb, M. J.; Chater, K. F.; Kieser, T.; Bruton, C. J.; Kieser, H. M.; Lydiate, D. J.; Smith, C. P.; Ward, J. M.; Schrempf, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. Norwich: The John Innes Foundation; 1985.
- Ito, K.; Ikemasu, T.; Ishikawa, T. Cloning and sequencing of the *xynA* gene encoding xylanase A of *Aspergillus kawachii*. Biosc. Biotech. Biochem. 1992a; **56**: 906-912.
- Ito, K.; Iwashita, K.; Iwano, K. Cloning and sequencing of the *xynC* gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. Biosc. Biotech. Biochem. 1992b; **56**: 1338-1340.
- Jones, K. L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. J. Bact. 1949; **57**: 141-145.
- Katsube, Y.; Hata, Y.; Yamaguchi, H.; Moriyama, H.; Shinmyo, A.; Okada, H. Estimation of xylanase active site from crystalline structure. Proc. of the Second International Conference on Protein Engineering. Japan: Japan Scientific Societies Press, Springer Verlag; 1990; **161**: 77.
- Katz, E.; Thompson, C. J.; Hopwood, D. A. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. 1983; **129**: 2703-2714.
- Kellett, L. E.; Poole, D. M.; Ferreira, L. M. A.; Durrant, A. J.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. Biochem. J. 1990; **272**: 369-376.
- Keskar, S. S.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V. Characterization and sequencing of an active-site cysteine-containing peptide from the xylanase of a thermotolerant *Streptomyces*. Biochem. J. 1992; **281**: 601-605.
- Keskar, S. S.; Srinivasan, M. C.; Deshpande, V. V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Biochem. J. 1989; **261**: 49-55.
- Klaus, R.; Fisher, W. Quantitative thin-layer chromatography of sugars, sugar acids, and polyalcohols. Wood W.A.; Kellogg, S. T. Methods in Enzymology. San Diego, California: Academic Press; 1988; **160**: 159-175.
- Kluepfel, D.; Daigneault, N.; Morosoli, R.; Shareck, F. Purification and characterization of a new xylanases (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; **36**: 626-631.

- Kluepfel, D.; Vats-Mehta, S.; Aumont, F.; Shareck, F.; Morosoli, R. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem.J.* 1990; **267**: 45-50.
- Ko, E. P.; Akatsuka, H.; Moriyama, H.; Shinmyo, A.; Hata, Y.; Katsube, Y.; Urabe, I.; Okada, H. Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*. *Biochem. J.* 1992; **288**: 117-121.
- Koshland, D.E.Jr. Effect of catalysts on the hydrolysis of acetyl phosphate. Nucleophilic displacement mechanisms in enzymic reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; **74**: 2286-2296.
- Koyama, H.; Ujiie, M.; Taniguchi, H.; Sasaki, T. Purification and some properties of xylan-hydrolysing enzymes from *Robillarda* sp. Y-20. *Enzyme Microb. Technol.* 1990; **12**: 218-224.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **227**: 680- 685.
- Lee, Y. E.; Lowe, S. E.; Henrissat, B.; Zeikus, J. G. Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A- RI. *J. Bacteriol.* 1993; **175**: 5890-5898.
- Lever, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Chem.* 1972; **47**: 273-279.
- Lin, L. L.; Thomson, J. A. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 73 kDa xylanase enzyme from the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Mol. Gen. Genet.* 1991; **228**: 55- 61.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265-275.
- Lüthi, E.; Love, D. R.; McAnulty, J.; Wallace, C.; Caughey, P. A.; Saul, D.; Bergquist, P. L. Cloning, sequence analysis, and expression of gene encoding xylan-degrading enzymes from the thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; **56**: 1017-1024.
- Lüthi, E.; Reif, K.; Jasmat, N. B.; Bergquist, P. L. In vitro mutagenesis of a xylanase from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992; **36**: 503-506.

