

À ma mère, Nicole et à mon père, Jean-Lévy,

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

**STRUCTURE ET FONCTION DE
L' α -L-ARABINOFURANOSIDASE B DE *STREPTOMYCES
LIVIDANS* : DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION
ET DES RÉSIDUS IMPLIQUÉS DANS LA CATALYSE
ENZYMATIQUE**

Par
CHRISTINE JACQUES

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :	Claude Guertin
Examineur externe :	Michel Gilbert
Directeur de recherche :	Claude Dupont

Janvier 2001

RÉSUMÉ

L' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces lividans* (AbfB) fait partie des glycosyles hydrolases. Celle-ci catalyse la libération de l'arabinose à partir de substrats comme le xylane d'épeautres d'avoine, les arabinoxylanes de blé, de seigle et l'arabinane de la betterave à sucre. L'AbfB fait partie de la famille 62 des glycosyles hydrolases qui, avec la famille 43, constituent le clan GH-F. Il a été démontré que les enzymes de la famille 43 hydrolysent les substrats à l'aide d'un mécanisme d'inversion. Cependant, le mécanisme de réaction et les acides aminés servant à l'hydrolyse sont encore inconnus chez les membres de la famille 62. La détermination de l'anomère formé suite à l'hydrolyse du substrat et l'identification des résidus acides nécessaires à cette hydrolyse permettrait d'en savoir plus sur le fonctionnement des membres de cette famille.

Le domaine catalytique de l'AbfB a été isolé de son domaine de fixation au substrat en clonant son gène dans un vecteur à copies multiples et en effectuant une transformation dans la souche de *S. lividans* 10-164. Le domaine catalytique de l'enzyme (AbfB₂) a été produit et purifié. La résonance magnétique nucléaire n'a pas permis d'identifier l'anomère formé suite à l'hydrolyse du substrat à cause de l'instabilité des résidus arabinofuranoses libérés. Par contre, l'utilisation de la chromatographie à haute performance échangeuse d'anion a fourni la preuve indirecte que le substrat libéré possède une conformation inverse au carbone anomérique comparativement au lien glycosidique coupé.

Une approche de modification chimique des acides aminés carboxyliques a été préconisée pour identifier ceux impliqués dans la catalyse enzymatique. L'utilisation de carbodiimides, des agents chimiques formant des liens covalents avec les résidus carboxyliques, a permis de confirmer l'implication d'aspartates et/ou de glutamates dans l'hydrolyse du substrat. En effet, l'enzyme a été inhibée partiellement ou complètement par différents types de carbodiimides. Cependant, il a été impossible d'identifier ces résidus carboxyliques.


Étudiant


Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
INTRODUCTION	1
I. REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1. GLYCOSYLES HYDROLASES.....	5
1.1 Généralités.....	5
1.2 Classification.....	5
1.3 Mécanismes d'action.....	7
1.4 Topologie du site actif.....	10
2. LES α-L-ARABINOFURANOSIDASES	12
2.1 Généralités.....	12
2.2 Classification.....	16
2.3 Applications.....	17
3. L'α-L-ARABINOFURANOSIDASE B DE <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i>.....	21
3.1 Généralité.....	21
4. APPROCHES POUR LA DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION	22
5. APPROCHES POUR L'IDENTIFICATION DES RÉSIDUS CATALYTIQUES CHEZ LES GLYCOSYLES HYDROLASES	23
6. OBJECTIFS DE TRAVAIL	27
II. APPROCHE EXPÉRIMENTALE	29
1. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES.....	29
1.1 <i>Streptomyces lividans</i>	29
1.2 <i>Escherichia coli</i>	29
2. PLASMIDES UTILISÉS	29
2.1 pIAFC109.....	29
2.2 pIAF933.....	30
2.3 pIAF31.....	30
3. CONSERVATION DES SOUCHES DE <i>S. LIVIDANS</i>.....	30
4. CONSTRUCTION DE L'INSERT.....	31
4.1 Amplification.....	31

