

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

SYLVIE WITTMANN

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE DE LA CELLULASE B DE
Streptomyces lividans 66 ET CARACTÉRISATION DE L'ENZYME.

Août 1993

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
SOMMAIRE	ix
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.0 LES CELLULASES	4
1.1 Le substrat : La cellulose	4
1.2 Dérivés de la cellulose	7
1.3 Mécanisme d'action	7
1.4 Régulation	12
1.4.1 Induction	14
1.4.2 Répression	15
1.5 Micro-organismes producteurs de cellulases	16
1.5.1 Bactéries	16
1.5.2 Actinomycètes	17
1.5.3 Champignons	18
1.6 Propriétés physico-chimiques des cellulases	18
1.7 Applications	21
2.0 GÈNES DE CELLULASES	22
2.1 Clonage	22
2.2 Séquences	23
2.3 Structure et fonction des cellulases	24
2.3.1 Domaine catalytique	24
2.3.2 Domaine de liaison à la cellulose	32
3.0 Streptomycètes	32
3.1 Cellulases	33
OBJECTIFS	34

MATÉRIEL ET MÉTHODES:	35
1.0 PRODUITS	36
2.0 SOUCHES BACTÉRIENNES ET VECTEURS	38
2.1 <i>Streptomyces lividans</i>	38
2.2 <i>Escherichia coli</i>	38
2.3 Vecteurs d'expression	39
3.0 MILIEUX DE CULTURE	39
3.1 <i>S. lividans</i>	39
3.1.1 Conservation des souches	39
3.1.2 Milieu pour la production d'inoculum	40
3.1.3 Milieu pour la production de cellulase B	40
3.1.4 Milieu pour l'isolement de plasmides	41
3.2 <i>E.coli</i>	41
3.2.1 Milieu pour la détection de transformants	41
3.2.2 Milieu pour la croissance bactérienne	42
4.0 ISOLEMENT D'ADN PLASMIDIQUE	42
4.1 <i>S. lividans</i>	42
4.1.1 Extraction de l'ADN plasmidique	42
4.2 <i>E.coli</i>	43
4.2.1 Extraction de l'ADN plasmidique	43
4.2.2 Isolement d'ADN simple brin	44
4.3 Purification de l'ADN plasmidique au chlorure de césium	45
4.4 Analyse de l'ADN plasmidique	45
4.5 Hybridation moléculaire	45
5.0 CLONAGE DU GÈNE <i>celB</i> CHEZ <i>E. Coli</i>	46
6.0 SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>celB</i>	47
7.0 DOSAGE ET ANALYSE ENZYMATIQUES	48
7.1 Dosage des sucres réducteurs	48
7.2 Dosage des protéines	48
7.3 Définition des unités	49
7.4 Analyse qualitatif de l'activité cellulasique	49
7.5 Analyse enzymatique par zymogramme	49
8.0 PURIFICATION DE LA CELLULASE B	50
8.1 Récupération du surnageant	50
8.2 Chromatographie en phase liquide	50
8.2.1 Colonne échangeuse d'anions	50
8.2.2 Colonne à interaction hydrophobique	51
8.2.3 Équipement pour la chromatographie en phase liquide	51
8.3 HPLC: colonne échangeuse d'anions	52

8.4	Tamis moléculaire	53
8.5	Analyse sur SDS-PAGE de la pureté de la préparation enzymatique	54
8.6	Conservation de l'enzyme purifiée	54
9.0	CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA CELLULASE B	55
9.1	Masse moléculaire et point isoélectrique	55
9.2	pH et Température optimums	56
9.3	Temps d'incubation optimal	56
9.4	Cinétique enzymatique (K_m et V_{max})	56
9.5	Mode d'action	57
9.6	Séquençage du N-terminal	58
10.0	IMMUNO-DÉTECTION DE LA CELLULASE B ("Western Blot")	59
10.1	Production d'anticorps	59
10.2	Immuno-détection	59
	RÉSULTATS	61
1.0	CLONAGE DU GÈNE <i>celB</i>	62
2.0	SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>celB</i>	68
2.1	Homologie de séquence avec d'autres cellulases	72
3.0	PRODUCTION DE CELLULASE B	75
4.0	PURIFICATION DE LA CELLULASE B	77
4.1	Vérification de l'homogénéité de l'enzyme	80
5.0	CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA CELLULASE B	83
5.1	Masse moléculaire et point isoélectrique	83
5.2	pH et température optimums	85
5.3	Temps d'incubation optimal	85
5.4	Cinétique enzymatique (K_m et V_{max})	88
5.5	Mode d'action	90
6.0	IMMUNO-DÉTECTION DE LA CELLULASE B ("Western Blot")	99
	DISCUSSION	101
	CONCLUSION	111
	REMERCIEMENTS	113
	BIBLIOGRAPHIE	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	: Acide aminé
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADN _c	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP _c	: Adénosine 3',5'-cyclique monophosphate
Amp ^r	: Résistance à l'ampicilline
ARN	: Acide ribonucléique
ARN _{ase}	: Ribonucléase
ARN _m	: Acide ribonucléique messenger
ARN _t	: Acide ribonucléique de transfert
ATP	: Adénosine triphosphate
CBD	: Domaine de liaison à la cellulose ("Cellulose Binding Domain")
CMC	: Carboxyméthylcellulose
G ₂ -G ₆	: Oligomères de deux à six unités de glucose.
flIG	: Région intergénique fl
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
K _m	: Constante de Michaelis-Menten
nt	: Nucléotide
ORB-HEC	: Ostazine rouge brillant - Hydroxyéthylcellulose
Ori	: Origine de répliation
pb	: paire de bases
p.I.	: point isoélectrique
pLac	: Promoteur lactose
PMSF	: Phénylméthylsulfonyl fluoride
SDS-PAGE	: Gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS)
tsr ^r	: Résistance à la thiostreptone
V _{max}	: Vitesse maximale d'hydrolyse du substrat

Liste des tableaux**Revue bibliographique**

Tableau I	Propriétés physico-chimiques de certaines cellulases	19
Tableau II	Classification en familles des cellulases et des xylanases selon l'homologie du site catalytique	25

Résultats

Tableau III	Purification de la cellulase B de <i>S.lividans</i> IAF 9/8-83	81
-------------	--	----

Liste des figures

Revue bibliographique

Figure 1 :	Structure de la cellulose. A) liaisons glucosidiques B) Schéma d'une fibre de cellulose	5
Figure 2 :	Coupe transversale d'une fibre de bois	6
Figure 3 :	Schéma de dégradation enzymatique d'une fibre de cellulose	10
Figure 4 :	Modèle de régulation de la biosynthèse des cellulases	13
Figure 5 :	Mécanisme d'action. A) Mécanisme d'action du lysosyme B) Mécanisme d'action d'inversion de l'endoglucanase, CelD, de <i>Clostridium thermocellum</i>	29

Résultats

Figure 6 :	Structure moléculaire du plasmide pIAF9 a) Cartographie du plasmide pIAF 9 b) Migration en gel d'agarose	63
Figure 7 :	Cartographie des plasmides. A) pMC1 B) pMC6 C) pΔMC6	65
Figure 8 :	Hybridation moléculaire	67
Figure 9 :	Séquence nucléotidique et protéique du gène <i>celB</i> de <i>S. lividans</i>	70
Figure 10:	Peptide signal de la cellulase B	71
Figure 11:	Comparaison de la séquence en acides aminés de la cellulase B (Cel B) de <i>S.lividans</i> avec la cellulase d' <i>Aspergillus aculeatus</i> (FI-CMC _{ase})	73
Figure 12:	Comparaison de la séquence en acides aminés du domaine de fixation à la cellulose de la cellulase B (CelB) de <i>S.lividans</i> avec des séquences d'autres cellulases	74

Figure 13:	Zymogramme du surnageant de culture de <i>S.lividans</i> IAF9/8-83 en milieu M ₁₃ modifié contenant 1% de xylose	76
Figure 14:	Profil d'élution de la cellulase B de <i>S.lividans</i> IAF 9/8-83 sur colonne échangeuse d'anions (MONO Q HR 10/10), avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl	78
Figure 15:	Profil d'élution de la cellulase B de <i>S.lividans</i> IAF 9/8-83 sur tamis moléculaire ("Protein pak 300 SW")	79
Figure 16:	Vérification de l'homogénéité de l'enzyme sur SDS-PAGE	82
Figure 17:	Migration de la cellulase B en isoélectrofocalisation (IEF)	84
Figure 18:	Conditions optimales de l'activité cellulasique A) Effet du pH B) Effet de la température	86
Figure 19:	Temps optimal d'incubation A) Avec 1% de substrat B) Avec 2% de substrat	87
Figure 20:	Cinétique enzymatique de la cellulase B de <i>S.lividans</i> IAF 9/8-83 (graphique Lineweaver et Burk)	89
Figure 21:	Hydrolyse enzymatique du cellobiose A) Au temps zéro B) Après 3 h	91
Figure 22:	Hydrolyse enzymatique du cellotriose A) Au temps zéro B) Après 3 h	92
Figure 23:	Hydrolyse enzymatique du cellotétraose A) Au temps zéro B) Après 20 min C) Après 3 h	93
Figure 24:	Hydrolyse enzymatique du cellopentaose A) Au temps zéro B) Après 20 min C) Après 3 h	95
Figure 25:	Hydrolyse enzymatique du cellohexaose A) Au temps zéro B) Après 20 min C) Après 3 h	97
Figure 26:	Immuno-détection de la cellulase B de <i>S.lividans</i> IAF 9/8-83	100

SOMMAIRE

La souche sauvage *Streptomyces lividans* 66 produit plusieurs enzymes lignocellulolytiques dont la cellulase B. Afin de faciliter le séquençage du gène *cel B*, il a été sous-cloné chez *Escherichia coli*. Des homologies de séquences sont observées avec des cellulases provenant d'autres micro-organismes. Conséquemment, la cellulase B fait partie des glucanases de la famille H. Les domaines catalytiques et de liaison à la cellulose se retrouvent respectivement dans la portion N-terminale et C-terminale de la protéine.

La cellulase B est une enzyme extra-cellulaire qui est produite par le clone *S.lividans* IAF 9/8-83 en milieu M_{13} modifié contenant 1% de xylose. Malgré la grande instabilité de l'enzyme, la forme native a été isolée.

Les propriétés physico-chimiques de la cellulase B purifiée ont été déterminées. La masse moléculaire (36 kDa) et le p.I. (4.2) de l'enzyme sont déterminés respectivement par SDS-PAGE et par isoélectrofocalisation. L'activité enzymatique est optimale à pH 6.5 et à une température de 60°C. L'activité spécifique de l'enzyme est de 98 U.I./mg. Les valeurs de K_m et de V_{max} sont respectivement de 1.3 mg/ml et de 110 U.I./mg en utilisant la carboxyméthylcellulose comme substrat.

La cellulase B n'hydrolyse pas les cellooligosaccharides inférieurs à G_4 . L'enzyme dégrade facilement le G_4 , le G_5 et le G_6 , et des réactions de transglycosylation sont observées.

INTRODUCTION

Des milliards de tonnes de déchets lignocellulosiques sont générés annuellement par l'activité humaine (Stone, 1976). La lignocellulose est composée d'hémicellulose et de lignine qui enrobent les fibres de cellulose. La cellulose est la composante majeure de la lignocellulose. La bioconversion de la cellulose par un mélange approprié de cellulases conduit à la libération de résidus glucose qui peuvent être utilisés pour la production d'éthanol par fermentation (Robson et Chambliss, 1989). Les cellulases peuvent également être utilisées dans le processus de désencrage du papier à recycler (Flandroy, 1991).

La bioconversion de la lignocellulose est réalisée par des micro-organismes qui ont la capacité de produire des enzymes telles que les cellulases et les xylanases (Kluepfel et al., 1992). *Streptomyces lividans* 66 est une bactérie du sol qui produit plusieurs enzymes lignocellulolytiques. Une cellulase (Théberge et al., 1992), une mannanase (Arcand et al., 1993) et trois xylanases (Kluepfel et al., 1992; Mondou et al., 1986; Shareck et al., 1991; Vats-Mehta et al., 1990) ont été purifiées, caractérisées et les gènes codants ces protéines ont été séquencés. Pour une meilleure compréhension du mécanisme de bioconversion de la lignocellulose par *S.lividans*, il est nécessaire de connaître les caractéristiques des enzymes impliquées. Alors ce travail consiste au clonage, séquençage du gène de la cellulase B et caractérisation de la protéine.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 Les cellulases

1.1 Le substrat : La cellulose

Le polysaccharide le plus abondant qui soit disponible à partir de la biomasse végétale est la cellulose. La cellulose est un polymère linéaire insoluble composée de 100 à 10 000 résidus glucose liés en β -1,4. Le motif répété de base est le cellobiose (Béguin et Aubert, 1992) (Figure 1A). La superposition en parallèle de tels polymères constitue une fibre de cellulose dont la cohésion est assurée par de nombreuses liaisons hydrogènes (intra- et inter-moléculaires). La fibre de cellulose comporte des régions amorphes et cristallines (Figure 1B). Les régions amorphes sont relâchées, contrairement aux régions cristallines qui présentent une structure compacte à cause des nombreuses liaisons hydrogènes retrouvées (Whistler et Smart, 1953). Plus le degré de cristallinité est élevé, plus la cellulose est résistante à l'hydrolyse enzymatique (Aubert, 1992).

Les fibres de cellulose sont souvent associées à d'autres structures chimiques telles que: l'hémicellulose et la lignine (Cowling et Kirk, 1976). Cette association est désignée sous le nom de lignocellulose. Cette structure peut être observée dans une coupe transversale d'une fibre de bois où on retrouve l'hémicellulose et la lignine qui enrobent les fibres de cellulose (Figure 2). Cette gaine rigide rend difficile l'accessibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique.

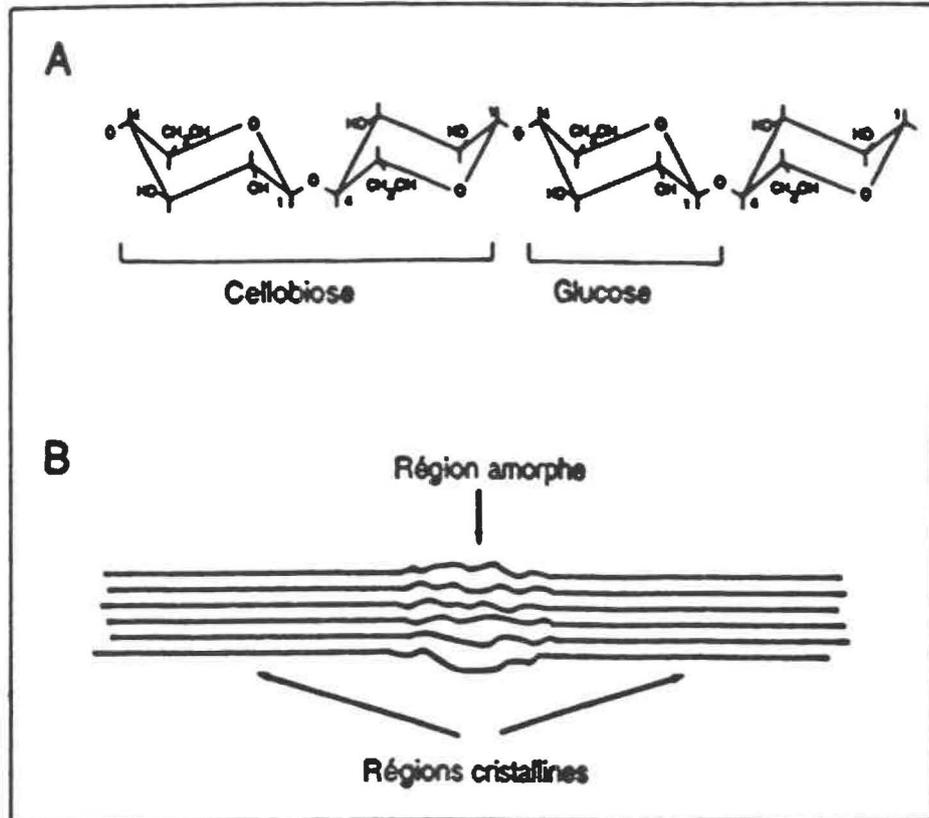
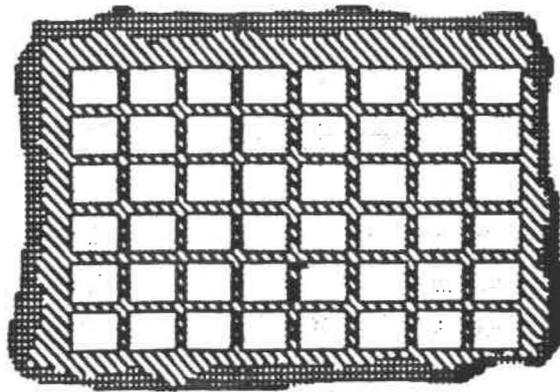


Figure 1: Structure de la cellulose
(Béguin et Aubert, 1992)

A: Liaisons glucosidiques
B: Schéma d'une fibre de cellulose



■ Fibre de cellulose

▨ Hémicellulose

■ Lignine

Figure 2: Coupe transversale d'une fibre de bois
(Béguin et Gilkes, 1987)

Un pré-traitement chimique ou physique du matériel lignocellulosique est nécessaire afin d'augmenter l'accessibilité de la cellulose native à l'hydrolyse enzymatique (Wood et Saddler, 1988).

1.2 Dérivés de la cellulose

La carboxyméthylcellulose (CMC) est une cellulose modifiée chimiquement par addition covalente de radicaux $-CH_2COOH$ (Aubert, 1992). Ce substrat soluble est souvent employé pour doser l'activité cellulasique en milieu liquide ou pour détecter la présence de cellulases sur milieu solide.

L'ostazine rouge brillant - hydroxyéthylcellulose (ORB-HEC) est également une cellulose modifiée qui est couramment employé pour détecter sur milieu solide l'activité cellulasique. Il s'agit d'un composé chromogénique qui provient du couplage d'un colorant (ORB) à un dérivé de la cellulose, soit l'hydroxyéthylcellulose (HEC) (Biely et al., 1985).

1.3 Mécanisme d'action

Petersson (1975) a décrit un modèle de conversion de la cellulose en glucose - un monosaccharide facilement métabolisable. Le mécanisme de dégradation requiert la participation de trois types de cellulases: les endoglucanases ou 1,4- β -D-glucane glucanohydrolases (EC. 3.2.1.4), les

exoglucanases ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases (EC. 3.2.1.91) et les β -1,4-glucosidases (EC. 3.2.1.21). Il est maintenant admis que l'hydrolyse de la cellulose implique l'action synergique de ces trois types de cellulases (Wood et M^cCrae, 1977).

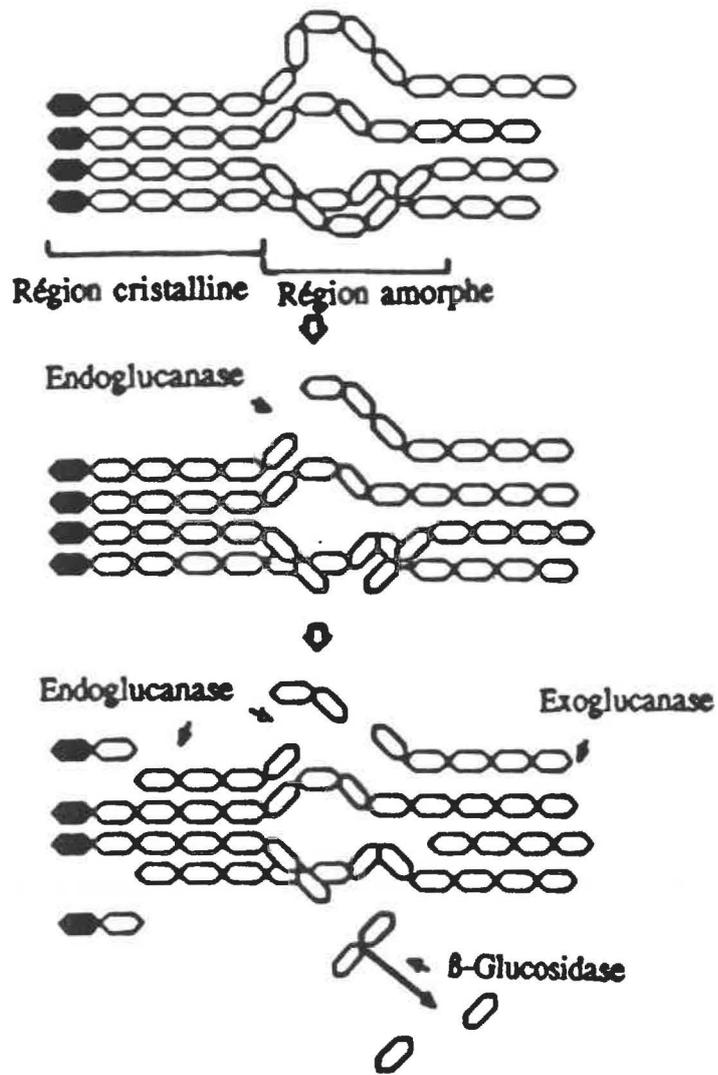
Le système cellulolytique actuellement le mieux décrit est celui d'un champignon : *Trichoderma reesei* (Marsden et al., 1982; Wood T.M et S.I.M^cCrae, 1978). *T. reesei* produit deux endoglucanases (EGI et EGII), deux exoglucanases (CBHI et CBHII) et une β -1,4 glucosidase (Béguin et al., 1992). En général, les champignons tels que *Trichoderma* sécrètent dans le milieu de culture les trois types d'enzymes. Par contre, chez les bactéries, seul les cellulases de types "endo" et "exo" sont sécrétées alors que la β -glucosidase se retrouve au niveau intracellulaire (Béguin et Gilkes, 1987).

Les cellulases sont différenciées par leur mode d'action sur la cellulose (figure 3). Les endoglucanases hydrolysent les liaisons glucosidiques β -1,4 au niveau des régions amorphes. Elles libèrent des extrémités non réductrices qui deviennent la cible préférentielle des exocellulases libérant du cellobiose. Les exoglucanases peuvent aussi s'attaquer aux régions cristallines. Le cellobiose est hydrolysé en 2 molécules de glucose par les β -glucosidases.

En se basant sur le mécanisme d'hydrolyse du substrat, il est possible de distinguer les cellulases de type "endo" et de type "exo" par des mesures viscosimétriques (Almin et al., 1975). Les enzymes de type "endo" ont une activité élevée sur la CMC, qui est hydrolysée au hasard à l'intérieur de la molécule. Ce qui entraîne une diminution rapide du degré de polymérisation des molécules de cellulose, correspondant à une diminution de la viscosité de la solution. Les enzymes de type "exo" conduisent à une diminution plus lente de la viscosité puisqu'elles attaquent la CMC par l'extrémité non réductrice. Il faut donc attendre plus longtemps avant que cette hydrolyse séquentielle produise un effet sur la viscosité de la solution.

Figure 3: Schéma de dégradation enzymatique d'une fibre de cellulose
(Béguin et Gilkes, 1987)

- A) Fibre de cellulose comportant des régions amorphes et cristallines.
- B) Action des endoglucanases sur les régions amorphes et libération d'extrémités non réductrices.
- C) Action des exoglucanases sur la cellulose au niveau des extrémités non réductrices et libération du cellobiose par action synergique des endoglucanases et des exoglucanases.
- D) Action des β -glucosidases sur le cellobiose et libération de monomères de glucose.



1.4 Régulation

Un modèle sur la régulation de la biosynthèse du système cellulasique bactérien est présenté en figure 4.

La cellulose est un polymère insoluble qui ne peut pas pénétrer à l'intérieur de la cellule. Seuls les produits d'hydrolyse de faible poids moléculaire peuvent pénétrer par transport actif ou par diffusion. Mandels et Reese (1960) ont suggéré que ces sous-produits seraient générés par des cellulases constitutives présentes à un très faible niveau.