- Maat, J.; Roza, M.; Verbakel, J.; Santos da Silva, M. J.; Bosse, M.; Egmond, M. R.; Hagemans, M. L. D.; van Gorcom, R. F. M.; Hessing, J. G. M.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; van Rotterdam, C. Xylanases and their application in bakery. Xylans and xylanases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992: 349-360.
- Manin, C.; Shareck, F.; Morosoli, R.; Kluepfel, D. Purification and characterization of an alpha-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). *Biochem. J.* 1994; **302**: 443-449.
- Mannarelli, B. M.; Evans, S.; Lee, D. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the anaerobic ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.* 1990; **172**: 4247-4254.
- Mathupala, S. P. Biochemical characterization of amylopullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. PhD. thesis, Michigan State University, East Lansing. 1992;
- Mead, D. A.; Szczesna-Skorupa, E.; Kemper, B. Single-stranded DNA blue T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Prot. Eng.* 1986; **1**: 67-74.
- Miller, G. L.; Blum, R.; Glennon, W. E.; Burton, A. L. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 1960; **2**: 127-132.
- Mitsuishi, Y.; Yamanobe, T.; Yagisawa, M. The modes of action of three xylanases from mesophilic fungus strain Y-94 on xylooligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* 1988; **52**: 921-927.
- Mondou, F.; Shareck, F.; Kluepfel, D. Cloning of the xylanase of *Streptomyces lividans*. *Gene.* 1986; **49**: 323-329.
- Moreau, A. Étude de la xylanase de *Streptomyces lividans* 1326 par mutagénèse dirigée. Thèse de Ph.D., Université de Montréal. 1993;
- Moreau, A.; Roberge, M.; Manin, C.; Shareck, F.; Kluepfel, D. et Morosoli, R. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 1994c; **302**: 291-295.
- Moreau, A.; Shareck, F.; Kluepfel, D.; Morosoli, R. Alteration of the cleavage mode and of the transglycosylation reactions of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-directed mutagenesis of the Asn173 residue. *Eur. J. Biochem.* 1994a; **219**: 261-266.

- Moreau, A.; Shareck, F.; Kluepfel, D.; Morosoli, R. Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-specific mutagenesis. *Enzyme Microb. Technol.* 1994b; **16**: 420-424.
- Moriyama, H.; Hata, Y.; Yamaguchi, H.; Sato, M.; Shinmyo, A.; Tanaka, N.; Okada, H.; Katsube, Y. Crystallization and preliminary X-ray studies of *Bacillus pumilus* IPO xylanase. *J. Mol. Biol.* 1987; **193**: 237-238.
- Morosoli, R.; Bertrand, J. L.; Mondou, F.; Shareck, F.; Kluepfel, D. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 1986; **239**: 587-592.
- Morosoli, R.; Durand, S. Molecular cloning of mRNA sequences encoding xylanase from *Cryptococcus albidus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988; **51**: 217-224.
- Nagashima, M.; Okumoto, Y.; Okanishi, M. Nucleotide sequence of the gene of extracellular xylanase in *Streptomyces* sp. no. 36a and construction of secretion vectors using xylanase gene. *Trends in Actinomycetologia.* 1989; 91-96.
- Nakamura, S.; Wakabayashi, K.; Nakai, R.; Aono, R.; Horikoshi, K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* Sp strain-41M-1. *App. Environ. Microbiol.* 1993; **59**: 2311-2316.
- Nishitani, K.; Nevins, D. J. Glucuronoxylan xylanohydrolase: a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 6539-6543.
- Oku, T.; Roy, C.; Watson, D. C.; Wakarchuk, W.; Campbell, R.; Yaguchi, M.; Jurasek, L.; Paice, M. G. Amino acid sequence and thermostability of xylanase A from *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters.* 1993; **334**: 296-300.
- O'Neill, G.; Goh, S. H.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr. Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. *Gene.* 1986; **44**: 325-330.
- Paice, M. G.; Bourbonnais, R.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Yaguchi, M. A xylanase gene from *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence and comparison with *B. pumilus* gene. *Arch. Microbiol.* 1986; **144**: 201-206.
- Paradis, F. W.; Zhu, H.; Krell, P. J.; Phillips, J. P.; Forsberg, C. W. The *Xync* gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains. *J. Bacteriol.* 1993; **175**: 7666-7672.