4.2 Mutagenèse dirigée par PCR utilisée pour enlever le site de restriction <i>Sph</i> I	31
4.3 Purification de l'ADN	32
5. CLONAGE ET TRANSFORMATION	34
5.1 Endonucléases de restriction	34
5.2 Ligation	34
5.3 Transformation dans des protoplastes de la souche 10-164	35
5.4 Isolement du plasmide	35
6. SÉQUENÇAGE DU GÈNE	36
6.1 Sous-clonage dans M13	36
6.2 Transfection	36
6.3 Production et purification de l'ADN simple brin	37
6.4 Protection à la nucléase S1	37
6.5 Séquençage	38
7. FERMENTATION	38
7.1 Inoculation de la pré-culture	38
7.2 Inoculation du fermenteur	39
8. PURIFICATION DE L'ENZYME	39
8.1 Ultrafiltration à débit tangentiel	39
8.2 Dialyse	39
8.3 Chromatographie échangeuse d'ions	40
8.4 Tamis moléculaire	40
8.5 Concentration et lyophilisation de l'échantillon	41
9. ANALYSE DES PROTÉINES	41
9.1 Dosage des protéines	41
9.2 SDS-PAGE	41
9.3 Détermination du point isoélectrique	42
9.4 Transfert de type Western et immunodétection	42
9.5 Transfert sur membrane PVDF et séquençage de l'extrémité N-terminale	43
10. PRÉPARATION DES SUBSTRATS	44
10.1 Xylane d'épeautres d'avoine	44
10.2 Arabinoxylane de seigle et de blé	44
10.3 Arabinane de betterave à sucre	44
11. DOSAGE DE L'ARABINOSE LIBÉRÉ	44
11.1 Test colorimétrique	44
11.2 Chromatographie à haute performance échangeuse d'anion (HPAEC)	45
12. ANALYSES PAR RMN	45
13. ANALYSES EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE	46
13.1 Analyses en mode d'ionisation <i>electrospray</i> positif (ESI)	46
13.2 Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS)	46

13.3 Analyses en mode <i>nanospray</i>	47
14. DIGESTION PEPTIDIQUE	48
14.1 Digestion de l'enzyme par la trypsine.....	48
14.2 Analyses des peptides par HPLC.....	48
14.3 Mesure de la radioactivité des peptides.....	49
15. SYNTHÈSE DE CARBODIIMIDES SOLUBLES DANS L'EAU	49
16. DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTS CARBODIIMIDES ENVERS L'ABFB₂.....	49
17. MODIFICATION DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES	50
17.1 Utilisation d'un carbodiimide.....	50
17.2 Utilisation d'un amine.....	50
17.3 Marquage des résidus catalytiques.....	50
18. AUTORADIOGRAMME	51
III. RÉSULTATS	53
1. CONSTRUCTION ET AMPLIFICATION DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE	53
2. SOUS-CLONAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE	55
3. SÉQUENÇAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE	55
4. PRODUCTION DE L'ENZYME.....	60
5. PURIFICATION DE L'ENZYME.....	60
6. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME.....	64
6.1 Séquençage N-terminal de l'enzyme	64
6.2 Masse moléculaire et point isoélectrique	64
6.3 pH et température optimaux	64
6.4 Cinétique enzymatique.....	70
6.5 Profils d'hydrolyse.....	70
7.0 DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION	73
7.1 Analyses par RMN.....	73
7.2 Analyses par HPAEC.....	73
8. MODIFICATION DE L'ENZYME PAR DES AGENTS CHIMIQUES SPÉCIFIQUES AUX RÉSIDUS CARBOXYLIQUES.....	78
8.1 Détermination de l'efficacité de différents carbodiimides.....	78
8.2 Vérification du marquage par le carbodiimide et de l'amidation de l'enzyme	78

8.3 Digestion enzymatique de l'enzyme	86
9. MARQUAGE RADIOACTIF DE L'ENZYME.....	99
9.1 Utilisation du [¹⁴ C] EAC	99
9.2 Utilisation de la [¹⁴ C] glycine éthyle ester	99
IV. DISCUSSION	110
1. CONSTRUCTION ET SOUS-CLONAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE.....	110
2. PRODUCTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME	110
3. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME	111
4. DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION	117
5. EFFICACITÉ ET MÉCANISME D'ACTION DES CARBODIIMIDES.....	119
6. AMIDATION DES RÉSIDUS CARBOXYLIQUES.....	123
7. IDENTIFICATION DES PEPTIDES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE..	124
8. MARQUAGE RADIOACTIF DE L'ENZYME.....	125
8.1 [¹⁴ C] EAC	125
8.2 [¹⁴ C] glycine éthyle ester.....	126
CONCLUSION	128
REMERCIEMENTS	136
BIBLIOGRAPHIE	137
ANNEXES	150