Greenberg et al.(1987) ont démontré la présence de deux promoteurs permettant l'initiation de la transcription du gène *cenB* de *Cellulomonas fimi*. Le promoteur distal *cenBp1* qui est induit par la présence de produits d'hydrolyse de la cellulose et un promoteur distal *cenBp2* qui permet la transcription constitutive du gène. Cet arrangement en tandem d'un promoteur régulé et d'un promoteur constitutif ressemble à celui des promoteurs de l'opéron galactose de *Streptomyces lividans* (Fornwald et al., 1987).

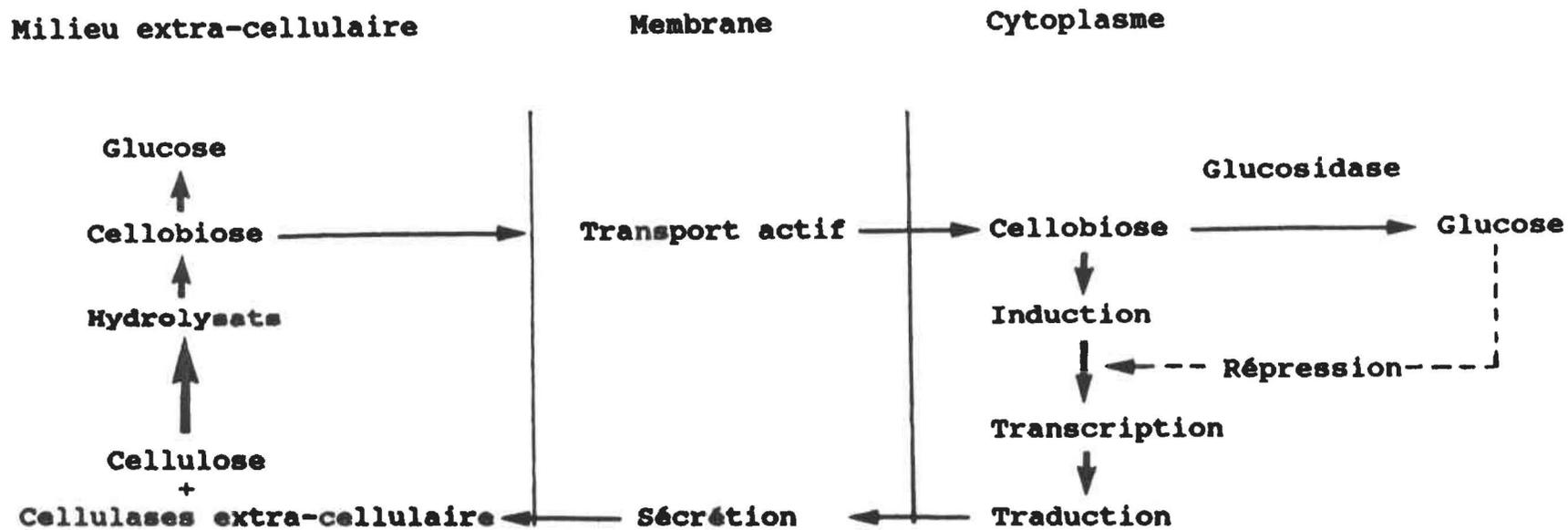


Figure 4: Modèle de la régulation de la biosynthèse des cellulases (Gong et Tsao, 1979)

1.4.1 Induction

Le cellobiose fait partie des sous-produits générés par l'hydrolyse de la cellulose et est considéré comme un bon inducteur lorsqu'il est présent en faible quantité. Cependant, lorsqu'il est présent à une concentration élevée, les molécules de glucose libérées par l'action de la β -glucosidase conduisent à la répression catabolique du système cellulasique (Gong et Tsao, 1979) (voir section 1.4.2).

Ericksson et Hamp (1978) ont étudié l'influence du cellobiose chez *Sporotrichum pulverulentum*. Il ont observé que le cellobiose a un pouvoir d'induction et le système cellulasique est moins susceptible à la répression catabolique par le glucose. Ceci est expliqué par la présence intracellulaire d'une glucose oxidase qui oxyde le glucose en gluconolactone. Ce dernier est un inhibiteur de la β -glucosidase permettant de conserver la capacité d'induction du cellobiose et, le glucose n'a pas d'effet d'inhibiteur puisqu'il est oxydé (Ericksson, 1978).

Stenberg et Mandels (1980) ont observé chez *Trichoderma viride* que le sophorose (2-o- β -D-glucoopyranosyl-D-glucose) a un pouvoir d'induction plus élevé que le cellobiose. Le sophorose agissant comme répresseur de la synthèse de β -glucosidase élimine ainsi le risque de répression catabolique par le glucose.

Au niveau moléculaire les seuls résultats rapportés concernent une protéine de régulation du gène *celE* de *Thermomonospora fusca*. Il s'agit d'un élément qui agit en *trans* et qui ressemble à une protéine activatrice. Le rôle régulateur de la protéine est confirmé car elle se retrouve seulement dans les cellules induites. Sur le gène *celE*, la protéine régulatrice se lie à une séquence de 21 nucléotides située à en aval du promoteur (Lin et Wilson, 1988).

1.4.2 Répression

La présence d'une forte concentration de glucose conduit à la répression catabolique. Il s'agit d'un rôle possible de l'AMP_c au niveau de l'activité transcriptionnelle. Chez la bactérie *Thermomonospora curvata*, il y a une corrélation entre le taux d'AMP_c et le taux de production de cellulases. Un taux élevé de glucose réduit la quantité d'AMP_c impliquant une diminution de l'activité transcriptionnelle (Wood et al., 1984).

El-Gogary et al. (1989) ont démontré que la régulation de la *cbhI* de *Trichoderma reesei* se fait au niveau transcriptionnel. Le niveau d'ARN_m de la *cbhI* augmente lorsque la souche croît en présence d'avicel (cellulose microcristalline), tandis que le niveau d'ARN_m diminue en présence de glucose.

1.5 Micro-organismes producteurs de cellulases

Coughlan (1985) a regroupé les micro-organismes cellulolytiques ayant un intérêt commercial en 3 groupes distincts: les bactéries, les actinomycètes et les champignons. Ils sont retrouvés partout où il y a présence de résidus cellulosiques. En général, dans les niches écologiques, l'association de populations mixtes de micro-organismes conduit à la dégradation complète de la cellulose. La dégradation de la lignine est réalisée par les champignons rendant ainsi la cellulose accessible à la dégradation enzymatique. La cellulose est hydrolysée par l'action synergique des bactéries et des champignons. Les actinomycètes et les champignons ont la caractéristique de posséder un système de sécrétion enzymatique efficace leur conférant ainsi un grand pouvoir de dégradation de la cellulose.

1.5.1 Bactéries

Les enzymes du système cellulolytique des genres *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium* et *Ruminococcus* sont bien connues (Lori et Chamblis, 1989).

Dans les niches anaérobies, la dégradation de la cellulose est due principalement aux genres *Acetivibrio*, *Clostridium* et *Ruminococcus* (Béguin et Aubert, 1992).

Le système cellulolytique bactérien le mieux caractérisé est celui de *Clostridium thermocellum*. Cette bactérie sécrète un grand nombre d'enzymes cellulolytiques et elle peut fermenter directement la cellulose en éthanol, acide acétique et en acide lactique (Robson et Chambliss, 1989). Lamed et al. (1983) ont identifié la présence d'un complexe multienzymatique désigné sous le nom de cellulosome qui est associé à la surface externe de la cellule. Il est formé de 15 à 20 protéines et possède une masse moléculaire de 2.5 MDa (Mori, 1992). Cette structure permet aux cellules de s'attacher aux fibres de cellulose et de les hydrolyser efficacement.

1.5.2 Actinomycètes

Le groupe des actinomycètes sont des bactéries filamenteuses du sol, gram (+), qui possèdent un cycle de vie conduisant à la différenciation et à la sporulation. Ainsi, les genres *Streptomyces* et *Thermomonospora* font partie de ce groupe (Coughlan, 1985).

Les actinomycètes produisent des cellulases, des hémicellulases et des lignocellulases qui sont impliquées dans la dégradation de la biomasse végétale (Kluepfel, 1991). Ces enzymes sont efficaces pour la bioconversion des déchets lignocellulosiques (Catton, 1983).

1.5.3 Champignons

Les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sporotrichum* et *Trichoderma* ont un intérêt industriel dans divers domaines (l'agro-alimentation, les papetières, le textile...). Dans le domaine de l'alimentation animal, il existe des préparations enzymatiques de *Trichoderma reesei* et d'*Aspergillus* qui sont utilisées pour augmenter la digestibilité de la nourriture végétale du bétail (Béguin et Aubert, 1992). Dans un autre domaine, l'addition de cellulases aux poudres de lessives permet de redonner de l'éclat à la couleur des vêtements de coton ternis par l'apparition de microfibrilles.

Trichoderma reesei possède le système cellulolytique le plus complet (Coughlan, 1985; Wood et Garcia-Campayo, 1990). Il est considéré comme le micro-organisme le plus efficace pour la bioconversion de la cellulose et il constitue le micro-organisme le plus convoité en industrie (Beldman et al., 1985).

1.6 Propriétés physico-chimiques des cellulases

Le tableau I montre les propriétés physico-chimiques de cellulases de différents micro-organismes. Les propriétés physico-chimiques peuvent varier d'un micro-organisme à l'autre ou, d'une enzyme à l'autre chez une même espèce microbienne.

La caractérisation des enzymes est importante afin de déterminer leur implication lors de l'hydrolyse de la cellulose.

Tableau I: Propriétés physico-chimiques de certaines cellulases

Microorganismes	nom	P.M. (kDa)	pI	Optimum		K _m (mg/ml)	V _{max} (UI/mg)	Act.spécifique (UI/mg)	Références
				T (°C)	pH				
<i>Aspergillus aculeatus</i>	FI- CMC _{max}	25	4.8	50	4.5				Murao <i>et al.</i> , 1988
<i>Aspergillus niger</i>		31	3.6		4.0			116.8	Okada, 1988
<i>Cellulomonas uda</i>	CelI	81		45-50	5.5-6.5	2.9*		0.016	Nakamura et Kitamura, 1988
	CelII	48					60.9		
	CelIII	55					10.6		
	CelIV	48					62.3		
	CelV	55					48.0		
	CelVI	56					4.7		
<i>Cellulomonas fimi</i>	CB1	58						370.0	Gilkes <i>et al.</i> , 1984
	CB2	56						85.0	
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	EGCCA	51		60	6.5			64.3	Fierobe <i>et al.</i> , 1991
<i>Clostridium thermocellum</i>	EGA	56		75	5.5			140.0	Grépinet et Bégin, 1986
	EGB	66							
	EGC	40	6.2	60	6.0			27.0	
	EGD	65	5.4			6.0			
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	CelS	27	5.5	45-55	6.8				Saarilahti <i>et al.</i> , 1990

Les valeurs de K_m, de V_{max} et de l'activité spécifique rapportées sont déterminées sur de la CMC sauf exception.

* Les valeurs de K_m et de V_{max} sont estimées avec de l'avicel

Tableau I: (suite)

Microorganismes	nom	P.M. (kDa)	pI	Optimum		K _m (mg/ml)	V _{max} (UI/mg)	Act.spécifique (UI/mg)	Références
				T (°C)	pH				
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	CelY	35	8.2		5.5			200.0	Boyer <i>et al.</i> , 1987
	CelZ	45	4.5		7.0			33.0	
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Exo	45	4.1						MacKenzie <i>et al.</i> , 1984
<i>Streptomyces lividans</i>	CelA	46	3.3	50	5.5	4.20		539.0	Théberge <i>et al.</i> , 1992
<i>Thermomonospora fusca</i>	E1	108	3.2		6.5	0.36		1100.0	Wilson, 1988
	E2	42	4.7		6.5	0.12		100.0	
	E3	71	3.1					3.9	
	E4	106	3.6					6.0	
	E5	45	4.5					150.0	
<i>Trichoderma reesei</i>	EGLMM	25	7.5	52	5.8				Sprey et Uelker, 1992
<i>Trichoderma viride</i>	ENDO I	50	5.3	60	5.0	46.3*	0.196*	13.1	Beldman <i>et al.</i> , 1985; Voragen <i>et al.</i> , 1988
	ENDO II	45	6.9	60	4.0	90.6*	0.099*	20.1	
	ENDO III	58	6.5	60	5.0	14.4*	0.085*	3.2	
	ENDO IV	23	7.7	48	5.5	130.7*	0.152*	9.6	
	ENDO V	57	4.4	50	4.5	64.3*	0.133*	14.7	
	ENDO VI	52	3.5	50	4.5	122.9*	0.122*	15.8	
	EXO I	53	5.3	60	5.5-5.7	—	—	1.8	
	EXO II	60	3.5	52	—	44.1*	0.060*	0.26	
	EXO III	62	3.8	52	4.5-7.0	12.0*	0.019*	0.033	
	β-glucl	76	3.9	52	4.7	—	—	—	

Les valeurs de K_m, de V_{max} et de l'activité spécifique rapportées sont déterminées sur de la CMC sauf exception.

* Les valeurs de K_m et de V_{max} sont estimées avec de l'avicel

1.7 Applications

Les activités humaines conduisent à l'accumulation de déchets lignocellulosiques. Des procédés biologiques doivent être développés afin de recycler cette biomasse végétale.

Une des avenues possible est la bioconversion de la biomasse en éthanol. Trotter (1990) a rapporté qu'un groupe de recherche a réussi à traiter les résidus végétaux provenant du tremble en ajoutant les souches *Brettanomyces clausenii* et *Pichia stipitis* permettant respectivement l'hydrolyse de la biomasse végétale et la fermentation des sucres libérés. Ils ont ainsi obtenu un rendement de 384 L d'éthanol/tonne en poids sec de résidus végétaux.

Le papier constitue une source cellulosique importante et il y a de plus en plus de pression pour réutiliser les fibres de papier. Par ailleurs, les États-Unis légifèrent pour que les pâtes de papier contiennent au moins 40% de fibres recyclées (Delatte, 1990). Il existe un procédé de biodésencrage qui nécessite l'emploi de cellulases et de lipases. Les cellulases facilitent le décollement des encres, et les lipases agissent sur les huiles végétales qui lient les pigments de certaines encres (Flandroy, 1991).

2.0 Gènes de cellulases

2.1 Clonage

Grâce au clonage et séquençage de gènes, les séquences en acides aminés de plus de 50 cellulases sont actuellement connues (Béguin et al., 1992). Le clonage hétérologue chez *E. coli*, pour la localisation et le séquençage de gènes, a été largement utilisé (Whittle et al., 1982).

Chez les bactéries gram (+), comme *Streptomyces lividans*, les protéines sont sécrétées au niveau extra-cellulaire (Kluepfel, 1991). Cependant les bactéries gram (-), telle que *E. coli*, ne possèdent pas de système de sécrétion efficace (Merivuori et al., 1985). Le clonage homologue permet d'éviter les problèmes de sécrétion rencontrés généralement lors du sous-clonage chez *E. coli*. Le clonage homologue a permis d'isoler des gènes codant pour trois xylanases (A, B et C) de *S. lividans* chez un hôte mutant xylanase négatif (Mondou et al., 1986; Vats-Mehta et al., 1990).

Dans certains cas, le sous-clonage peut conduire à une augmentation de l'expression du gène de structure. Le sous-clonage chez *S. lividans* du gène E₅, codant pour une cellulase de *Thermomonospora fusca*, a permis d'obtenir un niveau d'expression élevé. Le niveau d'expression était nul lors du sous-clonage chez *Bacillus subtilis* (Changas et Wilson, 1987).

Les procaryotes ne possèdent pas le système essentiel à l'épissage des introns des gènes eucaryotes. Pour résoudre ce

problème, il est possible de synthétiser un ADN_C à partir de l'ARN_m mature à l'aide de la réverse transcriptase. L'ADN_C généré est cloné chez un hôte procaryote (Knowles et al., 1983; Teeri et al., 1983). Dans d'autres cas, il est possible de réaliser le clonage chez un hôte eucaryote comme la levure et le champignon, qui ont la capacité de réaliser l'épissage de l'ARN_m (Montenecourt, 1983). Le sous-clonage de gènes d'*Aspergillus niger* chez une levure a permis d'exprimer à un faible niveau un seul gène. Ceci est expliqué par la différence évoquée au niveau du mécanisme d'épissage des introns de la levure. De plus, le système d'expression des gènes de levures et de champignons n'est pas le même ce qui implique un faible d'expression (Penttila et al., 1984).

Finalement, le clonage de gènes au moyen d'un plasmide à copies multiples peut faciliter la purification ultérieure du produit des gènes. Par exemple, lors du clonage du gène E₅ de *Thermomonospora fusca* chez *S. lividans*, la cellulase E₅ représentait 50% des protéines extra-cellulaires totales, alors qu'elle ne représentait que 5% des protéines du surnageant de la souche sauvage de *T. fusca* (Changas et Wilson, 1987).

2.2 Séquences

L'analyse des séquences en acides aminés de certaines cellulases a permis de constater quelque soit leur origine, elles ont une organisation structurale commune (Wood et Garcia-

Campayo, 1990).

2.3 Structure et fonction des cellulases

L'organisation structurale des cellulases comprend deux domaines; le domaine catalytique et le domaine de liaison à la cellulose. Les domaines peuvent être situés indifféremment à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine. Par exemple, chez *Trichoderma reesei* le domaine catalytique de l'endoglucanase I est situé au C-terminal, par contre, pour l'endoglucanase II, il est situé au N-terminal (Wood et Garcia-Campayo, 1990). Les deux domaines sont généralement reliés entre eux par une séquence riche en proline, sérine et thréonine dont le rôle n'est pas clairement établi.

Les deux domaines sont composés de résidus conservés chez les différentes cellulases permettant de les reconnaître dans une séquence de cellulase donnée.

2.3.1 Domaine catalytique

Le domaine catalytique comporte environ 300 à 500 acides aminés, dont certains sont conservés chez les cellulases. L'analyse des groupements hydrophobiques des séquences en acides aminés du domaine catalytique a permis de classer les cellulases et les xylanases de différents micro-organismes en 9 familles cataloguées de A à I (voir tableau II) (Gilkes et al., 1991; Henrissat et al., 1989).

TABLE II: Classification en familles des cellulases et des xylanases selon l'homologie du site catalytique (Gilkes et al., 1991).

Familie	Microorganisme	Enzyme	Type d'enzyme	Domaine catalytique	
				Position	Composition en acides aminés
A	<u>Bacillus</u> sp. souche N-4	CelA	Endoglucanases	N	305
	<u>Bacillus</u> sp. souche N-4	CelB		N	307
	<u>Bacillus</u> sp. souche N-4	CelC		N	350
	<u>Bacillus</u> lautus	CelB			
	<u>Bacillus</u> polymyxa	Egl			
	<u>Bacillus</u> subtilis	Egl			
	<u>Bacteroides</u> ruminicola	Egl		N	
	<u>Butyrivibrio</u> fibrisolvens A46	CelA			
	<u>Butyrivibrio</u> fibrisolvens H17c	End1		N	385
	<u>Caldocellum</u> saccharolyticum	CelB		C	388
	<u>Clostridium</u> acetobutylicum	Egl		N	300
	<u>Clostridium</u> cellulolyticum	CelA		N	380
	<u>Clostridium</u> thermocellum	CelB		N	>469
	<u>Clostridium</u> thermocellum	CelC			
	<u>Clostridium</u> thermocellum	CelE		N	340
	<u>Clostridium</u> thermocellum	CelH		C	305
	<u>Erwinia</u> chrysanthemi	CelZ		N	305
	<u>Fibrobacter</u> succinogenes	Egl3		C	416
	<u>Robillarda</u> sp. Y-20	Egl			
	<u>Ruminococcus</u> albus F-40	Egl1			
	<u>Ruminococcus</u> albus SY3	CelA			
	<u>Ruminococcus</u> albus SY3	CelB			
	<u>Trichoderma</u> reesei	EglIII		C	327
	<u>Xanthomonas</u> campestris	EngXCA		N	350

Tableau II: (suite)

B	<u>Cellulomonas fimi</u>	CenA	Endoglucanase	C	284
	<u>Microbispora bispora</u>	CelA	Endoglucanase	N	290
	<u>Streptomyces sp. souche KSM-9</u>	CasA	Endoglucanase		
	<u>Trichoderma reesei</u>	CbhII	Exoglucanase	C	385
C	<u>Humicola grisea</u>	CbhI	Exoglucanase		
	<u>Phanerochaete chrysosporium</u>	CbhI	Exoglucanase	N	425
	<u>Trichoderma reesei</u>	CbhI	Exoglucanase	N	425
	<u>Trichoderma reesei</u>	EgII	Endoglucanase	N	363
	<u>Trichoderma viride</u>	Cbh	Exoglucanase	N	435
D	<u>Bacillus circulans</u>	Bgc	Endoglucanases	N	384
	<u>Cellulomonas uda</u>	Egl			
	<u>Clostridium thermocellum</u>	CelA			
	<u>Erwinia chrysanthemi</u>	CelY			
E	<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>	CedI	Cellodextrinase		
	<u>Cellulomonas fimi</u>	CenB	Endoglucanase	N	607
	<u>Cellulomonas fimi</u>	CenC	Endoglucanase	interne	589
	<u>Clostridium thermocellum</u>	CelD	Endoglucanase	N	> 543
	<u>Clostridium stercorarium</u>	CelZ	Endoglucanase	N	474
	<u>Persea americana</u>	Egl	Endoglucanase		
	<u>Persea americana</u>	Cel1	Endoglucanase		
	<u>Persea americana</u>	Cel2	Endoglucanase		
	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	Egl	Endoglucanase		

Tableau II: (suite)

F	<u>Bacillus</u> sp. souche C-125	XynA	Xylanase		
	<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>	XynA	Xylanase	N	350
	<u>Caldocellum saccharolyticum</u>	CelB	Exoglucanase	N	347
	<u>Caldocellum saccharolyticum</u>	XynA	Xylanase		
	<u>Cellulomonas fimi</u>	Cex	Exoglucanase	N	315
	<u>Clostridium thermocellum</u>	XynZ	Xylanase	C	350
	<u>Cryptococcus albidus</u>	Xyn	Xylanase		
	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	XynA	Xylanase	C	345
	<u>Streptomyces lividans</u>	XynB	Xylanase	C	272
	<u>Thermoascus aurantiacus</u>	Xyn	Xylanase		
G	<u>Bacillus circulans</u>	Xyn			
	<u>Bacillus pumilus</u>	XynA			
	<u>Bacillus subtilis</u>	Xyn	Xylanases		
	<u>Clostridium acetobutylicum</u>	XynB			
H	<u>Aspergillus aculeatus</u>	FI-CMC _{...}	Endoglucanase		
	<u>Erwinia carotovora</u>	CelS	Endoglucanase		
I	<u>Ruminococcus flavefaciens</u>	CelA	Cellodextrinase		

Il est généralement admis que l'hydrolyse par les cellulases procède selon un mécanisme de rétention qui permet de conserver la conformation anomérique β par analogie avec celui du lysozyme (figure 4A) (Ichikawa et al., 1992). La liaison β -1,4 est attaquée par un proton fourni par le résidu Glu-35 conduisant au départ du groupement ROH. L'intermédiaire réactionnel est stabilisé par une charge négative fournie par le résidu Asp-52. Une molécule d'eau fournit un ion OH^- qui réagit avec l'ion carbonium et l'ion H^+ remplace le proton perdu par le résidu Glu-35.

Un mode d'action d'inversion a été proposé permettant l'inversion de la conformation anomérique β en une conformation α (Ichikawa et al., 1992). Ce type de mécanisme d'action est associé à l'endoglucanase, CelD, de *Clostridium thermocellum* (figure 4B). Contrairement au résidu Asp-52 du lysozyme, le résidu Asp-201 ne réagit pas avec l'intermédiaire réactionnel, mais réagit plutôt avec la molécule H_2O . Le résidu Asp-201 est donc protonné par l'ion H^+ , qui est fourni par la molécule d'eau. L'ion OH^- libéré réagit avec l'ion carbonium, généré suite à la libération du groupement OR'. Ce dernier réagit avec l'ion H^+ fourni, par le résidu Glu-555. Ainsi le résidu Glu-555 sert de donneur de proton tout comme le résidu Glu-35 chez le lysozyme.