- Pickersgill, R. W.; Debeire, P.; Debeire-Gosselin, M.; Jenkins, J. A. Crystallization and Preliminary X-ray analysis of a thermophilic *Bacillus xylanase*. *J. Mol. Biol.* 1993b; **230**: 664-666.
- Pickersgill, R. W.; Jenkins, J. A.; Scott, M.; Connerton, I.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalytic domain of xylanase A from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. *J. Mol. Biol.* 1993a; **229**: 246-248.
- Poole, D. M.; Hazlewood, G. P.; Huskisson, N.; Virden, R.; Gilbert, H. J. The role of conserved tryptophan residues in the interaction of a bacterial cellulose binding domain with its ligand. *FEMS Lett.* 1993; **106**: 77-84.
- Reilly, P. J. Xylanases: structure and function. *Basic Life Sci.* 1981; **18**: 111-129.
- Rose, D. R.; Birnbaum, G. I.; Tan, L. U. L.; Saddler, J. N. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of a xylanase from *Trichoderma harzianum*. *J. Mol. Biol.* 1987; **194**: 755- 756.
- Saarelainen, R.; Paloheimo, M.; Fagerstrom, R.; Suominen, P. L.; Nevalainen, K. M. H. Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (Pi 9) gene *Xln2*. *Mol. Gen. Gen.* 1993; **241**: 497-503.
- Sakka, K.; Kojima, Y.; Kondo, T.; Karita, S.; Ohmiya, K.; Shimada, K. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium xylA* gene encoding xylanase A: identification of catalytic and cellulose binding domain. *Biosc. Biotech. Biochem.* 1993; **57**: 273- 277.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning, a laboratory manual.* : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Saul, D. J.; Williams, L. C.; Love, D. R.; Chamley, L. W.; Bergquist, P. L. Nucleotide sequence of a gene from *Caldocellum saccharolyticum* encoding exocellulase and endocellulase activity. *Nucleic Acids Res.* 1989; **17**: 439.
- Shareck, F.; Roy, C.; Yaguchi, M.; Morosoli, R.; Kluepfel, D. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene.* 1991; **107**: 75-82.
- Shen, H.; Schmuck, M.; Pilz, I.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J. Deletion of the linker connecting the catalytic and cellulose-binding domains of endoglucanase A (*CenA*) of *Cellulomonas fimi* alters its conformation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 11335-11340.

- Sierks, M. R.; Ford, C.; Reilly, P. J.; Svensson, B. Functional roles and subsite locations of Leu177, Trp178 and Asn182 of *Aspergillus awamori* glucoamylase determined by site-directed mutagenesis. *Protein Engineering*. 1993; **6**: 75-79.
- Simpson, H. D.; Haufler, U. R.; Daniel, R. M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochem. J.* 1991; **277**: 413-417.
- Sinnott, M. L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 1990; **90**: 1171-1202.
- Srinivasa, B. R.; Swaminathan, K. R.; Ganapathy, C.; Roy, R. P.; Murthy, S. K.; Vithayathil, P. J. The primary structure of xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Protein Seq. Data Anal.* 1991; **4**: 15-20.
- Timell, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* 1967; **1**: 45-70.
- Torronen, A.; Mach, R. L.; Messner, R.; Gonzalez, R.; Kalkkinen, N.; Harkki, A.; Kubicek, C. P. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. *Biotechnol.* 1992; **10**: 1461-1464.
- Torronen, A.; Rouvinen, J.; Ahlgren, M.; Harkki, A.; Visuri, K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of two major xylanases from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* 1993; **233**: 313- 316.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; **76**: 4350-4354.
- Tsujibo, H.; Miyamoto, K.; Kuda, T.; Minami, K.; Sakamoto, T.; Hasegawa, T.; Inamori, Y. Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; **58**: 371- 375.
- Tsujibo, H.; Sakamoto, T.; Miyamoto, K.; Hasegawa, T.; Fujimoto, M.; Inamori, Y. Amino acid composition and partial sequence of xylanases from a new subspecies, *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *alba* OPC-18. *Agric. Biol. Chem.* 1991; **55**: 2173-2174.
- Tull, D.; Withers, S. G.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Warren, R. A. J.; Aebersold, R. Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a "retaining" exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 15621-15625.