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tableau I :	Liste des familles comprises dans les différents clans formés chez les glycosyles hydrolases.	8
Tableau II :	Liste des bactéries dont la production des α-L-arabinofuranosidases a été étudiée.	14
Tableau III :	Liste des champignons et des moisissures dont la production des α-L-arabinofuranosidases a été étudiée.	15
Tableau IV :	Liste des plantes dont la production des α-L-arabinofuranosidases a été étudiée.	16
Tableau V :	Différentes enzymes contenues dans les familles 43, 51, 54 et 62. ..	18
Tableau VI :	Applications des différentes enzymes xylanolytiques.	20

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Tableau VII :	Séquences des amorces utilisées dans les différents PCR.	32
Tableau VIII :	Programme d'élution utilisé lors de la chromatographie échangeuse de cations.	41

RÉSULTATS

Tableau IX :	Données recueillies sur les différentes analyses effectuées lors de la production d'AbfB₂ en milieu minimal M15.	61
Tableau X :	Données recueillies sur les différentes analyses effectuées lors de la production d'AbfB₂ en milieu minimal M14.	61
Tableau XI :	Différentes étapes nécessaires à la purification de l'enzyme AbfB₂ produite en fermenteur.	62
Tableau XII :	Peptides obtenus lors de la digestion théorique complète de l'AbfB₂ par la trypsine.	91
Tableau XIII :	Stœchiométrie de la réaction d'inactivation de l'AbfB₂ (5μM) lors du marquage radioactif avec le [¹⁴C] EAC.	99

Tableau XIV :	Stœchiométrie de la réaction d'inactivation de l'AbfB₂ (5μM) lors du marquage radioactif avec la [¹⁴C] glycine éthyle ester.	105
----------------------	--	------------

DISCUSSION

Tableau XV :	Séquences en acides aminés de différents peptides signaux retrouvés chez <i>Streptomyces lividans</i> montrant la séquence consensus nécessaire au clivage par la signal peptidase.	112
---------------------	---	------------

Tableau XVI :	Comparaison des différentes caractéristiques biochimiques de l'AbfB et de l'AbfB₂.	115
----------------------	---	------------

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1 :	Mécanisme d'inversion des glycosyles hydrolases.	9
Figure 2 :	Mécanisme de rétention des glycosyles hydrolases.	11
Figure 3 :	Les trois types de sites actifs identifiés chez les glycosyles hydrolases.	13
Figure 4 :	Séquence peptidique de l'AbfB de <i>Streptomyces lividans</i>	22

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Figure 5 :	Schéma illustrant la technique de mutagenèse dirigée par PCR. ..	33
------------	--	----

RÉSULTATS

Figure 6 :	Gels d'agarose montrant les différents fragments d'ADN amplifiés par PCR nécessaires à l'enlèvement du site de restriction <i>SphI</i> contenu dans le domaine catalytique de l'AbfB et à la création de la protéine chimère.	54
Figure 7 :	Gel d'agarose montrant la mutation du site de restriction <i>SphI</i> contenu dans le gène codant pour le domaine catalytique de l'AbfB.	56
Figure 8 :	Représentation du plasmide pIAF942.	57
Figure 9 :	Détection de la présence d'une enzyme capable de dégrader la molécule méthylumbelliféryle- α -L-arabinopyranoside (4-MUA) sur milieu minimal Stewart-4MUA (0,03% (p/v)).	58
Figure 10 :	Séquence d'ADN obtenue lors du séquençage du fragment d'ADN associé à la protéine chimère mutée qui a été sous-cloné dans le plasmide pIAFC109.	59
Figure 11 :	Gels SDS-PAGE 12,5% des différentes étapes nécessaires pour purifier l'enzyme AbfB ₂	63
Figure 12 :	Immunotransfert de type Western effectué à partir d'un SDS-PAGE 12,5% montrant le poids moléculaire de l'AbfB ₂	65