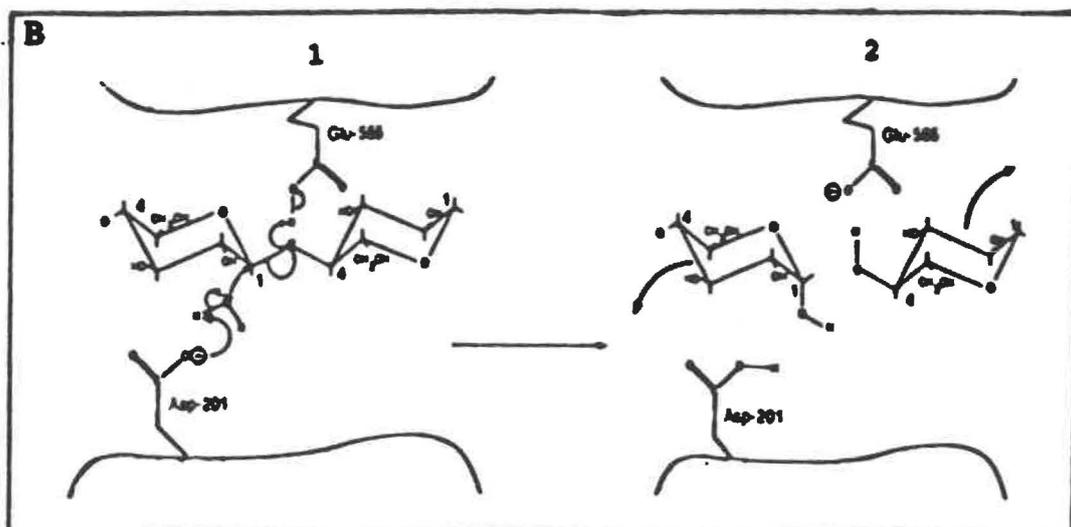
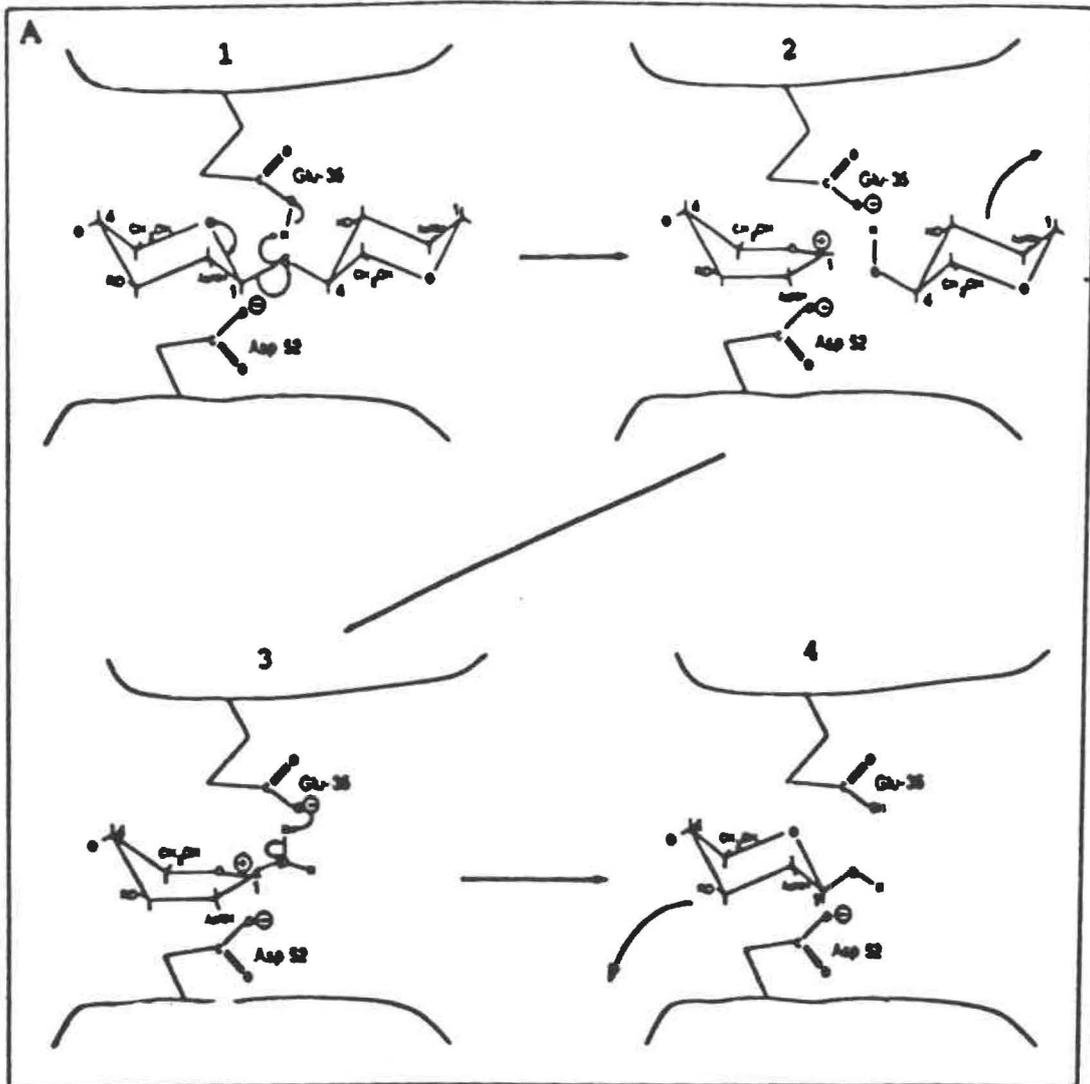
Figure 5: Mécanisme d'action
(Béguin et Aubert, 1992)

A) Mécanisme d'action du lysozyme

- 1) La liaison β -1,4 est attaquée par un proton fourni par le résidu Glu-35.
- 2) L'intermédiaire réactionnel est stabilisé par une charge négative fournie par le résidu Asp-52.
- 3) Une molécule d'eau fournit un ion OH^- qui réagit avec l'ion carbonium et l'ion H^+ remplace le proton perdu par le résidu Glu-35.
- 4) Le fragment portant le carbone anomérique est libéré.

B) Mécanisme d'action d'inversion de l'endoglucanase, CelD, de *Clostridium thermocellum*

- 1) Le résidu Asp-201 est protonné par l'ion H^+ fourni par la molécule d'eau. L'ion OH^- libéré réagit avec l'ion carbonium. Le groupement OR' réagit avec l'ion H^+ fourni par le résidu Glu-555.
- 2) Le fragment portant le carbone anomérique inversé est libéré.



La fonction catalytique d'une région ou d'un résidu est souvent confirmée par mutagenèse dirigée (Béguin, 1990). Le résidu Histidine 122 (His-122), de l'endoglucanase A de *Clostridium cellulolyticum*, agit comme donneur de proton et l'intermédiaire réactionnel est stabilisé par l'acide glutamique 170 (Glu-170). Le changement du résidu His-122 par un acide glutamique conduit à une diminution importante de l'activité cellulasique. Le résultat suggère que la présence de His-122 joue un rôle dans la catalyse (Belaich et al., 1992).

La modélisation moléculaire permet de mettre en évidence la différence entre une cellulase de type "exo" ou "endo". L'exoglucanase II de *Trichoderma reesei* ne peut hydrolyser la cellulose que par son extrémité non réductrice, parce que le site actif est peu accessible par sa forme en tunnel. Par contre, chez les endoglucanases bactériennes, le site actif n'est pas fermé. Il se présente sous la forme d'un fer à cheval pouvant ainsi accommoder la chaîne de cellulose et l'hydrolyser au hasard (Rouvinen et al., 1990).

2.3.2 Domaine de liaison à la cellulose

Le domaine de liaison à la cellulose (CBD) est composé de 30 à 130 acides aminés (Béguin et al., 1992). Au niveau structural, le CBD contient peu d'acides aminés ayant une fonction hydroxyle, mais il possède des acides aminés conservés tel que le tryptophane, l'asparagine et la glycine. De plus, deux cystéines sont situés aux deux extrémités du CBD.

Le CBD, dont le rôle est d'ancrer la protéine au substrat est indépendant du domaine catalytique. L'élimination du CBD par protéolyse n'affecte d'ailleurs pas l'activité catalytique de la cellulase (Béguin et Aubert, 1992).

Les domaines de liaison à la cellulose des cellulases Cex et CenA de *Cellulomonas fimi* et les cellulases EGI, EGIII, CBHI et CBHII de *Trichoderma reesei* ont été caractérisés (Béguin, 1990).

3.0 Streptomycètes

Les streptomycètes sont des bactéries filamenteuses du sol, gram (+), qui ont la capacité de synthétiser et de sécréter une grande variété d'enzymes extra-cellulaires. Parmi ces enzymes on retrouve les cellulases, les mannanases et les xylanases qui sont essentielles à la dégradation de la lignocellulose pré-traitée chimiquement ou physiquement (MacLeod et al., 1992). Il s'agit d'un groupe bactérien qui est couramment employé pour la production de protéines

hétérologues car il a l'avantage de posséder un système de sécrétion efficace (Changas et Wilson, 1987).

3.1 Cellulases

Le clonage homologue a été utilisé pour isoler des gènes codant pour certaines cellulases (Fernández-Abalos et al., 1992; Shareck et al., 1987).

Une des stratégies est d'obtenir une banque génomique à partir d'une digestion de l'ADN par un enzyme de restriction. Les fragments générés sont ligués à un vecteur. Par la suite, le clonage homologue se fait de préférence dans une souche mutante cellulase négative. Shareck et al. (1987) ont ainsi isolé 4 clones cellulases positifs de *S.lividans*. Les clones *S. lividans* IAF 74/8-83 et 82/8-83 ont un fragment d'ADN qui code pour la cellulase A, qui a été caractérisée et séquencée (Théberge et al., 1992). Les clones *S. lividans* 9/8-83 et 12/8-83 possèdent le gène codant pour la cellulase B, qui fait l'objet de cette recherche.

OBJECTIFS

À partir de recherches antérieures effectuées dans nos laboratoires, nous avons établi pour ce travail les objectifs suivants:

- Localiser par sous-clonage le gène *cel B* codant pour la cellulase B de *Streptomyces lividans* 66 chez *Escherichia coli*.
- Séquencer le gène *celB*.
- Comparer la séquence de la cellulase B avec les cellulases d'autres micro-organismes.
- Purifier la cellulase B.
- Déterminer la masse moléculaire et le point isoélectrique de l'enzyme.
- Déterminer les propriétés physico-chimiques (activité spécifique, les conditions optimales de l'activité cellulasique et les valeurs K_m et V_{max}).
- Analyser le mode d'action de l'enzyme envers des cellooligosaccharides de différents degrés de polymérisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 Produits

Acétone (J.T.Baker)
Acétate d'ammonium (Fisher)
Acétate de potassium (Fisher)
Acide borique (Bio-Rad)
Acide trichloroacétique (Sigma)
Agar (Difco)
Agarose (Bio-Rad)
Albumine sérique bovine Fraction V (Sigma)
Ampicilline (Sigma)
ARN_{ase} (Boeringher Manheim)
ATP (Pharmacia)
Bacto-tryptone (Difco)
Bicarbonate d'ammonium (Matheson Coleman & Bell)
Bromophénol bleu (Bio-Rad)
Bromure d'éthidium (Boeringher Manheim)
CaCl₂•2H₂O (BDH)
Cellooligosaccharide G₂ à G₆ (Merck)
Chloroforme (BDH)
Citrates de sodium (Fisher)
CMC (Sigma)
CoCl₂•6H₂O (BDH)
Déoxycholate de sodium (Matheson Coleman & Bell)
DNS (BDH)
EDTA•Na₂ (Fisher)
Éthylène glycol (BDH)
Extrait de boeuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
FeSO₄•7H₂O (J.T.Baker)
HCl (J.T.Baker)
IPTG (Boehringher Manheim)
Isopropanol (BDH)
Glucose (Sigma)
K₂HPO₄ (J.T.Baker)
KH₂PO₄ (J.T.Baker)
Lait écrémé (Difco)
Lysozyme (Sigma)
Maltose (Difco)
β-mercaptoéthanol (BDH)
Méthanol (BDH)
MgSO₄•7H₂O (Anachemia)
MnSO₄•H₂O (J.T.Baker)
NaCl (BDH)
NaH₂PO₄ (J.T.Baker)
Na₂HPO₄ (Sigma)
NaOH (J.T.Baker)
NZ amine A (Sheffield products)
Pipérazine (BDH)
Phénol (BDH)

Rouge congo (J.T.Baker)
SDS (Bio-Rad)
Sodium potassium tartrate (BDH)
Sucrose (BDH)
Sulphate d'ammonium (BDH)
T₄ ADN ligase (Pharmacia)
Thiostreptone (Squibb Ltée)
Tris (ICN)
Triton X-100 (BDH)
TSB (Difco)
Tween 80 (Aldrich)
X-gal (BRL)
D-xylose (Sigma)
ZnSO₄•7H₂O (J.T.Baker)

2.0 Souches bactériennes et vecteurs

2.1 *Streptomyces lividans*

Le gène de la cellulase B a été isolé à partir d'une banque génomique de *S. lividans* 66 (souche 1326). Le mutant 8-83 (*cel-* et *xln+*) servait alors de souche hôte pour l'expression du gène de la cellulase B. (Shareck et al., 1987). Une activité cellulasique se retrouve chez le clone 9/8-83 (*celB*).

2.2 *Escherichia coli*

Le sous-clonage de la cellulase B provenant du clone 9/8-83 est effectué avec la souche *E. coli* MC1061 (*hsdR araD139 Δ(araABC-leu)7679 Δ(lacX74) galU galK rpsL thi*).

La souche *E. coli* MV1190 (*Δ(lac-pro AB) thi, supE Δ(srl-recA)306::Tn10(tet^r) [F':traD36 proAB lacI^qZAM15]*) est utilisée pour la production d'ADN simple brin.

Les cellules compétentes des souches *E. coli* MC1061 et MV1190 sont préparées selon le protocole établi par Bio-Rad (catalogue #170-3571 p.21). Les cellules bactériennes sont traitées avec les cations divalents MgCl₂ et CaCl₂. Ces cations ont pour effet d'altérer la membrane cellulaire des bactéries favorisant la pénétration de l'ADN étranger. Après traitement, les cellules sont mélangées à une solution contenant 85 mM de CaCl₂ et 15% de glycérol. Le glycérol permet de préserver les cellules lors de la congélation à -80°C.

2.3 Vecteurs d'expression

Les phagemides PTZ18U et PTZ19U sont utilisés pour transformer les cellules compétentes de *E. coli*. Ils sont des dérivés de pBR322 contenant la région intergénique F1 permettant la production de l'ADN simple brin après une co-infection avec le phage auxiliaire M13K07 (Mead et al., 1986).

Les plasmides possèdent le promoteur du gène *lacZ* rendant possible l'expression des gènes insérés au niveau de la cassette de clonage multiple. Le gène codant pour la résistance à l'ampicilline permet de sélectionner les transformants.

3.0 Milieux de culture

3.1 *S. lividans*

3.1.1 Conservation des souches

Les souches de *S. lividans* sont conservées sur un milieu Bennett en tubes inclinés. Le milieu est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g de NZ amineA, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre. Dans certains cas, il faut ajouter, après stérilisation, 40 μ l d'une solution de 50 mg/ml de thiostreptone afin de conserver une pression sélective sur les clones portant le vecteur PIJ702. Les tubes inclinés sont inoculés avec des spores lyophilisées et sont incubés pendant 5 à 7 jours à 34°C. La durée de conservation des souches est de 6 mois.

3.1.2 Milieu pour la production d'inoculum

Un milieu TSB ("tryptic soy broth") sert à la préparation des précultures. Ce milieu riche est composé de 30 g de TSB par litre.

Un tube incliné d'une banque de culture sert à inoculer 25 ml de milieu TSB auquel il faut ajouter 25 μ l d'une solution de 5 mg/ml de thiostreptone. Les précultures sont incubées à 34°C pendant 24 h avec agitation (240 rpm).

3.1.3 Milieu pour la production de cellulase B

La production de cellulase B est réalisée en milieu M₁₃ modifié contenant 1% de xylose comme source de carbone.

Le milieu est composé de 1.4 g de (NH₄)₂SO₄, 5.5 g de K₂HPO₄, 1.0 g de KH₂PO₄, 2 ml de tween 80 et 1 ml d'une solution de sels minéraux (140 mg de ZnSO₄·7H₂O, 160 mg de MnSO₄·H₂O, 500 mg de FeSO₄·7H₂O et 200 mg de CoCl₂·6H₂O dissout dans 100 ml d'eau distillée (Mandels et Reese, 1957)) par litre d'eau distillée et le pH est ajusté à 7.4.

Le milieu est stérilisé dans des erlenmeyers de 2 litres contenant 400 ml de milieu. Avant inoculation, 4 ml de CaCl₂·2H₂O 3%, 2.4 ml de MgSO₄·7H₂O 5%, 16 ml de D-xylose 25% et 40 μ l d'une solution de 50 mg/ml de thiostreptone sont ajoutés stérilement au 400 ml de milieu de culture. Un inoculum de 5% provenant d'une préculture en TSB est ajouté au milieu suivi d'une incubation à 34°C pendant 55 h avec agitation (240 rpm).

3.1.4 Milieu pour l'isolement de plasmides

Le milieu TSB est employé selon les conditions décrites à la section 3.1.2.

3.2 *E. coli*

3.2.1 Milieu pour la détection de transformants

Un milieu LB ("Luria broth") est utilisé pour la croissance des transformants. Il est composé de 10 g de bacto-tryptone, 5 g de NaCl, 5 g d'extrait de levure, 14 g d'agar et 0.05% ORB-HEC par litre. Après stérilisation, il faut ajouter 4 ml d'une solution de 25 mg/ml d'ampicilline afin de sélectionner les transformants. Le milieu de culture est réparti stérilement dans des boîtes de pétri.

Avant l'inoculation des boîtes de pétri, 50 μ l de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) 2% et 20 μ l d'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) 100 mM sont ajoutés stérilement à la surface de la gélose. Les boîtes de pétri inoculés sont déposés dans un incubateur à 37°C durant 16 h.

Les phagemides PTZ18U et PTZ19U possèdent le gène *lacZ* précédé par une cassette de clonage multiple. Le gène *lacZ* code pour une β -galactosidase qui permet aux cellules transformées de dégrader le substrat chromogénique X-gal. L'hydrolyse du substrat confère aux colonies une couleur bleue. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré au niveau de la cassette de clonage multiple le gène *lacZ* est inactivé. Alors, les

colonies transformées conservent leur aspect blanchâtre.

L'IPTG est un inducteur gratuit de l'opéron lactose qui est requis lorsque la souche *E.coli* MV1190 (*lacI^q*) est utilisée.

3.2.2 Milieu pour la croissance bactérienne

Le milieu 2XTY est utilisé pour la croissance des cellules de *E. coli*. Il est constitué de 16 g de bactotryptone, 10 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl par litre. Après stérilisation, la concentration finale d'ampicilline est ajustée à 100 µg/ml. La croissance bactérienne se fait à 37°C pendant 16 h avec agitation (240 rpm) .

4.0 Isolement d'ADN plasmidique

4.1 *S. lividans*

4.1.1 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique à grande échelle est effectuée par lyse alcaline selon la méthode de Kieser avec quelques modifications (1984). Un culot de mycélium provenant d'une culture de 100 ml en TSB est resuspendu dans 10 ml de tampon de lyse (10 mg de lysozyme, 0.025 M d'EDTA•Na₂, 0.3 M sucrose, 0.025 M Tris-HCl et 0.05 ml d'ARN_{ase} (10 mg/ml) et le mélange est incubé à 37°C pendant 1h. Un volume de 10 ml d'une solution alcaline (10 M de NaOH et 10% de SDS) est ajouté au mélange qui est ensuite incubé à 70°C pendant 20 min. L'étape

d'extraction au phénol/chloroforme a été omise. Après avoir refroidi le mélange à la température de la pièce, 7.5 ml d'acétate de potassium 5 M sont ajoutés. Après 1 h d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 20 000 xg (Beckman J2-21, rotor JA-20) pendant 25 min. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité par addition d'un volume d'isopropanol. L'ADN est récupéré par une centrifugation à 15 000 xg (Beckman Biofuge 13) pendant 20 min. Le culot est resuspendu dans 1 ml d'une solution tampon Tris-EDTA•Na₂ 1X (TE) composé de 10 mM Tris-HCl (pH 8) et 1 mM EDTA•Na₂ (pH 8). L'ADN plasmidique est purifié par gradient de chlorure de césium (ClCs) (section 4.3).

4.2 *E. coli*

4.2.1 Extraction de l'ADN plasmidique

Un culot cellulaire provenant d'une culture de 500 ml est resuspendu dans 70 ml d'un tampon de lyse composé de 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 50 mM de EDTA•Na₂ et 15% sucrose. Successivement, 70 mg de lysozyme sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 min à température de la pièce. En agitant délicatement, 6 ml de SDS 10% et 6 ml d'acétate de potassium sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 30 min à 4°C. Le mélange est centrifugé 30 min à 16 000 xg (Sorvall RC-5B, rotor GSA). Après avoir récupéré le surnageant, 2 volumes d'éthanol 95% est ajoutés. Le mélange est incubé à 4°C pendant 20 min.

Le culot contenant l'ADN est récupéré par centrifugation. Il est resuspendu dans 10 ml de tampon TE 1X auquel on ajoute 1.23 g d'acétate d'ammonium. Après une incubation de 20 min à 4°C, la solution est centrifugée à 20 000 xg (Beckman J2-21, rotor JA-20) pendant 20 min. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité avec 2 volumes d'éthanol 95% et récupéré après une centrifugation de 20 min à 15 000 xg (Beckman Biofuge 13).

Finalement, le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon TE 1X et l'ADN plasmidique est purifié par gradient de ClCs (section 4.3)

4.2.2 Isolement d'ADN simple brin

Le protocole de préparation de l'ADN simple brin provient de la méthode modifiée de Kunkel (1985).

Le phage M13K07 est employé pour la production d'ADN simple brin. Il possède la particularité d'un phage auxiliaire car il produit deux protéines, protéine II et X, qui vont agir en *trans* au niveau de la région intergénique f1 du phagemide initiant ainsi la réplication de l'ADN plasmidique en ADN simple brin (Vieira et Messing, 1987). Les cellules d'*E. coli* MV1190 contenant le phagemide recombinant produisent des pili sexuels qui sont nécessaires pour l'infection avec le phage.

4.3 Purification de l'ADN plasmidique au Chlorure de césium

La purification de l'ADN se fait sur gradient de ClCs (Maniatis et al., 1982) dans une ultracentrifugeuse (Beckman TL-100, rotor TLN-100) à 450 000 xg à 20°C pendant 3 h.

4.4 Analyse de l'ADN plasmidique

L'ADN est digéré avec une unité d'enzyme de restriction (Pharmacia) par μg d'ADN avec une concentration de tampon appropriée ("one phor all buffer" 10X, Pharmacia) dans un volume total de 20 μl . L'incubation se fait à 37°C pendant 1 h.

Une électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% contenant du bromure d'éthidium 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.7% d'agarose dissout dans du TBE 1X (10.8 g Tris, 0.4 ml EDTA \cdot Na₂ 0.5 M (pH 8) et 5.5 g d'acide borique par litre) permet de séparer les fragments d'ADN en appliquant un voltage de 5 volts par cm de gel pendant 16 h. Un standard d'ADN de taille connue permet d'estimer la taille des fragments.

4.5 Hybridation moléculaire

L'échantillon d'ADN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%. Avant de procéder au transfert, il faut dénaturer l'ADN selon le protocole de Maniatis et al. (1982). L'ADN est transféré sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schull BA85) à l'aide de l'appareil de transfert

VacuBlot modèle Vac-100 (AmerBionetics). Le tampon de transfert utilisé est du SSC 10X (87.6 g de NaCl et 44.1 g de citrate de sodium ; ajuster à pH à 7.0). La membrane est séchée sous vide à 80°C pendant 2h.