- Ujiie, M.; Roy, C.; Yaguchi, M. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. Appl. Environ. Microbiol. 1991; **57**: 1860-1862.
- Viswamitra, M. A.; Bhanumoorthy, P.; Ramakumar, S.; Manjula, M. V.; Vithayathil, P. J.; Murthy, S. K.; Naren, A. P. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of *Thermoascus aurantiacus* xylanase. J. Mol. Biol. 1993; **232**: 987-988.
- Vrsanska, M.; Gorbacheva, I. V.; Kratky, Z.; Biely, P. Reaction pathways of substrate degradation by an acidic endo-1,4- $\beta$ -xylanase of *Aspergillus niger*. Biochim.Biophys.Acta. 1982; **704**: 114-122.
- Wakarchuk, W. W.; Campbell, R. L.; Sung, W. L.; Davoodi, J.; Yaguchi, M. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. Protein Science. 1994; **3**: 467-475.
- Whistler, R.; Richards, E. L. Hemicelluloses. By Pigman, W.; Horton, D. The carbohydrates-chemistry and biochemistry. New York: Academic Press, Inc.; 1970; **2A**: 447-469.
- Withers, S. G.; Dombroski, D.; Berven, L. A.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr; Warren, R. A. J.; Gilkes, N. R. Direct 1-H N.M.R. determination of the stereochemical course of hydrolyses catalysed by glucanase components of the cellulase complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986; **139**: 487-494.
- Withers, S. G.; Street, I. P. Identification of a covalent  $\alpha$ -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a  $\beta$ -glucosidase. J. Am. Chem. Soc. 1988; **110**: 8551-8553.
- Wong, K. K. Y.; Tan, L. U. L.; Saddler, J. N. Multiplicity of  $\beta$ - 1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. 1988; **52**: 305-317.
- Wood, W. I.; Gitschier, J.; Lasky, L. A.; Laen, R. M. Base-composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; **82**: 1585-1588.
- Woodward, J. Xylanases: functions, properties and applications. Top. enz. Ferment. Biotechnol. 1981; **8**: 9-30.
- Yaguchi, M.; Roy, C.; Watson, D. C.; Rollin, F.; Tan, L. U. L.; Senior, D. J.; Saddler, J. N. The amino acid sequence of the 20 KD xylanase from *Trichoderma harzianum* E58. Proc. Intl Symposium on Xylans and Xylanases. 1992.



- Yang, R. C. A.; MacKenzie, C. R.; Narang, S. A. Nucleotide sequence of *Bacillus circulans* xylanase gene. Nucl. Acids Res. 1988; **16**: 7187.
- Zappe, H.; Jones, W. A.; Woods, D. R. Nucleotide sequence of a *Clostridium acetobutylicum* P262 xylanase gene (*xynB*). Nucl. Acids Res. 1990; **18**: 2179.
- Zhang, J. X.; Flint, H. J. A bifonctionnal xylanase encoded by the *xynA* gene of the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 comprises two dissimilar domains linked by an asparagine/glutamine-rich sequence. Mol. Microbiol. 1992; **6**: 1013-1023.