La préhybridation et l'hybridation de la membrane sont réalisées selon le protocole de Benton et Davies (1977) en utilisant du tampon SSC 3X. L'hybridation moléculaire est faite à l'aide d'une sonde radioactive marquée au ^{32}P qui est préparée selon la méthode "nick translation" telle que recommandée par la compagnie BRL. L'hybridation se fait à 70°C pendant 16 h.

La membrane est exposée sur un film Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak) à -70°C pendant 24 h.

5.0 Clonage du gène *celB* chez *E. coli*

Les vecteurs PTZ18U et PTZ19U sont digérés avec une endonucléase de restriction selon les conditions décrites à la section 4.4. Les vecteurs sont déphosphorylés en employant 0.1 unité de phosphatase alcaline de *E. coli* d'une concentration stock de 198 U/ml (Pharmacia) et le traitement est fait selon les recommandations du fournisseur. La phosphatase est éliminée par une extraction au phénol/chloroforme. L'ADN est précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol 95% et 0.1 volume d'acétate d'ammonium 3 M.

Le plasmide pIAF9 portant le gène d'intérêt, *celB*, est également digéré. Après séparation sur gel d'agarose 0.7 %, le fragment d'intérêt est récupéré à l'aide du "Band prep kit" selon le protocole de Pharmacia.

Le fragment d'ADN élué est ligué aux vecteurs préalablement préparés. Le mélange de ligation contient 30 ng d'insert, 10 ng de vecteur (PTZ18U ou PTZ19U), 2 μ l ATP 10 mM et 0.2 unités T₄ ADN ligase. L'ATP et la T₄ ADN ligase sont nécessaires pour générer la formation des liens phosphodiesters entre l'extrémité 5'-PO₄ d'un brin et l'extrémité 3'OH de l'autre brin. L'incubation se fait à 14°C pendant 16h dans un volume total de 10 μ l.

La transformation des cellules compétentes *E. coli* MC1061 et MV1190 est effectuée selon la méthode de Hanahan (1983) en utilisant le mélange de ligation.

6.0 Séquençage du gène *celB*

Le séquençage de l'ADN est effectué par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier selon la méthode de terminaison des chaînes par les didéoxynucléotides (Sanger et al., 1977). L'ADN simple brin est utilisé comme matrice et différentes amorces ont été synthétisées à l'aide du "Gene Assembler" (Pharmacia).

7.0 Dosage et analyse enzymatiques

7.1 Dosage des sucres réducteurs

La méthode modifiée contenant de l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller et al., 1960) permet le dosage quantitatif des sucres réducteurs générés par l'hydrolyse enzymatique de la carboxyméthylcellulose (CMC).

Un échantillon d'enzyme (dilué de façon appropriée) est incubé dans un volume réactionnel de 2 ml contenant 0.25% de CMC faible viscosité et 0.07 M de tampon McIlvaine (pH 6.5). Le mélange est incubé avec agitation pendant 10 min à 50°C. Afin d'arrêter la réaction, on ajoute 2 ml d'une solution de DNS (10 g NaOH, 10 g de DNS, 5 g phénol et 200 g de sodium potassium tartrate par litre d'eau distillée). Le mélange est bouilli 15 min et les tubes sont plongés dans un bain d'eau froide. Les témoins ont été préparés de la même façon que les échantillons cependant la solution de DNS a été ajoutée avant de mettre l'enzyme. Le glucose est utilisé comme standard. La mesure de la densité optique est effectuée à 575 nm au spectrophotomètre.

7.2 Dosage des protéines

La méthode de Lowry et al. (1951) permet de faire le dosage des protéines en utilisant de l'albumine sérique de bovin comme standard.

7.3 Définition des unités

L'activité cellulasique est exprimée en unité internationale (U.I.). Une unité est équivalente à 1 μ mole de sucres réducteurs libérés par min.

L'activité spécifique de la cellulase est exprimée en U.I./mg de protéines.

7.4 Analyse qualitatif de l'activité cellulasique

Le test qualitatif de l'activité cellulasique est réalisé sur un milieu solide LB (section 3.2.1) contenant 0.1% de CMC. Des puits sont creusés dans la gélose solide et un échantillon de 20 μ l y est déposé. Après une incubation à 37°C pendant 16 h, la gélose est colorée avec une solution de 1 mg/ml de rouge congo pendant 20 min et lavé avec une solution de NaCl 5M. Le colorant a la propriété de se lier aux liens β -1,4 de la CMC. Une zone claire sur fond rouge apparaît lorsque les liens β -1,4 sont hydrolysés par la cellulase (Teather et Wood, 1982).

7.5 Analyse enzymatique par zymogramme

Un échantillon de protéines provenant d'un surnageant de culture est chargé sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) contenant 0.1% d'ORB-HEC. Le gel et les tampons sont préparés selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel de séparation contient 12.5% d'acrylamide. L'électrophorèse dure 16 h à 50 volts.

Après migration, les protéines sont renaturées en lavant le gel dans une solution A (10 mM de Tris (pH 7.5) et 20% de méthanol) pendant 30 min (2 fois) et avec une solution B (50 mM de Tris (pH 7.5) et 1 mM d'EDTA·Na₂) pendant 16 h à 4°C. Finalement, les bandes protéiques ayant une activité cellulasique sont révélées suite à une incubation du gel dans du tampon citrate 0.1 M (pH 6.5) pendant 16 h à 37°C.

8.0 Purification de la cellulase B

8.1 Récupération du surnageant

Le surnageant d'une culture de 5 litres est séparé du mycélium par centrifugation à 17 700 xg (Beckman J2-21, rotor JA-10) pendant 45 min à 4°C.

8.2 Chromatographie en phase liquide

8.2.1 Colonne échangeuse d'anions

La colonne échangeuse d'anions permet de faire une pré-purification. Elle est composée d'un gel échangeur d'anions, DEAE-Sepharose (Pharmacia), qui sépare les protéines selon leur charge. La taille de la colonne est de 5 cm × 12 cm ce qui équivaut à un volume de gel de 250 ml. Le surnageant est passé sur la colonne à un débit de 5 ml/min. La colonne est lavée avec du tampon pipérazine 20 mM (pH 6) pour éliminer les protéines fixées de façon non spécifique. L'élution est effectuée avec un gradient discontinu de 0.1 M à 0.5 M NaCl à

un débit de 5 ml/min. Les fractions sont récoltées à la sortie du détecteur. Les fractions actives sont combinées.

8.2.2 Colonne à interaction hydrophobique

La colonne hydrophobique, Phényl-Sépharose CL-4B (Pharmacia), permet de désaler l'échantillon et de séparer les protéines selon leur hydrophobicité.

La concentration de sulfate d'ammonium dans l'échantillon est ajustée à 1M. On ajuste également le pH à 6. Le sulfate d'ammonium permet d'augmenter l'effet de l'hydrophobicité des protéines sur la colonne. La taille de la colonne est de 5 cm x 10 cm ce qui équivaut à un volume de gel de 200ml. L'échantillon est adsorbé à un débit de 1 ml/min. La colonne est lavée avec du tampon pipérazine 20 mM contenant 1M de sulfate d'ammonium ajusté à pH 6.

L'élution des protéines est réalisée en appliquant un gradient de 1M à 0M de sulfate d'ammonium à un débit de 1 ml/min. Finalement, afin d'éluer les protéines les plus hydrophobes, on fait passer un gradient discontinu de 20% à 60% d'éthylène glycol. Les fractions actives sont combinées.

8.2.3 Équipement pour la chromatographie en phase liquide

- Colonne modèle K 50/30 (Pharmacia).
- Pompe péristaltique modèle pump P-3 (Pharmacia)
- Moniteur modèle UV M (Pharmacia)
- Enregistreur de données modèle REC-481 (Pharmacia)
- Collecteur de fractions modèle 328 (ISCO)

8.3 HPLC: colonne échangeuse d'anions

La colonne semi-préparative MONO Q HR 10/10 (Pharmacia) est composée d'un gel à base de résine hydrophile qui est chargé positivement par la présence de groupements diméthyl-aminoéthyl $((-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3)_3)$. Les protéines chargées négativement s'accrochent plus ou moins fortement à la résine.

Le système de chromatographie liquide à haute performance (Waters 625 LC System, Millipore) est muni de 2 pompes, d'un injecteur manuel, d'un détecteur d'absorbance UV (modèle 484) ajusté à 280 nm et d'un intégrateur de données (Data module, modèle 740).

La fraction active provenant de l'étape précédente est diluée avec du tampon pipérazine 20 mM et l'échantillon est filtré à l'aide d'une seringue munie d'un filtre Nylon Acrodisc 0.2 μm (Millipore).

L'échantillon est adsorbé sur la colonne qui a été pré-équilibrée avec du tampon pipérazine 20 mM (pH 6.5). Le lavage de la colonne est effectué avec du tampon pipérazine 20 mM (pH 6.5). L'élution des protéines est faite en appliquant un gradient linéaire de 0 à 0.4 M de NaCl en 180 min.

La chromatographie est effectuée à un débit de 3 ml/min sous une pression de 350 psi et les fractions sont récupérées à l'aide d'un collecteur de fractions (Retriever II, Isco Inc.). Les fractions actives sont combinées et lyophilisées.

Afin de passer à l'étape suivante, il faut désaler l'échantillon. Une colonne Econo-Pac 10 DG (Bio-Rad) qui fonctionne sur le principe du tamis moléculaire est utilisée. L'échantillon désalé est lyophilisé (voir section 8.7).

8.4 Tamis moléculaire

La purification est complétée en employant un tamis moléculaire "protein pak 300 sw" (Waters) qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Il s'agit de deux colonnes en série d'une taille de 7.5 mm × 30 cm. Elles sont constituées d'un gel à base de silice séparant les protéines de poids moléculaire entre 10 000 et 400 000 Daltons.

Le système de chromatographie (Waters, Millipore) utilisé, est composé de 2 pompes (modèle 510), d'un injecteur manuel (Rheodyne, modèle 7161), d'un détecteur d'absorbance UV (modèle 441) ajusté à 280 nm et d'un intégrateur de données (Shimadzu, modèle C-R4A).

Avant utilisation, les colonnes sont équilibrées avec 10 mM de bicarbonate d'ammonium pH 8. L'échantillon filtré est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton de 1000 μ l. Le tampon d'élution contient 10 mM de bicarbonate d'ammonium pH 8 et le débit de la colonne est de 0.5 ml/min sous une pression de 100 psi. Les fractions actives sont combinées.

8.5 Analyse sur SDS-PAGE de la pureté de la préparation enzymatique

La pureté de l'échantillon protéique est évaluée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant (PhastGel 12.5%, Pharmacia) et la migration se fait jusqu'à un temps de séparation de 70 Vh.

Un échantillon protéique de 10 μ l est additionné à 5 μ l de tampon d'électrophorèse 1X (10 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EDTA \cdot Na₂ (pH8) , 2.5% SDS, 5% β -mercaptoéthanol et 0.01% de bromophénol bleu) et le mélange est bouilli pendant 10 min. Seulement 4 μ l de cet échantillon est appliqué sur le gel de polyacrylamide.

Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent (manuel d'utilisation PhastSystem Fiche no.210, Pharmacia).

8.6 Conservation de l'enzyme purifiée

Les fractions actives combinées sont congelées dans la glace sèche. La lyophilisation se fait à l'aide d'un appareil Virtis (modèle 10-147 MR-Ba). La cellulase pure lyophilisée est conservée à -80°C.

9.0 Caractéristiques biochimiques de la cellulase B

9.1 Masse moléculaire et point isoélectrique

La masse moléculaire de la cellulase est évaluée à partir de standards de masse moléculaire connue ("Electrophoresis calibration kit", "low molecular weight", Pharmacia). Le logarithme de la masse moléculaire en fonction du R_f (distance de migration de la protéine/distance totale) permet de déterminer la masse moléculaire de la cellulase B. Les conditions de dénaturation, de migration et de coloration sont les mêmes qu'indiquées à la section 8.5.

La détermination du point isoélectrique (p.I.) de la protéine est réalisée en utilisant un gel de polyacrylamide contenant des ampholites formant un gradient de pH 3 à 9 (PhastGel IEF 3-9, Pharmacia). La protéine migre selon sa charge jusqu'à ce qu'elle atteigne le pH qui correspond à son point isoélectrique.

Une pré-électrophorèse jusqu'à 75 Vh permet de former un gradient de pH avec les ampholites. Un échantillon protéique de 4 μ l est appliqué sur le gel et après une migration de 570 Vh, le gel est coloré au nitrate d'argent (manuel d'utilisation PhastSystem fiche no. 210).

Le p.I. de la protéine est déterminé par une régression linéaire du pH en fonction de la distance de migration du standard de pH ("Isoelectric focusing calibration kit" pH 3-9, Pharmacia).

9.2 pH et température optimums

La détermination de ces deux paramètres est effectuée à l'aide du dosage des sucres réducteurs tel qu'indiqué à la section 7.1.

L'activité cellulasique est mesurée en fonction du pH en faisant varier le pH du tampon d'incubation McIlvaine de 5 à 7.5. L'activité en fonction de la température de 50°C à 70°C est évaluée à pH optimum.

9.3 Temps d'incubation optimal

L'activité cellulasique est mesurée en fonction du temps d'incubation sur une période de 40 min dans les conditions optimales de température et de pH préalablement définies (section 9.2).

Une courbe d'activité cellulasique en fonction du temps d'incubation permet de déterminer la linéarité de la réaction enzymatique.

9.4 Cinétique enzymatique (K_m et V_{max})

Le K_m est défini comme étant la concentration du substrat à laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié du V_{max} et, le V_{max} correspond à la vitesse maximale de réaction lorsque l'enzyme est saturée en substrat. Les valeurs du K_m et du V_{max} sont évaluées en traçant le graphique de Lineweaver et Burk considérant l'inverse de l'activité en fonction de l'inverse de

la concentration du substrat (Lehninger, 1984).

L'activité enzymatique est évaluée par dosage des sucres réducteurs (voir section 7.1) dans les conditions optimum de pH et de température et de temps d'incubation en variant la concentration du substrat de 0,4 à 15 mg/ml de CMC (faible viscosité).

9.5 Mode d'action

L'étude de l'hydrolyse des cellooligosaccharides de différents degrés de polymérisation par la cellulase est utile afin de connaître son mode d'action. Une colonne fonctionnant sous la combinaison des principes d'exclusion moléculaire et d'échange ionique est utilisée afin d'analyser les produits d'hydrolyse libérés. La colonne Aminex HPX-42A (Bio-Rad) est composée d'une matrice de styrène divinylbenzène possédant une charge cationique qui est conférée par la présence d'ions Ag^{++} .

Le système HPLC Waters (Millipore) utilisé est muni de 2 pompes (modèle 510), d'un injecteur manuel, d'un réfractomètre différentiel (modèle 410), d'un intégrateur de données (Shimadzu, modèle C-R4A) et d'un module de contrôle de température.

Les cellooligosaccharides, du cellotriase (G3) jusqu'au cellohexaose (G6), sont dissouts à raison de 2.5 mM dans du tampon McIlvaine 0.1 M à pH 6.5 et 0.1 unité d'enzyme pure est ajoutée. Les échantillons sont incubés pendant 5, 10, 15, 20

min et 3 h à 50°C. La réaction enzymatique est arrêtée en bouillant les échantillons pendant 10 min. Les échantillons sont filtrés à l'aide d'un filtre 0,45 μm et un volume de 10 μl est injecté dans la colonne. La phase mobile est constituée d'eau à 80°C. Le débit est de 0,5 ml/min. L'identification des produits d'hydrolyse apparaissant sur le chromatogramme est faite à partir du temps de rétention des standards.

9.6 Séquençage du N-terminal

Un échantillon de protéine purifiée est chargé sur SDS-PAGE 12.5% d'une épaisseur de 0.75 mm préparé selon le protocole de Laemmli (1970). L'électrophorèse dure 16 h à 50 volts.

Les conditions de transfert et de coloration des protéines se font selon le protocole de Matsudaira (1987). Le transfert des protéines est réalisé à 250 mA pendant 15 min à l'aide de l'appareil NovaBlot (Pharmacia).

Le service de séquençage de l'Institut de Recherche en Biotechnologie a réalisé la séquence N-terminale de la cellulase B à partir de l'échantillon protéique récupéré sur la membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF).

10.0 Immuno-détection de la cellulase B ("Western Blot")

10.1 Production d'anticorps

Les anticorps anti-cellulase B sont préparés en immunisant 2 lapines de Nouvelle-Zélande de 6 mois. L'immunisation des lapines est faite par l'injection de 50 μ g de protéine purifiée préalablement mélangée à l'adjuvant complet de Freund. Trois injections additionnelles de 100 μ g de protéine purifiée dissout dans l'adjuvant incomplet de Freund sont réalisées à intervalles de 1, 3 et 7 semaines.

10.2 Immuno-détection

Les protéines des surnageants de culture sont précipitées avec 0.4 Volume d'une solution contenant 50 % d'acide trichloroacétique (TCA) et 0.2 % de déoxycholate de sodium. Le mélange est incubé sur glace pendant 30 min et les protéines sont récupérées par centrifugation de 10 min à 15 000 xg. Le culot est lavé avec 250 μ l de TCA 10% et suivi d'un rinçage avec 500 μ l d'acétone. Le culot est séché et resuspendu dans du tampon d'électrophorèse (Laemmli, 1970).

Après électrophorèse sur SDS-PAGE 12.5 % (Laemmli, 1970), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell BA85) avec l'appareil "Trans-Blot SD Semi-Dry Transfert Cell" (Bio-Rad) selon la méthode de Towbin et al. (1979). Le transfert est réalisé en appliquant un voltage de 20 volts pendant 45 min.

La membrane est séchée sous vide durant 1 h. Ensuite, elle est immergée pendant 30 min dans du tampon PBS (pH 7.2) contenant 3% de lait écrémé (PBS: 0.45 g NaH_2PO_4 , 1.8 g Na_2HPO_4 , 8.5 g NaCl , 0.05 g $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$).

Les anticorps anti-cellulase B (200 μl) sont ajoutés à la solution et la membrane est incubée durant 16 h. La membrane est lavée avec une solution de PBS-0.5% Triton X-100 (3 fois, 10 min) et ensuite, avec du PBS (1 fois, 10 min). La membrane est saturée de nouveau avec du PBS contenant 3% de lait écrémé durant 10 min. La protéine A marquée à l'iode radioactif (^{125}I , Amersham) d'une activité spécifique de 30 mCi/mg est ajoutée à raison de 4 μl (0.4 μCi) pour un volume de 30 ml de PBS. Une incubation de 1 h est suffisante pour que la protéine A se fixe aux anticorps. La membrane est lavée dans les mêmes conditions qu'indiquées précédemment.

La membrane est séchée, puis exposée sur un film Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak) à -70°C pendant au moins 24 h.

RÉSULTATS

1.0 Clonage du gène *celB*

Le plasmide pIAF9 possède un insert de 2.8 kb qui contient le gène codant pour la cellulase B (figure 6a). La digestion du plasmide avec l'enzyme de restriction BclI permet de générer 5 fragments (figure 6b). La ligation des fragments BclI de 2.1 Kb et de 2.4 Kb avec le phagemide pTZ19U préalablement linéarisé par digestion BamHI a permis d'isoler des transformants lors du sous-clonage chez *E. coli* MC1061. Après repiquage de 200 transformants sur le milieu de détection ORB-HEC, seulement une colonie productrice de cellulase a été obtenue.

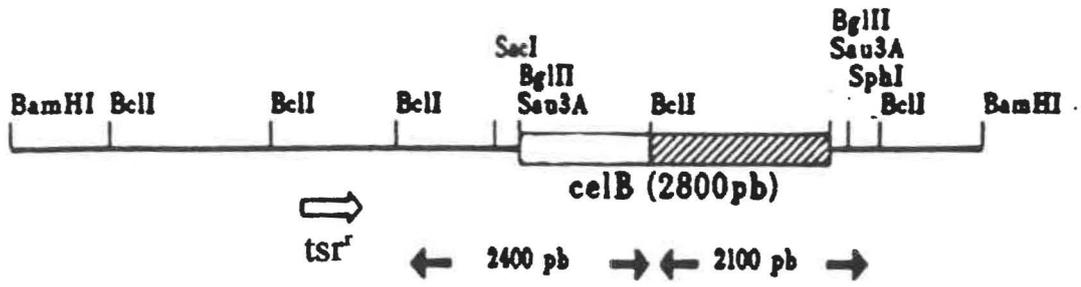
Le plasmide pMC1 du clone positif et le plasmide pMC6 d'un clone négatif ont été isolés. La cartographie respective des plasmides pMC1 et pMC6 (figure 7A et 7B) a été réalisée suite à la digestion de l'ADN avec différentes enzymes de restriction. Le plasmide pMC1 contient un fragment de 1.3 Kb suite à une digestion EcoRI + XbaI ce qui nous a permis de constater que le clone avait subi une délétion.

Figure 6: Structure moléculaire du plasmide pIAF9

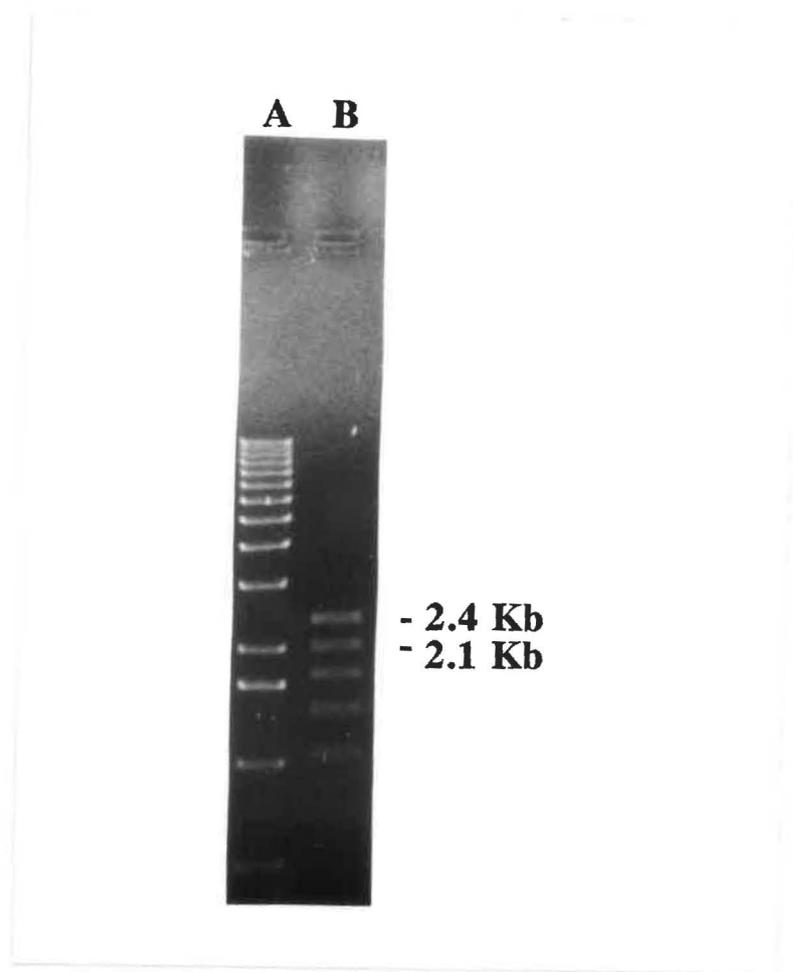
- a) Cartographie du plasmide pIAF9
- b) Migration en gel d'agarose
 - A: Échelle moléculaire
 - B: Digestion du plasmide pIAF9 avec l'enzyme BclI

a

pIAF9 (8600 pb)



b



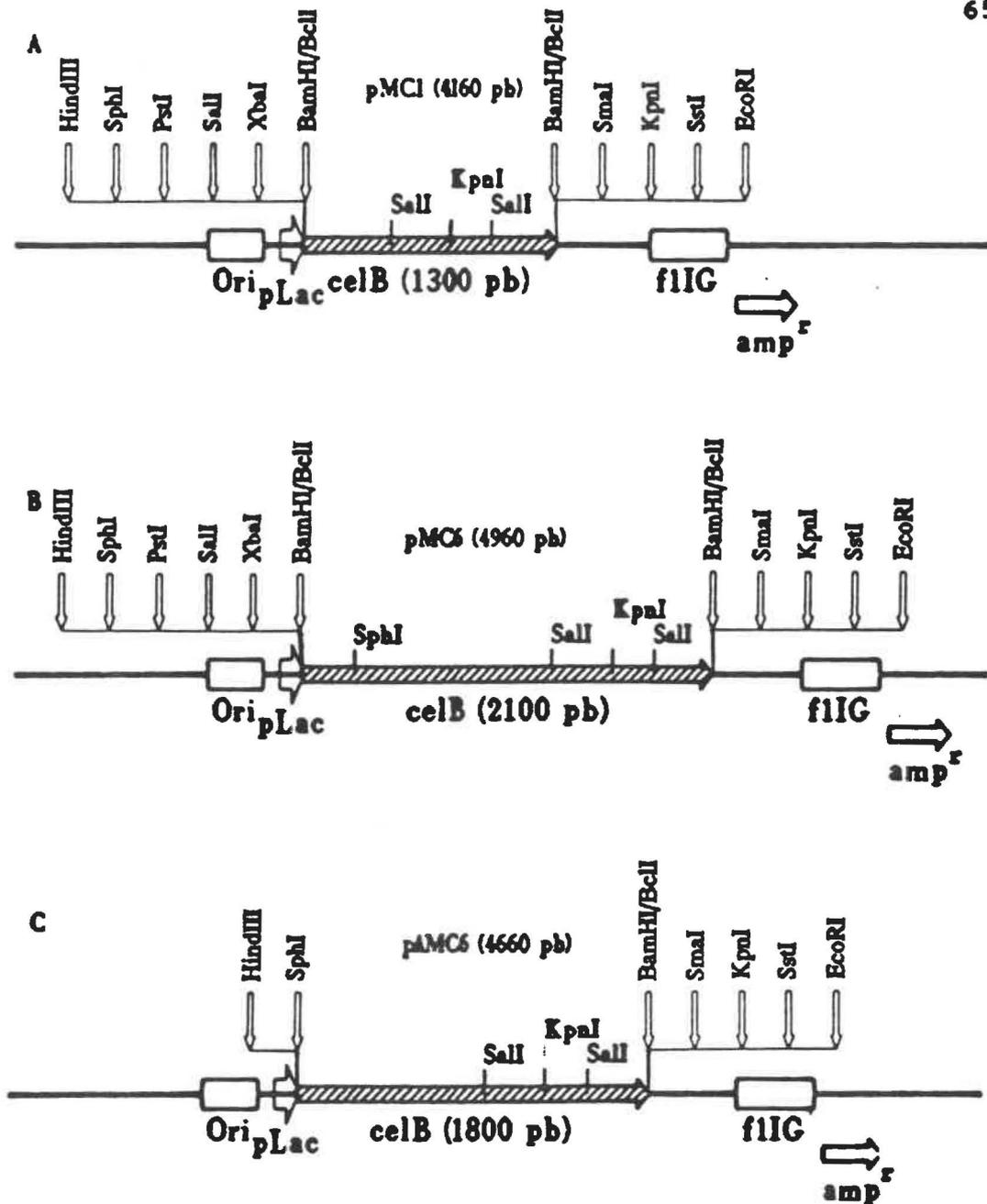


Figure 7: Cartographie des plasmides

- A) pMC1
 B) pMC6
 C) pΔMC6

échelle:

350 pb



Cette observation a été confirmée par hybridation moléculaire du fragment BclI de 2.1 Kb avec une sonde marquée au ^{32}P préparée à partir du plasmide pMC1 (figure 8). Il s'agit d'une délétion de 0.8 Kb. Cette expérience suggère que le gène codant pour la cellulase B est situé dans le fragment de 2.1 Kb et non pas dans le fragment de 2.4 Kb.

L'élimination sur l'ADN plasmidique du fragment SphI de 0.3 Kb, nous a permis de rapprocher le promoteur lacZ au gène de structure créant un clone cellulase⁺ (ΔCelB) (figure 7C).

En résumé, les clones MC1 et ΔCelB produisent une zone d'hydrolyse sur le milieu LB + ORB-HEC démontrant la présence d'une activité cellulasique, contrairement au clone MC6 qui n'en produit pas.

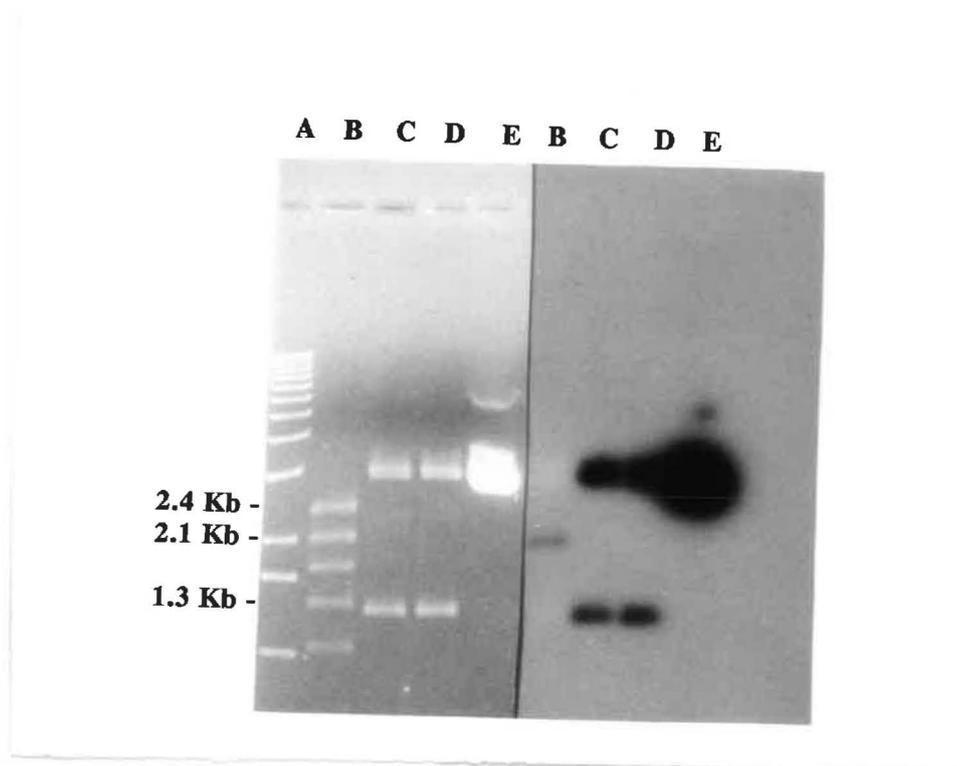


Figure 8: Hybridation moléculaire

À gauche: Migration sur gel d'agarose

À droite: Hybridation moléculaire avec une sonde préparée à partir du plasmide pMC1

- A: Échelle moléculaire
 B: Digestion du plasmide pIAF9 avec l'enzyme BclI
 C et D: Digestion du plasmide pMC1 avec les enzymes EcoRI+XbaI
 E: Digestion du phagemide pTZ19U avec l'enzyme EcoRI

2.0 Séquence du gène *celB*

Le séquençage du gène a été réalisé à partir du clone Δ CelB en utilisant différentes amorces afin de séquencer le gène dans les 2 orientations.

La séquence nucléotidique du gène *celB* est présentée à la figure 9.

La séquence du N-terminal de la cellulase B a été déterminée (DTTICEPFGTTTIQGRYVVQNN) et a permis de localiser dans la séquence nucléotidique le début du gène de structure. Le cadre de lecture commence au nucléotide (nt) 295 jusqu'au nt 1317 et cette séquence code pour une protéine de 35 kDa.

La région promotrice présumptive a été identifiée suite à la comparaison de la séquence avec des promoteurs de *Streptomyces* (Strohl, 1992). Les régions -35 (TTGTCA) et -10 (TACAGT) sont séparées par 17 nt. En amont du gène, on retrouve 2 séquences inverses répétées de 12 nucléotides. Le site de fixation des ribosomes GGAG est séparé par 8 nt du codon d'initiation (ATG). Étant donné qu'il s'agit d'une protéine sécrétée, on observe la présence d'un peptide signal de 40 acides aminés (aa). Il est caractérisé par la présence de résidus hydrophiles, d'une région hydrophobique et d'une proline située juste avant le site de clivage (AQA). Le site de clivage est reconnu par une signal peptidase conduisant à la libération extra-cellulaire de la protéine mature (figure 10).

La composition en guanine et cytosine (G + C) des codons de la région codante de la protéine est de 70%. La troisième position des codons est occupée à 94% par une guanine ou une cytosine.

L'étude de la séquence a révélé la présence de deux codons rares (TTA). Ils sont séparés l'un de l'autre de 51 nt et sont situés en amont du gène de structure dans la portion du peptide signal.

nt #	-35	a.a #
1	ACCTGCGGGCTTCGAGATTCGTTTCGACAACTCTGCCGCGCACAGTCTTGTCAAGAACATGAACC	
	-10	
64	GCTTCTACAGTCCCATCAACCGGTAAGTGGGAGCGCTCCCATCAGTGGGGAGTTGGGAGCGCT	
127	CCCGCACCGGCCCCCTCCCTCCCCCACACCTCCCGGAGAGGCCCCCATGCGAACGTTACGG	
190	CCCCAGGCCCGCGCCCCGCGGGCCTCTTGGCGGCCCTGGGCGCGGTCTTAGCGGCCTTCGCC	5
253	CTCGTGTCTCCCTGGTACAGCCGCGCGCCCGCCAGGCGGACACCACGATCTGCGAACCC	26
316	TTCGGAACGACGACGATCCAGGGCAGGTACGTCTCCAGAACAACCGCTGGGGCTCCACCGCC	47
379	CCCCAGTGGTACCGGCCACCGACACCGGCTTCCGGGTACGACAGGCCGACGGCTCGGCACCG	68
442	ACCAACGGGGCGCGAAGTCGTACCCGTCGGTCTTCAAACGGGTGCCACTACAGAACTGTCA	89
505	CCGGGCACGGACCTCCCGTCCGGCTCGACACCGTCTCCGCGGCGCGTCCAGCATCTCGTAC	110
568	GGCTTCGTTCGACGGGCGCGTCTACAAACCGCTCGTACGACATATGGCTGGACCCGACGGCCCGC	131
631	ACCGACGGGGTGAACAGACCGGATCATGATCTGGTTCAAACAGGGTGGGTCCGATCCAGCCC	152
694	ATCGGCTCACCGGTGGGACCGCCTCCGTCGGCGGCGGACCTGGGAGGTGTGGAGCGCGGG	173
757	AACGGCTCGAACGACCTCATGTCGTTCTGGTGGCACCGTCCGGGATCAGCGGCTGGAGCTTCGAC	194
820	GTCATGGACTTCGTCCGGGCGACCGTCCGGCGCGGACTCGCCGAGAACGACTGGTACCTGACG	215
883	AGCGTTCAGGCGGGTTCGAGCCGTGGCAGAACGGCGCGGACTGGCCGTGAATCCTCTCTCC	236
946	TCCACCGTTCGAGACCGCACCCCGGCGGCACCGACCCCGGCGACCCGGGGCGCGCGCTCCGCG	257
	S T V E T E T P G G T D P G D P G G P S A	278
1009	TGTGCGGTGTCTGACCGCACGAACGTCTGGCAGGACCGCTTCACCGCGGACGTCACCGTCACC	299
1072	AACACGGGCACGGCTCCCGTCGACGGCTGGCAACTCGCCTTCACCCCTGCCCTCCGGCCAGCGG	320
1135	ATCACCAACGCGCTGGACCGGTCCTGACCGCCTCCTCGGGCTCCGTCAACGGCAACCGGGCGG	341
1198	AGCCACAACGCCCGGATCGCACGGGGCGGACCGCTGTGTTCCGGCTCCAGGGCACCTACGGC	362
	S H N A R I A P G G S L S F G F Q G T Y G	
1261	GGCGCGTTCGCGGACCGGACCGGCTTCCGCCTGAACGGCACCGCCTGC ACCACGGTGTA	381
	G A F A E P T G F R L N G T A S T T V *	

Figure 9: Séquence nucléotidique et protéique du gène *celB* de *S.lividans*. Les séquences inverses répétées de 12 nt sont indiquées par les flèches. Le site de fixation du ribosome est en caractères gras et souligné. La séquence N-terminale de la protéine sécrétée est soulignée. Le domaine de liaison à la cellulose est encadré. Nucléotides (nt), acide aminé (aa).

2.1 Homologie de séquence avec d'autres cellulases

Des similarités de séquence en acides aminés de la cellulase B avec d'autres cellulases ont été observées dans la région N-terminale et dans la région C-terminale de la protéine.

Une homologie de séquence avec la cellulase du champignon *Aspergillus aculeatus* (FI-CMC_{ase}) (Ooi et al., 1990) a été retrouvée dans la région N-terminale (figure 11) et correspond au domaine catalytique de la protéine. Ce dernier est lié au domaine de liaison à la cellulose par une séquence riche en proline (P) et thréonine (T) (figure 11). En tenant compte de l'homologie du site catalytique, la cellulase B de *S. lividans* appartient aux glucanases de la famille H (Gilkes et al., 1991).

Des similarités de séquence ont aussi été observées pour le domaine de liaison à la cellulose (CBD) avec les endoglucanases de *Streptomyces lividans* (CelA), *Cellulomonas fimi* (CenA) et *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* (EndA) (Théberge et al., 1992; Gilkes et al., 1991) (figure 12). Le CBD est situé au C-terminal de la cellulase B et il est délimité de chaque côté par une cystéine (C).

CelB	a--C-avsYg-TnvWqdgFTAdvtvt--NtGtapvdGWqlaftlps-GqRiTnaWNAsltp	331
CelA	atgCkae-YtiTsqwegGFqAgvkit--NlGd-pvsGwtlgftmpdaGqRlvqgWNA--tw	82
CenA	apgCrvd-YavTNqWpgGFgAnvtit--NlGd-pvssWkldWtyt-aGqRiqqlWNgtaSt	88
EndA	ggnCq---YvvTNqWnnqFTA-v-irvrMnGssainrWsvnWmsyadGsRiTnsWNAvt-	917
CelB	s-sGs--vtatgashNarI-apGgS--lsFGFqG--tygGaf-aeptgfrlnGta-Ctt-v*	381
CelA	sqgGs-avtaggvdWN-rtlatGaSadl--GFvGSft--Ganpa-ptsfTlnG-atCsgsv...	135
CenA	n--Gg-qvsvtSlpWNGSI-ptGgta--sFGFnGSw-a-Gsnpt-pasfslnG-ttCtgtvp..	140
EndA	---GnnpyaasalqWnanI-gpGqta--eFGFqGtkga-Gsrqv-pavt---G-svCq*	963

Figure 12: Comparaison de la séquence en acides aminés du domaine de fixation à la cellulose de *S.lividans* CelB avec des séquences de d'autres cellulases. Les acides aminés conservés sont indiqués en lettres capitales. Les acides aminés homologues sont indiqués en caractères gras. Les chiffres indiquent la position des acides aminés en partant du codon d'initiation. CelA, endoglucanase de *Streptomyces lividans*; CenA, endoglucanase de *Cellulomonas fimi*; EndA, endoglucanase de *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*.

3.0 Production de la cellulase B

La cellulase B est produite en milieu liquide M₁₃ modifié, additionné de xylose 1%. Dans ce cas, le xylose n'exerce pas de répression catabolique car le clone *S.lividans* IAF 9/8-83 possède un plasmide à copies multiples.

Il est connu que les cellulases sont très sensibles à la protéolyse et que cette dégradation augmente au cours du temps dans le milieu de culture. Un zymogramme du surnageant de culture, dont chaque puits contient 100 µg de protéines précipitées, permet d'observer ce phénomène (figure 13). Cette protéolyse apparaît à partir de 48 h et s'accroît à 72 h. La protéine native est largement présente mais elle est accompagnée de produits mineurs de dégradation. Un temps d'incubation de 55 h à 34°C a été choisi ce qui est un compromis entre une production suffisante de cellulase et une dégradation relativement réduite de l'enzyme. De plus, un inhibiteur de sérines protéases, le PMSF, est ajouté à raison de 1 mM avant d'entreprendre la purification de la cellulase B.

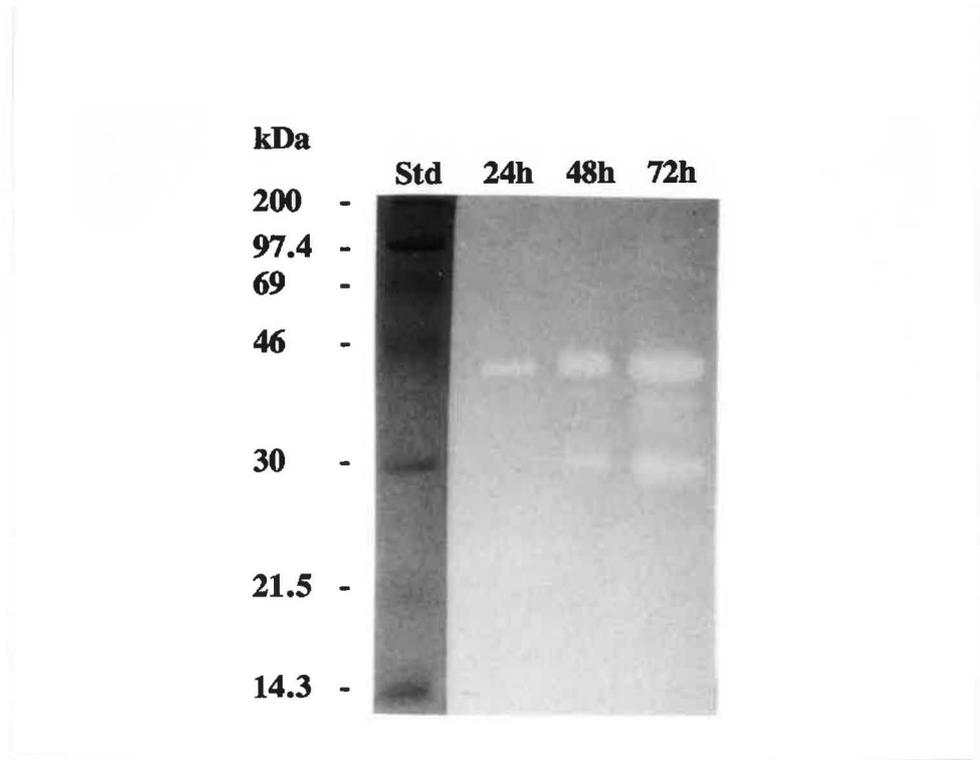


Figure 13: Zymogramme du surnageant de culture de *S.lividans* IAF 9/8-83 en milieu M₁₃ modifié contenant 1% de xylose

4.0 Purification de la cellulase B

La concentration des protéines du surnageant de culture à l'aide du système Pellicon (Millipore) ou par précipitation à l'éthanol donnait des résultats défavorables, car dans les deux cas des pertes majeures d'activité étaient observées.

La totalité du surnageant de culture est adsorbée sur la colonne de DEAE-Sépharose. L'élution avec 0.2 M NaCl permet de récupérer la fraction active. La concentration en sulfate d'ammonium de la fraction active est ensuite ajustée à 1M avant de procéder à l'adsorption sur la colonne de Phényl-Sépharose. L'élution de la cellulase B se fait en présence de 40% d'éthylène glycol. La fraction active est adsorbée sur MONO Q HR 10/10 et l'activité cellulasique est récupérée par élution avec 0.14 M de NaCl ce qui correspond à un temps de rétention de 60 min (figure 14). Sur tamis moléculaire la cellulase B a un temps de rétention de 34.35 min (figure 15).

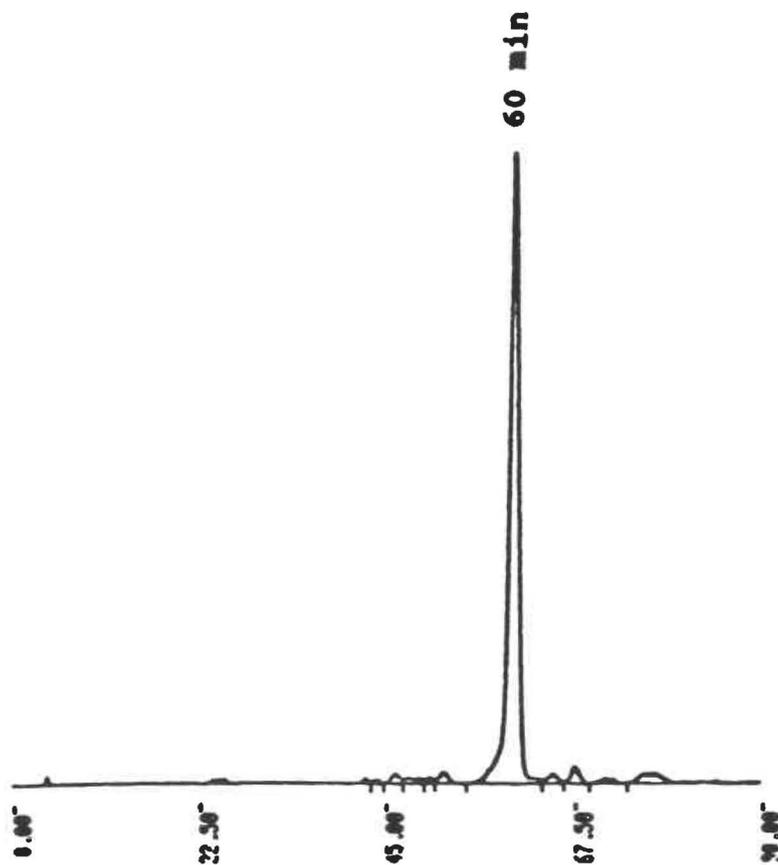


Figure 14: Profil d'élution de la cellulase B de *S.lividans* IAF 9/8-83 sur colonne échangeuse d'anions (MONO Q HR 10/10), avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl

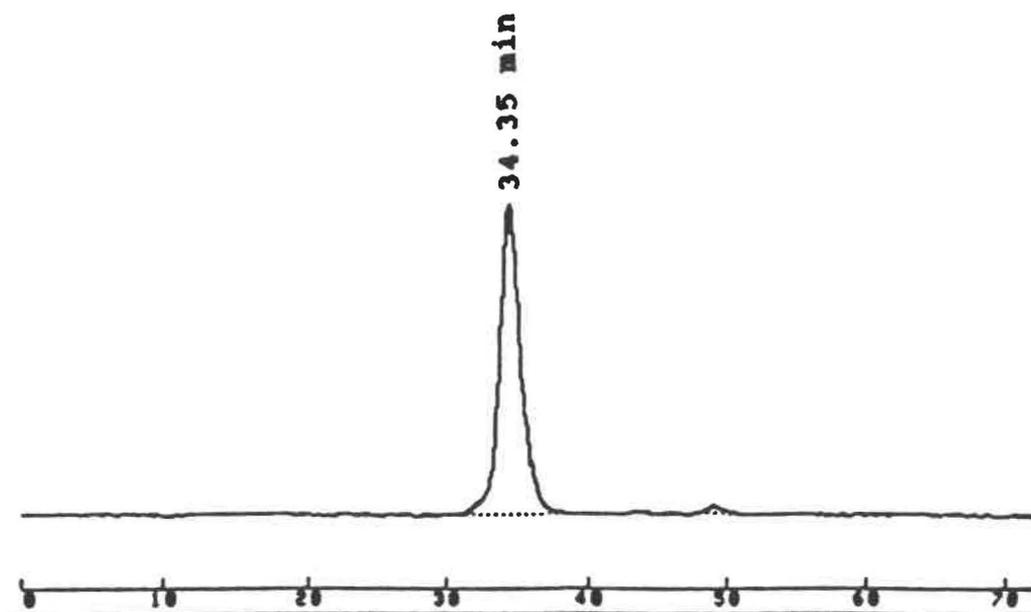


Figure 15: Profil d'élution de la cellulase B de *S.lividans* IAF 9/8-83 sur tamis moléculaire (Protein pak 300 SW)

Le tableau III résume les résultats obtenus au cours des étapes de purification. Le procédé permet la purification de la forme native de la cellulase B avec un rendement de 1.3 mg de cellulase B purifiée à partir de 5 L de culture. L'activité spécifique de la cellulase B est de 98 U.I./mg.

Une perte d'activité enzymatique a été observée suite à la lyophilisation de la fraction active récoltée après le passage sur le tamis moléculaire. Ce dernier n'ajoutait rien à la purification et par conséquent, il a été omis des étapes de purification.

4.1 Vérification de l'homogénéité de l'enzyme

L'électrophorèse en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration au nitrate d'argent de la fraction enzymatique purifiée sur MONO Q permet d'observer l'homogénéité de l'enzyme (figure 16).

Tableau III: Purification de la cellulase B de *S.lividans* IAF9/8-83

Étapes	Activité totale (U.I)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U.I/mg)	Rendement (%)
Surnageant (5 litres)	534.0	1700.3	3.2	100
DEAE-Sépharose	267.2	45.6	5.8	50
Phényl-Sépharose	207.4	3.0	69.0	38
MonoQ	132.5	1.3	98.0	24

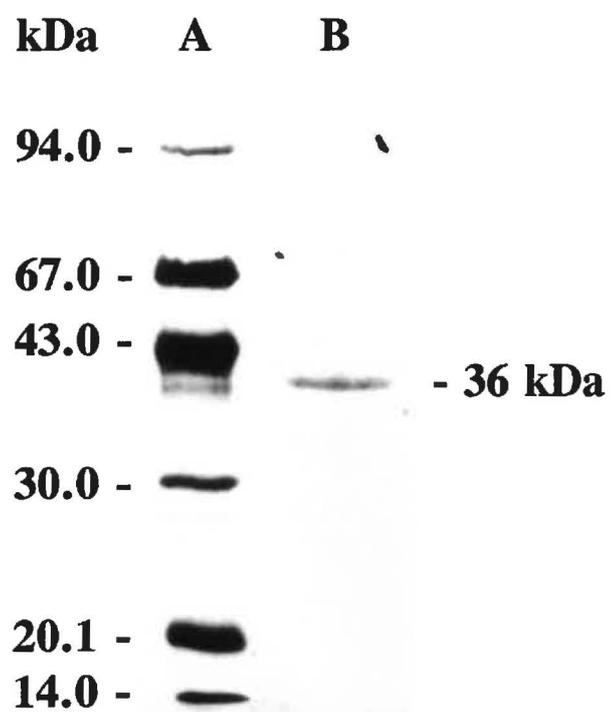


Figure 16: Vérification de l'homogénéité de l'enzyme (5 μ g) sur SDS-PAGE

5.0 Caractéristiques biochimiques de la cellulase B

Les caractéristiques biochimiques de la cellulase B ont été déterminées à partir de la fraction pure récupérée à l'étape de la MONO Q.

5.1 Masse moléculaire et point isoélectrique

La masse moléculaire de la cellulase B a été déterminée par migration sur SDS-PAGE (figure 16). Elle est estimée à 36 kDa par référence à des standards de poids moléculaire connu.

Le point isoélectrique (p.I.) de la cellulase B a été estimé en isoélectrofocalisation (figure 17). Une échelle de pH constituée de protéines de p.I. connu a permis de déterminer un p.I. de 4.2 pour la cellulase B.

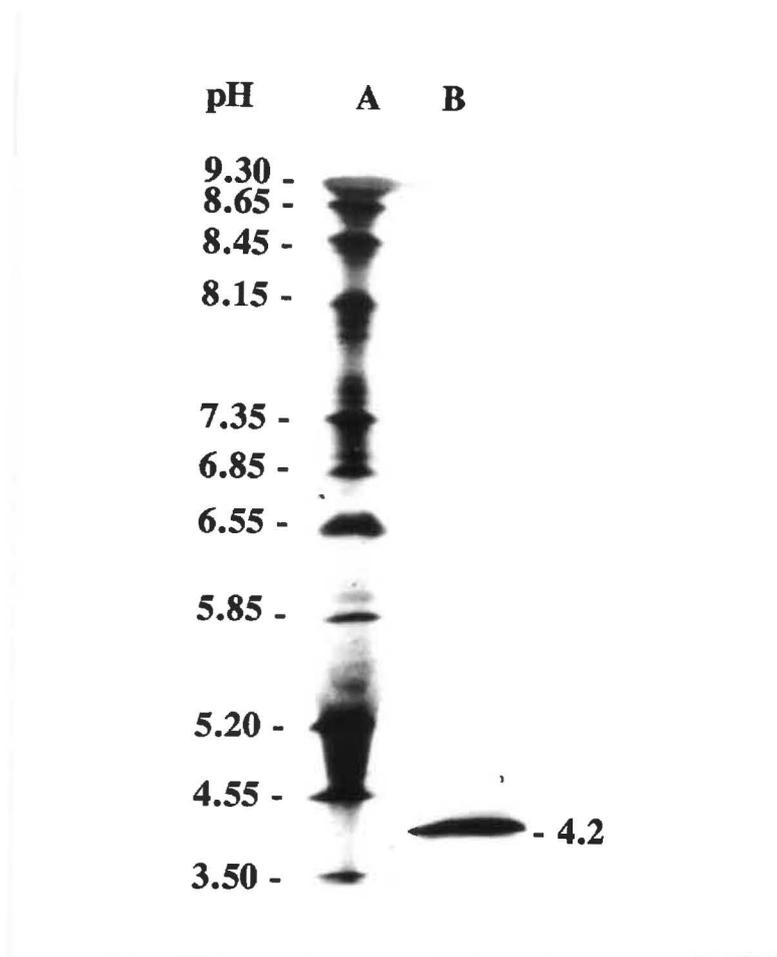


Figure 17: Migration de la cellulase B (10 μ g) en isoélectrofocalisation (IEF)

5.2 pH et température optimums

Les optimums pour le pH et la température de la cellulase B ont été déterminés par dosage des sucres réducteurs.

Une courbe de l'activité relative (%) en fonction du paramètre étudié a permis de déterminer un pH optimal de 6.5 (figure 18A) et une température optimale de 60°C (figure 18B).

5.3 Temps d'incubation optimal

Le temps d'incubation optimal a été évalué à pH 6.5 et à une température de 60°C. La courbe des μ moles libérées en fonction du temps permet de déterminer la linéarité de la réaction enzymatique.

On observe à la figure 19A qu'une incubation à 60°C en présence de 1% de substrat conduit à une perte rapide (i.e. moins de 10 min) de la linéarité de la réaction. Ce phénomène peut être expliqué par une instabilité de l'enzyme et/ou une insaturation en substrat. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque la température d'incubation est maintenue à 50°C ou lorsque la concentration du substrat est augmentée à 2% (figure 19A et 19B). Au cours du temps, la linéarité de la réaction enzymatique est acceptable lorsque les 2 paramètres ont été modifiés.

Les conditions des tests enzymatiques ont été établies comme suit: une température d'incubation à 50°C, une concentration de 2% de CMC et une durée d'incubation de 10 min.

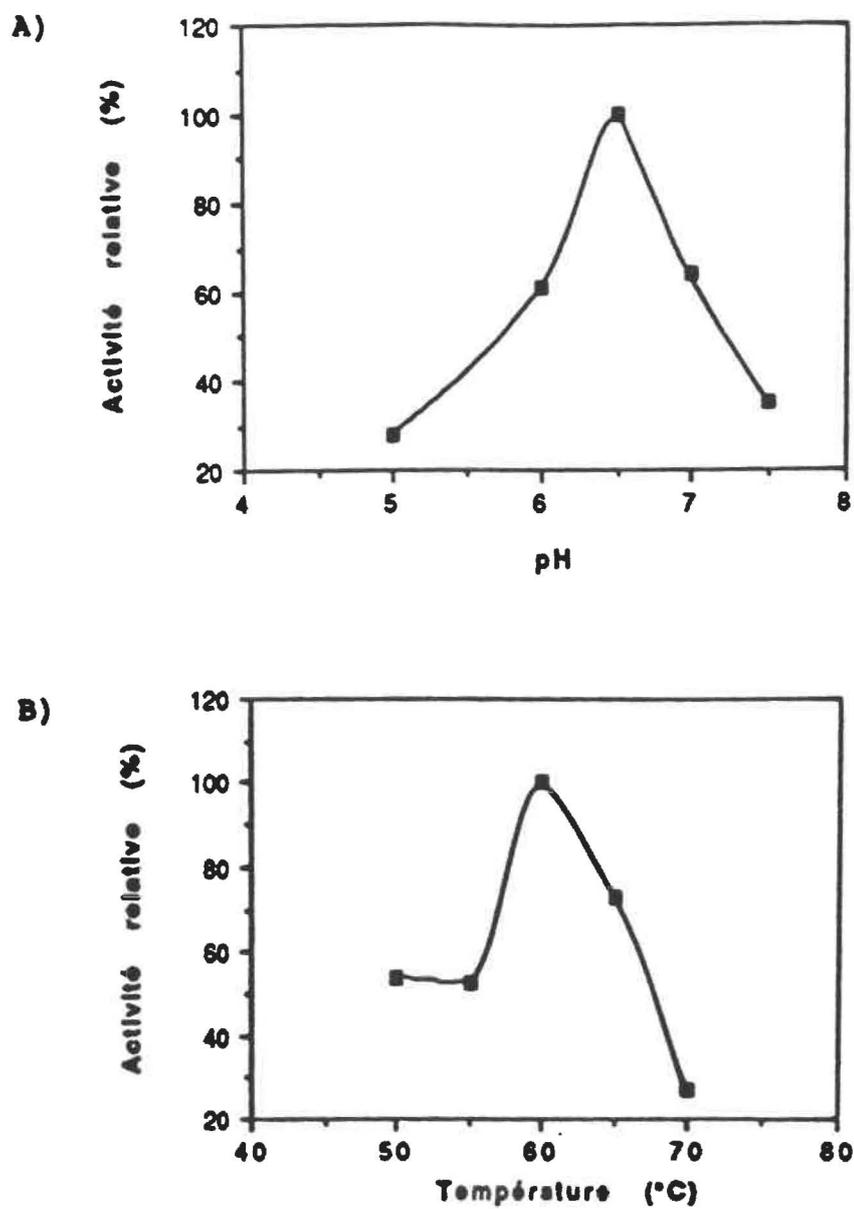


Figure 18: Conditions optimales de l'activité cellulasique
A) Effet du pH
B) Effet de la température

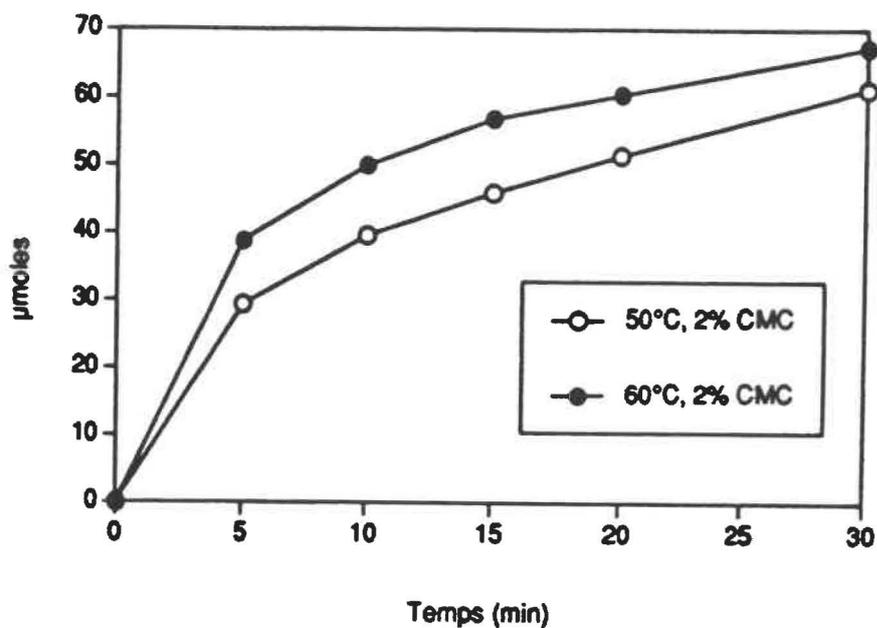
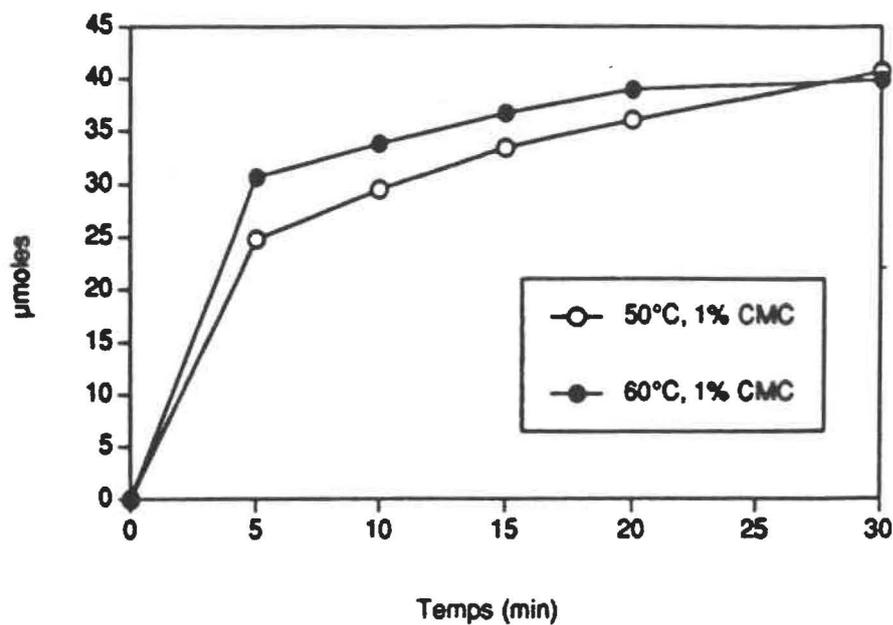


Figure 19: Temps optimal d'incubation:
Le nombre de μ moles libérées en fonction du temps

- A) Avec 1% de substrat
- B) Avec 2% de substrat

5.4 Cinétique enzymatique (K_m et V_{max})

Les constantes de cinétique K_m (constante de Michaelis-Menten) et V_{max} (vitesse maximale) sont évaluées par le graphique de Lineweaver et Burk qui est exprimé par l'inverse de l'activité enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration du substrat (figure 20). L'activité enzymatique est déterminée par dosage des sucres réducteurs dans les conditions suivantes : pH 6.5, température de 50°C et temps d'incubation de 10 min. Étant donné que l'enzyme était moins stable à 60°C, il a été jugé préférable de faire l'incubation à 50°C (voir section 5.3). La valeur K_m et V_{max} est respectivement de 1.30 mg/ml et de 110 U.I./mg.

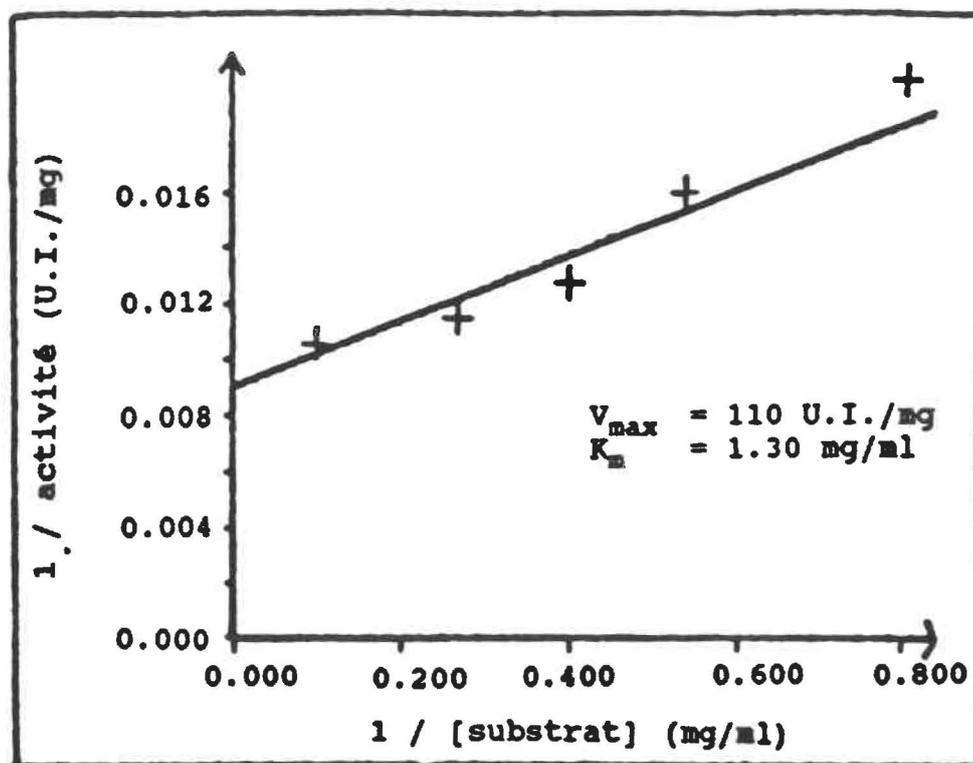


Figure 20: Cinétique enzymatique de la cellulase B de *S.lividans* IAF 9/8-83 (Graphique de Lineweaver et Burk)

5.5 Mode d'action

L'hydrolyse des cellooligosaccharides de différents degrés de polymérisation (G_2 à G_6), est effectuée à pH 6.5 et à 50°C avec 2.5 mM de substrat et 0.1 unité d'enzyme. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers. L'analyse des produits d'hydrolyse est faite sur HPLC.

La cellulase B n'a pas la capacité d'hydrolyser les cellooligosaccharides tels que le cellobiose (G_2) (figure 21) et le cellotriose (G_3) (figure 22).

Le cellotrétraose est partiellement dégradé conduisant à l'apparition de G_2 et de G_3 (figure 23). L'hydrolyse du cellopentaose (G_5) et du cellohexaose (G_6) est rapide libérant du G_2 , G_3 , G_4 et G_5 (figure 24 et 25). Au cours de l'hydrolyse du G_5 et du G_6 , il y a apparition de cellooligosaccharides de plus haut poids moléculaire. Ceci serait le résultat d'un mécanisme de transglycosylation.

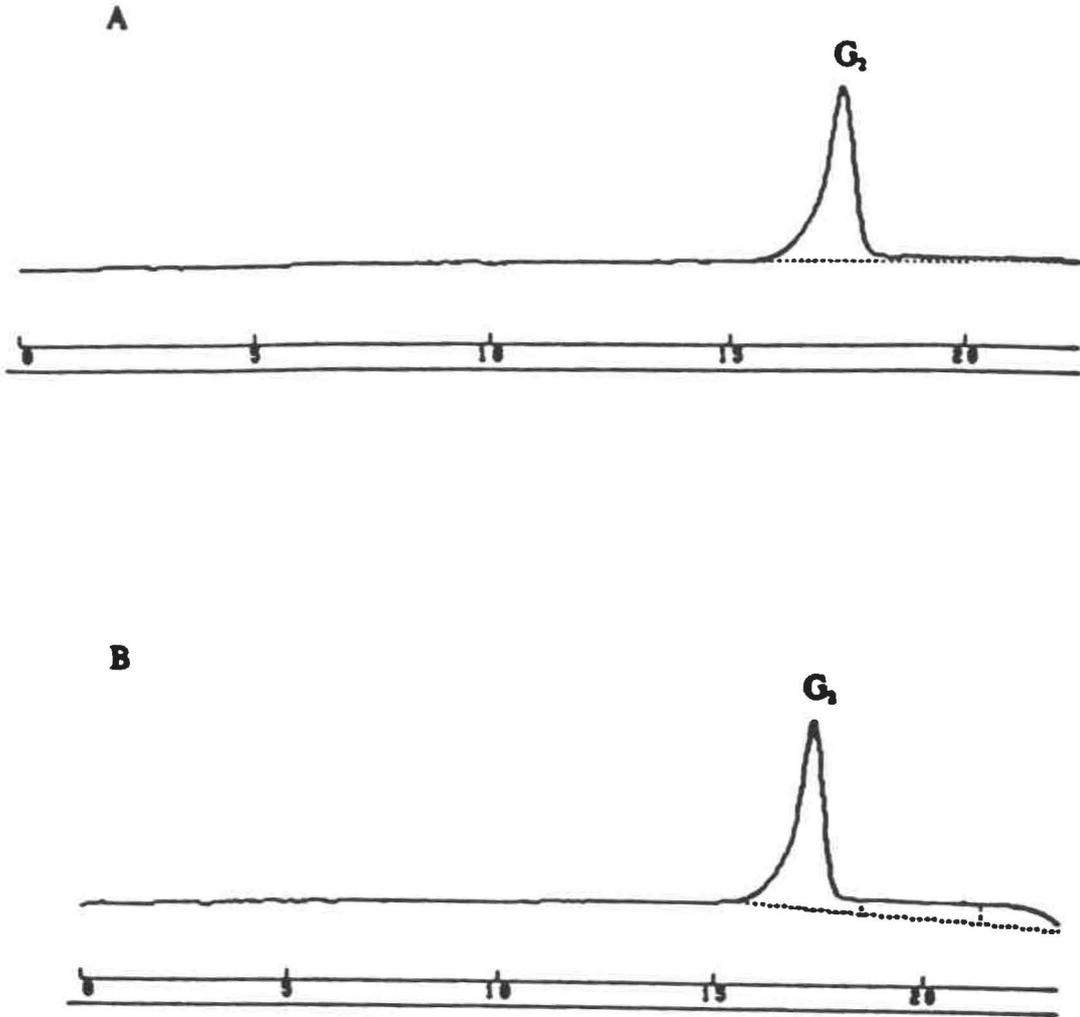


Figure 21: Hydrolyse enzymatique du cellobiose

A) Au temps zéro

B) Après 3 h

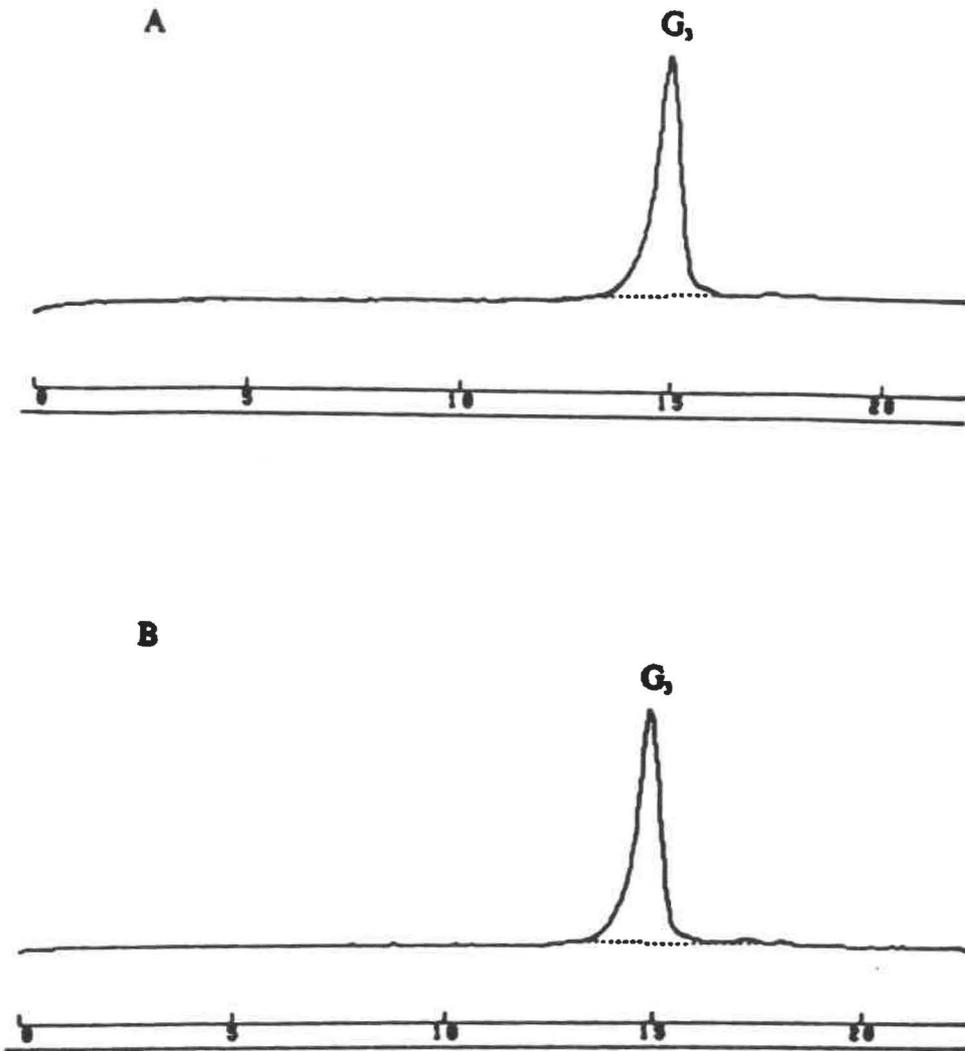


Figure 22: Hydrolyse enzymatique du cellotriose

A) Au temps zéro

B) Après 3h

Figure 23: Hydrolyse enzymatique du cellotétraose

- A) Au temps zéro
- B) Après 20 min
- C) Après 3 h

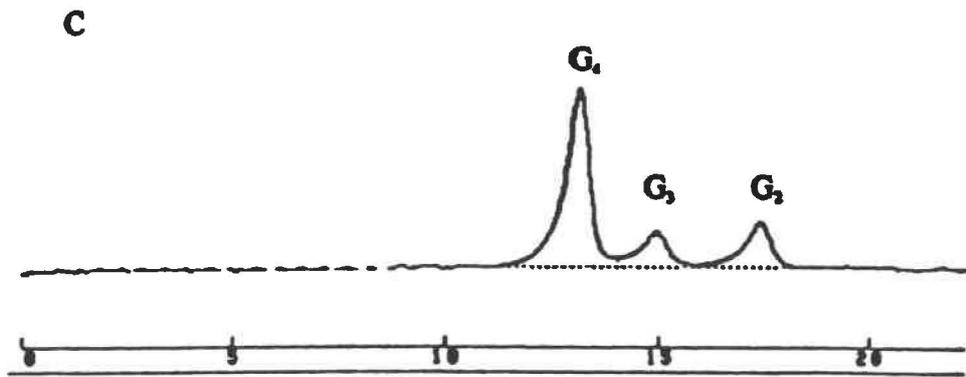
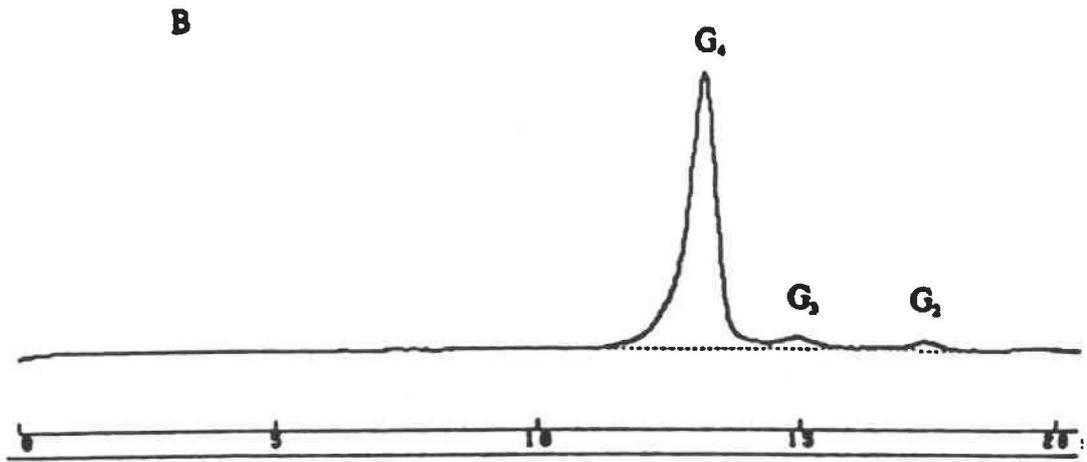
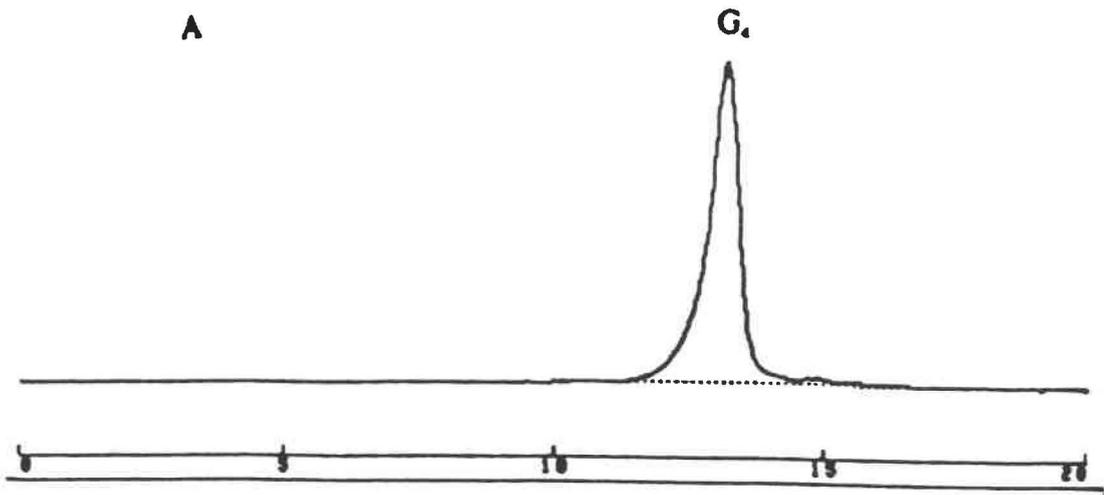


Figure 24: Hydrolyse enzymatique du cellopentaose

A) Au temps zéro

B) Après 20 min

C) Après 3h

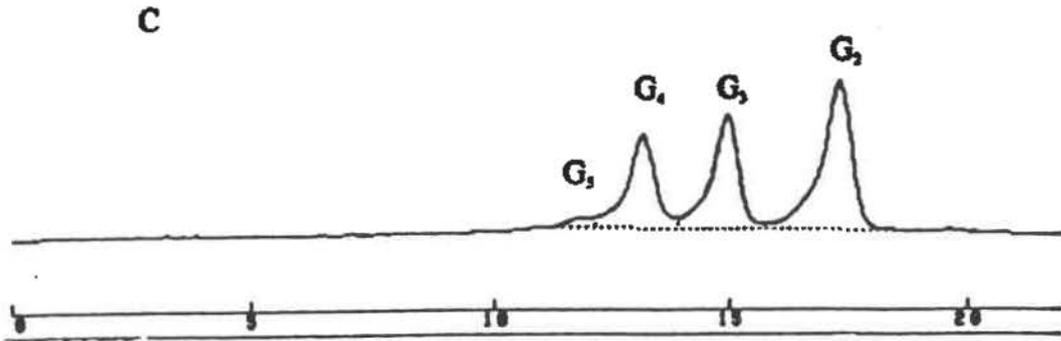
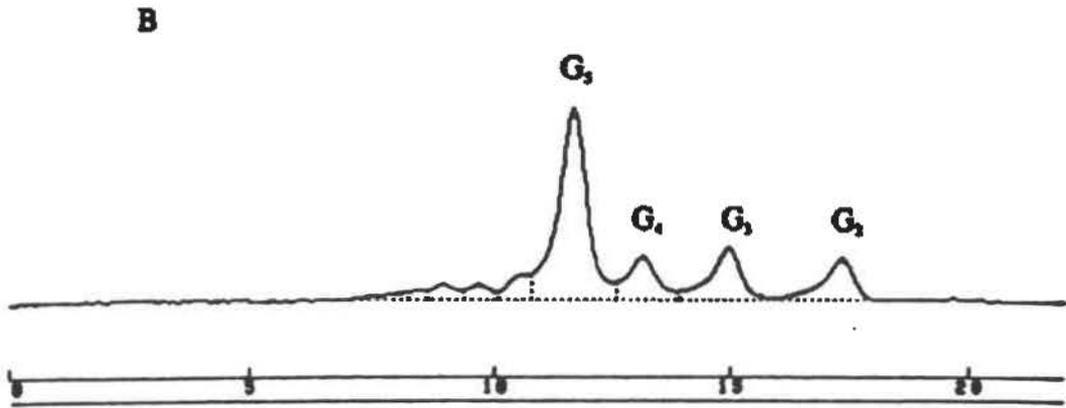
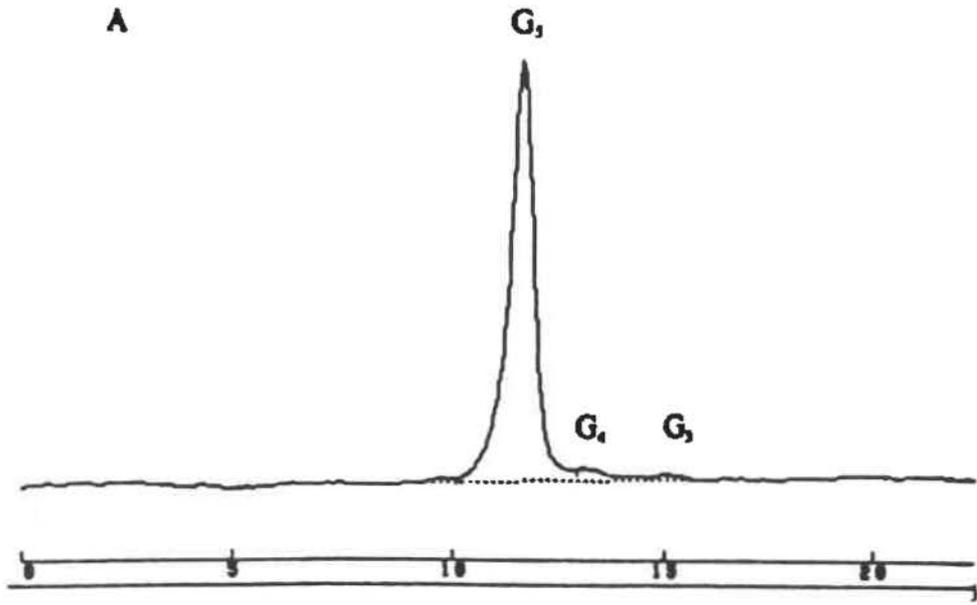
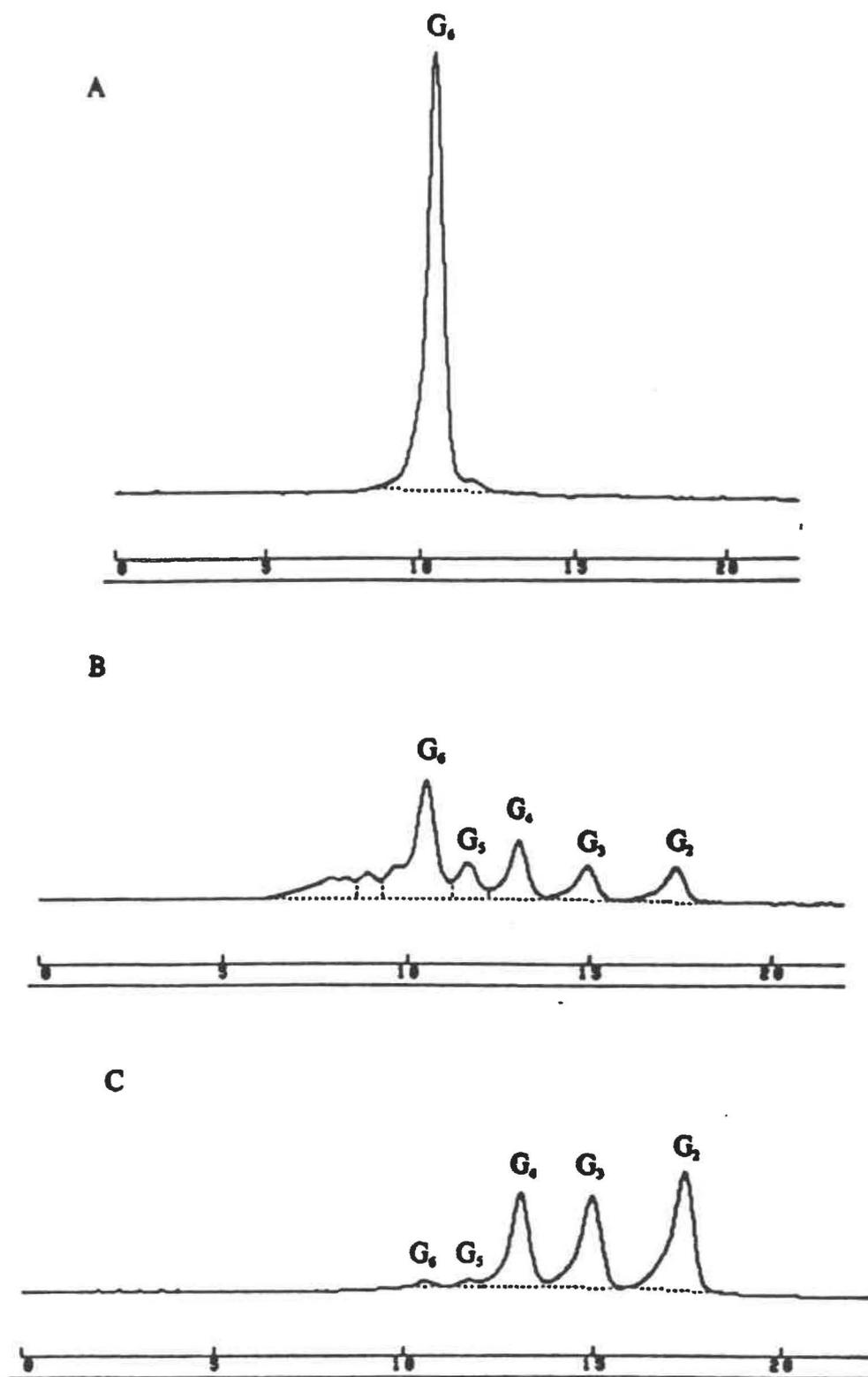


Figure 25: Hydrolyse enzymatique du cellohexaose

A) Au temps zéro

B) Après 20 min

C) Après 3 h



6.0 Immuno-détection de la cellulase B ("Western Blot")

La cellulase B est présente dans le surnageant de *S.lividans* 66 (souche sauvage), *S.lividans* 3131 (souche sauvage + pIJ702) et *S.lividans* IAF 9/8-83 (figure 26). Les protéines du surnageant de *S.lividans* IAF 8-83 (mutant *cel*⁻, *xln*⁺) et de *S.lividans* IAF 74/8-83 (*cel* A) ne réagissent pas avec les anticorps anti-cellulase B.

La protéolyse de la cellulase B, au cours du temps, est mise en évidence par les anticorps qui réagissent avec des polypeptides de plus faible masse moléculaire que la protéine native.

La préparation de la cellulase B purifiée montre aussi la présence de produits intermédiaires de dégradation qui sont co-purifiés ou qui apparaissent avec le temps à cause d'une conservation prolongée. La présence de formes intermédiaires peut être expliquée par la sensibilité de l'immuno-détection par rapport aux méthodes de coloration comme le bleu de Coomassie et le nitrate d'argent.

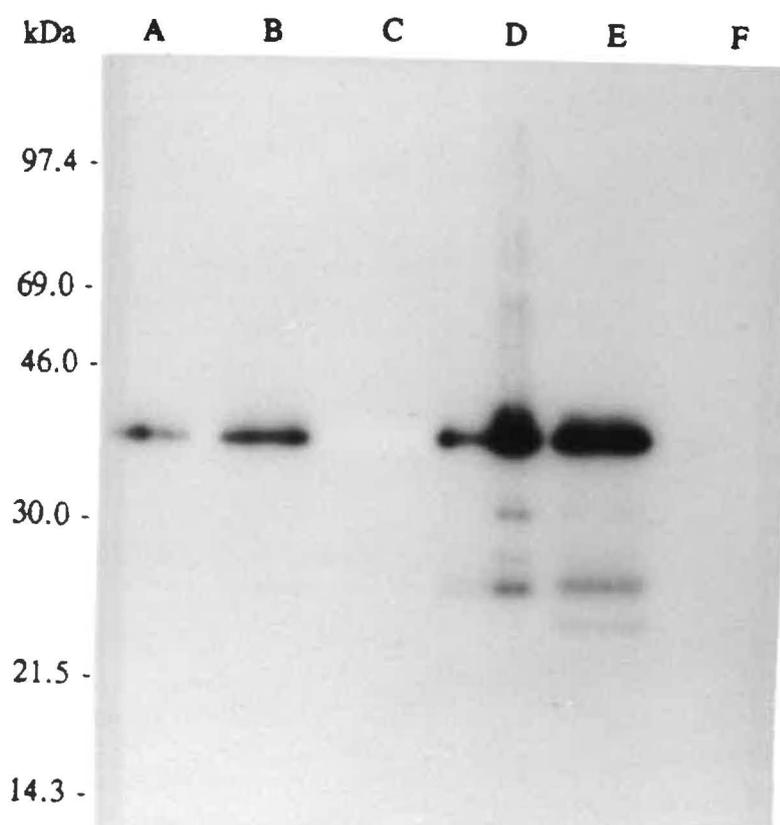


Figure 26:

Immuno-détection de la cellulase B
de *S. lividans* IAF 9/8-83

- A) *S. lividans* 66 (souche sauvage)
- B) *S. lividans* 3131 (souche sauvage + pIJ702)
- C) *S. lividans* IAF 8-83 (cellulase⁻)
- D) *S. lividans* IAF 9/8-83 (*cel B*)
- E) Cellulase B purifiée (10 µg)
- F) *S. lividans* IAF 74/8-83 (*cel A*)

DISCUSSION

Le sous-clonage du gène *celB* de *Streptomyces lividans* chez *Escherichia coli* facilite le séquençage du gène. Cependant cette méthode ne permet pas toujours l'expression des gènes sous-clonés, car les promoteurs de *Streptomyces* ne sont généralement pas reconnus chez *E. coli* (Seno et Baltz, 1989). Le gène *celB* est localisé dans le fragment *BclI* de 2.1 kB. L'expression du gène est obtenue seulement lorsque le gène de la cellulase B est rapproché du promoteur *lacZ*.

Le gène *celB* possède deux séquences inverses répétées de 12 nt qui sont situées en amont du gène de structure, contrairement à la *celA* de *S. lividans* qui n'en possède qu'une de 14 nt. Les séquences inverses répétées sont communément retrouvées au niveau des promoteurs des gènes de cellulase (Nakai et al., 1988). Ces séquences seraient impliquées dans la régulation de l'expression du gène (Fernández-Abalos et al., 1992). Chez le gène E_5 d'une endoglucanase de *Thermomonospora fusca*, cette région inverse répétée est le site de fixation d'une protéine d'activation impliquée dans l'induction de la transcription du gène (Lao et al., 1991).

La présence de ces deux palindromes pourrait conduire à la formation d'un ARNm ayant une structure en épingle à cheveux formée d'une séquence appariée de 12 nt et d'une boucle de 14 nt conférant une énergie libre (ΔG) de -34 kcal/mole.

Le gène *celB* contient un peptide signal de 40 acides aminés qui est composé de 6 résidus chargés positivement, d'une région hydrophobique, d'une proline précédant la séquence de clivage AQA. La présence de la proline permet d'exposer la séquence signal AQA qui est reconnue par une signal peptidase (Perlman et Halvorson, 1983). Ce type de signal peptide a été retrouvé chez les gènes *xln A, B, C* de *Streptomyces lividans* (Shareck et al., 1991).

La présence de codons TTA est très rare dans les gènes dont la composition en ADN est riche en G + C comme chez les streptomycètes. La présence du codon TTA se retrouve seulement dans les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire (antibiotiques, produits tardifs). Ce codon n'est pas présent dans les gènes régissant le métabolisme primaire (Chater, 1989). Il existe un gène *bldA* chez *Streptomyces* qui code pour un ARN_t qui est requis pour la traduction du codon TTA (leucine). Les gènes contenant un codon TTA dépendent de ce gène pour leur traduction. Le gène *bldA* doit donc être fonctionnel pour que les gènes du métabolisme secondaire soient traduits. Le clonage de gènes possédant des codons TTA chez une souche mutante *bld⁻* conduit à un faible niveau de traduction. Cependant leur traduction n'est pas affectée lorsque les codons TTA des mêmes gènes ont été modifiés par mutagenèse dirigée (Chater, 1989).

La présence de deux codons rares (TTA) dans le gène *celB* pourrait donc avoir une importance au niveau de la régulation du gène. On peut imaginer que le système cellulasique de *S.lividans* fonctionne comme suit: la cellulase B serait produite de façon tardive dû à la présence des codons rares TTA. Elle pourrait hydrolyser les macromolécules libérées par l'hydrolyse initiale de la cellulose par la cellulase A. Mais aucune étude n'a été réalisée pour déterminer si les gènes *cel A* et *cel B* sont exprimés à des moments différents au cours de la croissance.

Des homologies de la structure primaire de la cellulase B avec d'autres cellulases ont permis d'identifier la présence du domaine catalytique et du domaine de liaison à la cellulose qui sont respectivement situés au niveau N-terminal et C-terminal de la protéine. L'ordre structural est inversé dans le cas de la cellulase A (Théberge et al., 1992).

L'homologie du domaine catalytique de la cellulase B avec la cellulase d'*Aspergillus aculeatus* a permis de classifier la protéine parmi les glucanases de la famille H. Aucune homologie n'a été retrouvée avec la cellulase A de *S.lividans* qui appartient à la famille A (Théberge et al., 1992). La plupart des micro-organismes cellulolytiques produisent plusieurs cellulases appartenant à des familles différentes (Béguin, 1990). Ceci suggère que l'échange des gènes de cellulase pourrait être interspécifique entre différents

micro-organismes cellulolytiques (Béguin, 1990).

L'appartenance de l'enzyme à la famille H ne permet pas de définir de façon stricte ses propriétés enzymatiques. Par exemple, la famille F inclut des cellulases et des xylanases qui ont une certaine homologie au niveau du domaine catalytique, cependant leur affinité pour les substrats diffère (Gilkes et al., 1991). Seule l'homologie de séquence peut permettre d'apparenter la cellulase B à la famille H car les propriétés physico-chimiques de l'enzyme sont différentes des enzymes de la même famille. Par exemple, la cellulase (FI-CMC_{ase}) d'*A. aculeatus* possède une taille de 25 kDa et un p.I. de 4.8, comparativement à 36 kDa et 4.2 pour la cellulase B. De plus les conditions optimum pour l'activité enzymatique sont : pH 4.5 et une température de 50°C au lieu de pH 6.5 et une température de 60°C pour la cellulase B.

Le domaine de liaison à la cellulose est conforme à celui retrouvé chez d'autres cellulases. Il est généralement composé de 100 aa et possède des résidus conservés tels que le tryptophane (W), l'asparagine (N) et la glycine (G) en plus de 2 cystéines (C) délimitant le CBD (Béguin et al., 1992).

Le clonage hétérologue chez *E. coli* est généralement limité en ce qui concerne la sécrétion extra-cellulaire des enzymes. Après sous-clonage d'une endoglucanase de *Thermomonospora* YX chez *E. coli*, 30% de l'activité cellulasique est extra-cellulaire alors que le reste de l'activité est retrouvée dans le cytoplasme et dans le périplasma (Collmer et Wilson, 1983). Pour cette raison le clone Δ MC6 généré par sous-clonage du gène *celB* chez *E. coli* n'a pas été utilisé pour la production de cellulase B car l'enzyme se retrouve majoritairement au niveau du périplasma. La cellulase B contenu dans un extrait périplasmique aurait été plus difficile à purifier.

La production de la cellulase B est réalisée en milieu liquide M₁₃ modifié additionné de xylose 1% à partir de *S.lividans* IAF 9/8-83. Les monosaccharides tels que le xylose réprime la production des enzymes lignocellulolytiques chez la souche sauvage *S.lividans* 66 (Kluepfel et al., 1986). Le niveau d'expression en xylose pour les clones de *S.lividans* IAF 9/8-83 (*celA*) et IAF 74/8-83 (*celA*) était supérieur à la souche sauvage (Shareck et al., 1987). Chez les clones de *S. lividans*, le xylose n'a aucun effet sur l'expression et ceci s'explique par la présence du vecteur à copies multiples pIJ702 (Gusek et Kinsella, 1992).

L'aspect critique lors de la purification de la cellulase est la présence de protéases dans le surnageant de culture. Au cours du temps, la protéolyse génère des formes mineures actives. Ce phénomène de modification post-sécrétionnelle est bien documenté surtout chez les cellulases de *Clostridium cellulolyticum* et de *Streptomyces reticuli* (Fierobe et al., 1991; Schlochtermeyer et al., 1992).

La présence de formes intermédiaires actives ont rendu difficile la purification de la protéine native de 36 kDa. Au cours des essais de purification seule la protéine de 28 kDa a été purifiée. L'addition de l'étape de purification au moyen de la colonne à interaction hydrophobique a permis d'isoler la protéine native (36 kDa).

La séquence N-terminale de la cellulase B a été réalisée à partir de la protéine active de 28 kDa, qui est conforme à la séquence nucléotidique du début du gène de structure. Il est connu que l'élimination du domaine de liaison à la cellulose (CBD) par protéolyse génère des enzymes tronquées qui conservent leur activité cellulasique (Gilkes et al., 1988). La protéine active de 28 kDa est le résultat d'une délétion en C-terminal de la protéine native, puisqu'elles ont toutes les deux le même N-terminal.

Les propriétés physico-chimiques de la cellulase B sont établies à partir de la forme native de 36 kDa.

L'activité spécifique de la cellulase B (98 U.I./mg) est 5 fois moins élevée que celle de la cellulase A. Ceci corrobore les études de viscosimétrie des clones *S. lividans* IAF 9/8-83 (*celB*) et *S. lividans* IAF 74/8-83 (*celA*) (Shareck et al., 1987).

Les propriétés physico-chimiques de la cellulase B sont quelques peu différentes de celles de la cellulase A (Théberge et al., 1992). La masse moléculaire et le p.I. de la cellulase B sont respectivement de 36 kDa et de 4.2 et pour la cellulase A, ils sont respectivement de 46 kDa et de 3.3 (Théberge et al., 1992). Le pH et la température optimum de la cellulase A sont respectivement de 5.5 et 50°C, comparativement à 6.5 et 60°C pour la cellulase B. Il est courant de retrouver des propriétés enzymatiques différentes entre les enzymes d'un même micro-organisme (Coughlan, 1985). C'est le cas de *Trichoderma viride* (voir tableau I) où plusieurs cellulases sont produites mais chacune d'elles possède un profil enzymatique unique. Ces différentes enzymes coopèrent à l'hydrolyse rapide de la cellulose (Voragen et al., 1988).

Les constantes de cinétique enzymatique démontrent une importante variation entre les deux enzymes. La cellulase B possède un K_m de 1.3 mg/ml et un V_{max} de 110 U.I./mg comparativement à 4.2 mg/ml et 24.9 U.I./mg pour la cellulase A de *S. lividans* (Théberge et al., 1992). Ceci indique que la cellulase B possède une affinité et une vitesse d'hydrolyse sur la CMC plus élevées que la cellulase A ce qui permet de compenser pour la faible activité spécifique de la cellulase B. On peut faire des observations similaires pour les endoglucanases I et II de *Trichoderma viride* (Voragen et al., 1988).

L'hydrolyse des cellooligosaccharides de différents degrés de polymérisation permet d'étudier le mode d'action des enzymes. En général, les endoglucanases hydrolysent seulement les cellooligosaccharides d'un degré de polymérisation supérieur au cellotriose (G_3). Ce mode d'action est caractéristique des endoglucanases étant donné qu'elles coupent à l'intérieur des chaînes de cellulose. Le mode d'action de la cellulase B est commun aux endoglucanases telles que la cellulase B de *Clostridium josui*, l'endoglucanase de *Trichoderma viride* et la cellulase A de *S. lividans* (Fujino et Ohmiya, 1991; Shoemaker et Brown Jr., 1978; Théberge et al., 1992). L'hydrolyse du G_4 conduit à l'apparition du G_2 et du G_3 . La libération du cellotriose en absence de glucose suggère que le G_3 serait le produit d'hydrolyse du G_6 qui aurait été

préalablement synthétisé par transglycosylation. Ceci a d'ailleurs été observé avec les endoglucanases II et IV de *Penicillium pinophilum* et la cellulase A de *S. lividans* (Bhat et al., 1990; Théberge et al., 1992). Lors de l'hydrolyse du substrat au niveau du site actif, il y a départ d'un groupement ROH. L'intermédiaire réactionnel généré peut être libéré en réagissant avec une molécule d'eau. Par contre, l'intermédiaire réactionnel peut aussi réagir avec une molécule de substrat présente dans le milieu réactionnel générant un polymère de degré de polymérisation plus élevé que le substrat initial (Biely et al., 1991). Cette dernière alternative est caractéristique de la transglycosylation.

Les cellulases A et B de *S. lividans* ont un mode d'action qui est sensiblement le même, on peut alors s'interroger sur le rôle respectif de ces deux enzymes dans l'hydrolyse de la cellulose. Étant donné que seule la cellulase A possède une activité sur la cellulose cristalline (avicel), il est possible qu'elle soit sécrétée initialement pour hydrolyser les régions cristallines de la cellulose. Ensuite, la cellulase B pourrait attaquer les hydrolysats libérés par l'action initiale de la cellulase A. Cette explication est plausible parce que la cellulase B libère du G₂ du G₃ et du G₄ à partir de la cellulose amorphe (résultat non présenté).

CONCLUSION

- La séquence du gène *celB* de *S.lividans* 66 a été déterminée et code pour une protéine de 35 kDa.
- La présence de codons rares TTA peut avoir un effet au niveau de l'expression du gène.
- Le domaine catalytique et le domaine de liaison à la cellulose se retrouvent respectivement à l'extrémité N-terminale et C-terminale de la protéine.
- La cellulase B appartient aux glucanases de la famille H.
- La production de l'enzyme a été fait en milieu M₁₃ modifié contenant 1% de xylose à partir du clone *S. lividans* IAF 9/8-83.
- Malgré la présence d'une activité protéolytique observée au cours du temps, la forme native a été isolée conférant une activité spécifique de 98 U.I./mg.
- La masse moléculaire est de 36 kDa et le p.I. est de 4.2.
- Le pH optimal et la température optimale de l'enzyme sont respectivement de 6.5 et 60°C.
- Le temps d'incubation est de 10 min à 50°C avec 2% de CMC ce qui permet d'observer une réaction linéaire en fonction du temps.
- Les valeurs de la cinétique enzymatique sont:
 $K_m = 1.3 \text{ mg/ml}$ et $V_{max} = 110 \text{ U.I./mg}$.
- La cellulase B n'hydrolyse pas les celloligosaccharides inférieurs à G₄. Cependant elle hydrolyse rapidement le G₄, G₅ et le G₆. L'enzyme possède un mécanisme de transglycosylation.

REMERCIEMENTS

Je tiens remercier le Dr. Rolf Morosoli pour avoir dirigé ce projet de recherche et m'avoir permis de continuer mes études de deuxième cycle.

Je tiens remercier le Dr Dieter Kluepfel et le Dr François Shareck pour leur contribution scientifique.

J'ai grandement apprécié le support technique de Liette Biron, Nicole Daigneault et Serge Durand. Également merci à France Dumas pour la séquence N-terminale de la protéine, Johanne Roger pour les séquences d'ADN et Lise Trempe pour le service du Bio-Bar.

Un remerciement à la Fondation Armand-Frappier pour leur aide financière.

Je ne peux oublier l'esprit d'équipe du groupe des streptomycètes: Dr Dieter Kluepfel, Dr Rolf Morosoli, Dr François Shareck et ainsi que tous les étudiant(e)s et technicien(ne)s.

BIBLIOGRAPHIE

- ALMIN, K.E., K.-E. ERICKSSON et B. PETERSSON. 1975. Extracellular enzyme system utilized by fungus *Sporotrichum pulverulentum* for the breakdown of cellulose. Eur. J. Biochem. 51: 207-211.
- ARCAND, N. D. KLUEPFEL, F.W. PARADIS, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1993. β -Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *ManA* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. 290: 857-863.
- AUBERT, J.-P. 1992. Le cycle de la cellulose. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 7: 87-90.
- BÉGUIN, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Ann. Rev. Microbiol. 44: 219-248.
- BÉGUIN, P. et J.-P. AUBERT. 1992. La dégradation de la cellulose par les micro-organismes. Ann. Inst. Pasteur /Actualités 3: 91-115.
- BÉGUIN, P. et N.R. GILKES. 1987. Cloning of cellulase genes. Crit. Rev. Biotechnol. 6: 129-162.
- BÉGUIN, P., J. MILLET, S. CHAUVAUX, S. SALAMITOU, K. TOKATLIDIS, J. NAVAS, T. FUJINO, M. LEMAIRE, O. RAYNAUD, M.-K. DANIEL et J.-P. AUBERT. 1992. Bacterial cellulases. Biochem. Soc. trans. 20: 42- 46.
- BELAICH, A., H.-P. FIEROBE, D. BATY, B. BUSETTA, C. BAGNARA-TARDIF, C. GAUDIN et J.-P. BELAICH. 1992. The catalytic domain of endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*: Effects of arginine 79 et histidine 122 mutations on catalysis. J. Bact. 174: 4677-4682.
- BELDMAN, G., M.J. SEARLE-VAN LEEUWEN, F.M. ROMBOUTS ET F.G.J. VORAGEN. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. Eur. J. Biochem. 146: 301-308.
- BENTON, W.D. et R.W. DAVIS. 1977. Screening lambda gt recombinant clones by hybridation to single plaques in situ. Science 196: 180-182.
- BHAT, K.M., A.J. HAY, M. CLAEYSSSENS et T.M. WOOD. 1990. Study of the mode of action and site-specificity of the endo-(1,4)- β -D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, 1-³H-labelled, reduced and chromogenic cello-oligosaccharides. Biochem. J. 266: 371-378.

BIELY, P., D. MISLOVIČOVÁ et R. TOMAN. 1985. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Anal. Biochem.* 144: 142-146.

BIELY, P., M. VRŠANSKÁ et M. CLAEYSSENS. 1991. The endo-1,4- β -glucanase I from *Trichoderma reesei* : Action on β -1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. *Eur. J. Biochem.* 200: 157-163

BOYER, M.-H., B. CAMI, J.-P. CHAMBOST, M. MAGNAN et J. CATTANEO. 1987. Characterization of a new endoglucanase from *Erwinia Chrysanthemi*. *Eur. J. Biochem.* 162: 311-316.

CATTON, C. 1983. The case for compost. *New Scientist.* 100: 38-40.

CHANGAS, G.S. et D.B. WILSON. 1987. Expression of a *Thermomonospora fusca* cellulase gene in *Streptomyces lividans* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. microbiol.* 53: 1470-1475.

CHATER, K. 1989. Aspects of multicellular differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Dans: *Genetics and Molecular Biology of industrial microorganisms.* (éd. C.L. Hershberger, S.W. Queenes et G. Hageman). American Society for Microbiology, Washington. 377p.

COLLMER, A. et D.B. WILSON. 1983. Cloning and expression of a *Thermomonospora* YX endocellulase gene in *Escherichia coli*. *Bio/technology.* 1: 594-601.

COUGHLAN, M.P.. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 39-108.

COWLING, E.B. et T.M. KIRK. 1976. Properties of cellulose and lignocellulose materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 95-123.

CURRY, C., O'NEILL GILKES, R.C. MILLER JR et N. SKIPPER. 1988. Expression and secretion of a *Clostridium fimi* Exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. environ. microbiol.* 54: 476-484.

DELATTE, M.N. 1990. Le papier de l'an 2000. *Québec Science.* 29: 41-45.

EL-GROGARY, S., A. LEITE O. CRIVELLARO, D.E. EVELEIGH et H. EL-DORRY. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6138-6141.

ERICKSSON, K.E.. 1978. Enzymatic mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 317-332.

ERICKSSON, K.E. et S.G. HAMP. 1978. Regulation of endo-1,4- β -glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90: 183-190.

FERNÁNDEZ-ABALOS, J.M., P. SÁNCHEZ, P.M. COLL, J.R. VILLANUEVA, P. PÉREZ et R.I. SANTAMARÍA. 1992. Cloning and nucleotide sequence of *celA₁*, an endo- β -1,4-glucanase-encoding gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *J. Bact.* 174: 6368-6376.

FIEROBE, H.P., C. GAUDIN, A. BELAICH, M. LOUTFI, E. FAURE, C. BAGNARA, D. BATY et J.-P. BELAICH. 1991. Characterization of endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*. *J. Bact.* 173: 7956-7962.

FLANDROY, L.. 1991. Industrie papetière: une page à tourner. *Biofutur* 102: 21-35.

FORNWALD, J.A., F.J. SCHMIDT, C.W. ADAMS, M. ROSENBERG et M.E. BRAUNER. 1987. two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of *S.lividans* galactose operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2130-2134.

FUJINO, T. et K.OHMIYA. 1991. Cloning of the *celB* gene encoding endo-1,4- β -glucanase-2 from *Clostridium josui* in *Escherichia coli* and the properties of the translated product. *J. Fermentation and Bioengineering.* 72: 422-425.

GILKES, N.R., B. HENRISSAT, D.G. KILBURN, R.C. MILLER Jr. et R.A.J. WARREN. 1991. Domains in microbial β -1,4-glucanases: Sequence conservation, function and enzyme families. *Microbiol. Reviews.* 55: 303-315.

GILKES, N.R., M.L. LANGSFORD, D.G. KILBURN, R.C. MILLER et R.A.J. WARREN. 1984. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.* 259: 10455-10459.

GILKES, N.R., R.A.J. WARREN, R.C. MILLER Jr et D.G. KILBURN. 1988. Precise excision of the cellulose binding domain from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J. Biol. Chem.* 263: 10401-10407.

- GONG, C.S. et G.T. TSAO. 1979. Cellulase and biosynthesis regulation. *Annu. Rep. Ferment. Process.* 3: 111-140.
- GREENBERG, N.M., R.A.J. WARREN, D.G. KILBURN et R.C. Jr MILLER. 1987. Regulation and initiation of *cenB* transcripts of *C.fimi*. *J. Bact.* 169: 4674-4677.
- GRÉPINET, O. et P. BÉGUIN. 1986. Sequence of the cellulase gene of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanase B. *Nucleic Acids Res.* 14: 1791-1999.
- GUSEK, T.W. et J.E. KINSELLA. 1992. Review of the *Streptomyces lividans* / vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 247-260.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- HENRISSAT, B., M. CLAEYSSENS, P. TOMME, L. LEMESLE et J.-P. MORNON. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81: 83-95.
- ICHIKAWA, Y., G.C. LOOK et C.-H. WONG. 1992. Enzyme-catalyzed oligosaccharides synthesis. *Anal. Biochem.* 202: 215-238.
- KIESER, T. 1984. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid.* 12: 19-36.
- KLUEPFEL, D.. 1991. Protein biosynthesis and secretion. Dans: Genetics and product formation in *Streptomyces*. Plenum Press, New York, 203-205.
- KLUEPFEL, D., N. DAIGNEAULT, R. MOROSOLI et F. SHARECK. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 626-631.
- KLUEPFEL, D., F. SHARECK, F. MONDOU ET R. MOROSOLI. 1986. Characterization of a cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 230-234.
- KNOWLES, J.K.C., K.M.H. NEVALAINEN, M.E. PENTILLA, I.A. SALOVUORI et T.T. TEERI. 1983. The cloning of a fungal cellulase genes. Dans: Gene expression in yeast. Proceeding of the ALKO yeast Symposium. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki. p.187-188.

- KUNKEL, T. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 488-492.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LAMED, R., E. SETTER et E.A. BAKER. 1983. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. J. Bact. 156: 828-836.
- LAO, G., G.S. GHANGAS, E.D. JUNG et D.B. WILSON. 1991. DNA sequences of three β -1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. J. Bact. 173: 3397-3407.
- LEHNINGER, A.L. 1982. Principles of biochemistry. Worth Publishers, Inc. New-York.
- LIN, E. et D.B. WILSON. 1988. Identification of a *celE*-binding protein and its potential role in induction of the *celE* gene in *Thermomonospora fusca*. J. Bact. 170: 3843-3846.
- LORI, M.R. et G.H. CHAMBLISS. 1989. Cellulases of bacterial origin. Enzyme. Microb. Technol. 11: 626-644.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Anal. Chem. 69: 646-648.
- MacKENZIE, C.R., D. BILOUS ET K.G. JOHNSON. 1984. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. Can. J. Microbiol. 30: 1171-1178.
- MacLEOD, A.M., N.R. GILKES, L. ESCOTE-CARLSON, R.A.J. WARREN, D.G. KILBURN et R.C. MILLER Jr. 1992. *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*. Gene 121: 143-147.
- MANDELS, M. et E.T. REESE. 1957. Production of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. J. Bact. 73: 269-278.
- MANDELS, M. et E.T. REESE. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bact. 79: 816-826.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour. New York.

MARSDEN, W.L., P.P. GRAY et N.W. DUNN. 1982. Alternative pathway for glucose production from cellulase using *Trichoderma reesei* QM 9414 cellulase. *Bio/Technol. lett.* 4: 589-594.

MATSUDAIRA, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.

MEAD, D.A., E. SZCZESNA-SKORUPA et B. KEMPER. 1986. Single-stranded DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering* 1: 67-74.

MERIVUORI, H., K.M. SIEGLER, J.A. SANDS et B.S. MONTENECOURT. 1985. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 411-414.

MILLER, G.L., R. BLUM, W.E. GLENNON et A.L. BURTON. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 2: 127-132.

MISAWA, N., T. OKAMOTA et K. NAKAMURA. 1988. Expression of a cellulase gene in *zygomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 7: 167-178

MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* 49: 323-329.

MONTENECOURT, B.S. 1983. *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends in Biotechnology.* 1: 156-161.

MORI, Y. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from cellulosomes (multicomponent cellulase complexes) of *Clostridium thermoCELLUM*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1198-1203.

MURAO, S., R. SAKAMOTO ET M. ARAI. 1988. Cellulases of *Aspergillus aculeatus*. *Methods in Enzymology* 160: 274-299.

NAKAI, R., S. HORINOUCI et T. BEPPU. 1988. Cloning and nucleotide sequence of a cellulase gene, *cas A*, from an alkalophilic *Streptomyces* strain. *Gene* 65: 229-238.

NAKAMURA, K. et K. KITAMURA. 1988. Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Methods in Enzymology* 160: 211-216.

OKADA, G. 1988. Cellulase of *Aspergillus niger*. *Methods in*

Enzymology 160: 259-264.

OOI, T., A., SHINMYO, H. OKADA, S. MURAO, T. KAWAGUSHI et M. ARAI. 1990. Complete nucleotide sequence of a gene coding for *Aspergillus aculeatus* cellulase (FI-CMC_{ase}). Nucleic Acids Res. 18: 5884.

PENTTILA, M.E., L. ANDRE, M. SOLOHEIMO, P. LEHTOVAARA et J.C. KNOWLES. 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 3: 175-186.

PENTTILA, M.E., K.M.H. NEVALAINEN, A. RAYNAL et J.K.C. KNOWLES. 1984. Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast. Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidase. Mol. Gen. Genet. 194: 494-499.

PERLMAN, D. et H.O. HALVORSON. 1983. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. J. Mol. Biol. 167: 391-409.

PETERSSON, L.G. 1975. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by *Trichoderma viride*. Dans: Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose (éd. M. BAILEY, T.M. ENARI et M. LINKO). SITRA, HELSINKI. p.255-280.

ROBSON, L.M. et G.H. CHAMBLISS. 1989. Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microbiol. Technol. 11: 626-644.

ROUVINEN, J., T. BERGFORS, T. TEERI, J.K.C. KNOWLES et T.A. JONES. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. Science 249: 380-386.

SAARILAHTI, H.T., B. HENRISSAT et E.T. PALVA. 1990. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* subsp. *caratovora*. Gene 90: 9-14.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463.

SCHLOCHTERMEIR, A., F. NIEMEYER et H. SCHREMPF. 1992. Biochemical and electron microscopic studies of *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) in its mycelium-associated and extracellular forms. Appl. Envir. Microbiol. 58: 3240-3248.

SENO E.T. et R.H. BALTZ. 1989. Structural organization and regulation of antibiotic biosynthesis and resistance genes in actinomycetes. Dans: Regulation of secondary metabolism in

actinomycetes. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 1-48.

SHARECK, F., F. MONDOU, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1987. Cloning and DNA sequences involved in overproduction of endoglucanase activity in *Streptomyces lividans* 66. *Biotechnol. Lett.* 9: 169-174.

SHARECK, F., C. ROY, M. YAGUCHI, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene* 107: 75-82.

SHOEMAKER, S.P., R.D. BROWN Jr. 1978. Enzymatic activities of endo-1,4- β -D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta.* 523: 133-146.

SPREY, B. et A. UELKER. 1992. Isolation and properties of a low molecular mass endoglucanase from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 92: 253-258.

STENBERG, D. et G.R. MANDELS. 1980. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose : induction of cellulase and repression of β -glucosidase. *J. Bact.* 144: 1197-1199.

STONE, R.N.. 1976. Timber, wood residues and wood pulp as sources of cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 223-234.

STROHL, W.R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20: 961-974.

TEATHER, R.M. et P.J. WOOD. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.

TEERI, T. I. SALOVUORI et J. KNOWLES. 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology.* 1: 696-699.

THÉBERGE, M., P. LACAZE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 815-820.

TOWBIN, H., T. STAHELIN et J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

- TROTTER, P.C. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry : a review. Part 2: upgrading pulp properties, papermaking, effluent treatment and, converting biomass to fuels and chemicals. *Tappi J.* May 1990: 201-205.
- VATS-MEHTA, S., P. BOUVRETTE, F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1990. Cloning of a second xylanase-encoding gene of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* 86: 119-122.
- VIERA, J. et J. MESSING. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 153: 3-11.
- VORAGEN, A.G.J., G. BELDMAN ET F.M. ROMBOUTS. 1988. Cellulases of a mutant strain of *Trichoderma viride* QM 9414. *Methods in Enzymology* 160: 243-251.
- WHISTLER, R.L. et L.C. SMART. 1953. Polysaccharides chemistry. Academic Press Inc. Publ., New York, 453 p.
- WHITTLE, D.J., D.G. KILBURN, R.A.J. WARREN et R.C. MILLER. 1982. Molecular cloning of a *Cellulomonas fimi* cellulase gene in *Escherichia coli*. *Gene* 17: 139-145.
- WILSON, D.B. 1988. Cellulases of *thermomonospora fusca*. *Methods in Enzymology*. 160: 314-323.
- WOOD, T.M. et V. GARCIA-CAMPAYO. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*. 1: 147-161.
- WOOD, T.M. et S.I.M^cCRAE. 1977. Cellulase from *Fusarium solani* : Purification and properties of the C₁ component. *Carbohydrate Res.* 57: 117-133.
- WOOD, T.M. et S.I. M^cCRAE. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem. J.* 171: 61-72.
- WOOD, T.M. et J.N. SADDLER. 1988. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in enzymology* 160: 3-11.
- WOOD, W.E., D.G. NEVBAUER et F.J. STUTZENBERGER. 1984. Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. *J. Bact.* 160: 1047-1054.