Figure 13 :	Spectre de masse de l'AbfB₂.	66
Figure 14 :	Focalisation isoélectrique sur un gel de polyacrylamide de l'AbfB₂.	68
Figure 15 :	Effet A) du pH et B) de la température sur l'activité enzymatique de l'AbfB₂.	69
Figure 16 :	Détermination du K_M et du V_{max} de l'AbfB₂.	71
Figure 17 :	Libération d'arabinose par l'AbfB₂ sur différents substrats.	72
Figure 18 :	Spectres de RMN-H¹ partiels de la région anomérique A) de l'arabinose libéré pendant l'hydrolyse de l'arabinoxylane de seigle (10 mg/mL) par l'AbfB₂ (12 μM) et B) d'une préparation de L(+)-arabinose.	74
Figure 19 :	HPAEC des produits de la réaction de l'hydrolyse A) de l'arabinane de blé 10 mg/mL et B) de l'arabinane de la betterave à sucre 10 mg/mL en présence de 2,5 M de méthanol par 30 mU d'arabinofuranosidase B d'<i>A. niger</i>.	76
Figure 20 :	HPAEC des produits de la réaction de l'hydrolyse A) de l'arabinane de blé 10 mg/mL et B) de l'arabinane de la betterave à sucre 10 mg/mL en présence de 2,5M de méthanol par 30 mU d'AbfB₂ de <i>S. lividans</i>.	77
Figure 21 :	Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EDC·HCl.	79
Figure 22 :	Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EAC.	80
Figure 23 :	Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EDC.	81
Figure 24 :	A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide de l'AbfB₂ ayant subi une inactivation à l'aide du carbodiimide EDC.	82
Figure 25 :	Spectre de masse de l'AbfB₂ ayant subi une inactivation par le carbodiimide EDC.	83
Figure 26 :	A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide de l'AbfB₂ ayant subi une amidation par la glycine	

	méthyle ester des groupements carboxyliques suite à une inactivation à l'aide du carbodiimide EDC.....	85
Figure 27 :	Spectre de masse de l'AbfB₂ ayant subi une amidation par la glycine méthyle ester des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC.....	87
Figure 28 :	Spectre de masse de l'AbfB₂ protégée par un oligosaccharide ayant subi une amidation par la glycine méthyle ester des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC. .	89
Figure 29 :	Spectre de masse des valeurs de m/z des peptides de l'AbfB₂ digérée par la trypsine.	95
Figure 30 :	A) Chromatogramme et B) spectres de masse obtenus suite à la digestion de l'AbfB₂ par la trypsine et à une chromatographie en phase liquide avec une colonne C₁₈.	97
Figure 31 :	A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) autoradiogramme de l'AbfB₂ et de la XlnA₂ marquées radioactivement par le [¹⁴] EAC.....	101
Figure 32 :	Chromatographies en phase inverse des peptides générés lors d'une digestion par la trypsine suite A) au marquage des résidus carboxyliques et B) au marquage des résidus catalytiques de l'AbfB₂ (5 μM) avec le [¹⁴C] EAC (2 mCi).	102
Figure 33 :	Chromatographie en phase inverse du [¹⁴C] EAC.....	104
Figure 34 :	A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) autoradiogramme de l'AbfB₂ marquée radioactivement par la [¹⁴] glycine éthyle ester.	106
Figure 35 :	Chromatographies en phase inverse A) des peptides générés lors d'une digestion par la trypsine suite au marquage des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec la [¹⁴C] glycine éthyle ester et B) de la [¹⁴C] glycine éthyle ester.	107
Figure 36 :	Schémas montrant la composition des substrats A) arabinane de la betterave à sucre (88% arabinose, 3% galactose, 2% rhamnose et 7% acide galacturonique) B) arabinoxylanes de seigle (49% arabinose et 51% xylose) et de blé (41% arabinose et 59% xylose).	116
Figure 37 :	Processus de tautomérisation et de mutarotation des résidus arabinofuranoses libérés lors de l'hydrolyse du substrat par une α-L-arabinofuranosidase.....	118

Figure 38 : **Stabilisation de la forme furanosidique de l'arabinose lors de l'hydrolyse du substrat par une α -L-arabinofuranosidase de rétention.** 120

Figure 39 : **Mécanisme par lequel les résidus carboxyliques d'une enzyme catalysent leur modification par les carbodiimides et les amines.** 122

DISCUSSION

Figure 40 : **Alignement de séquences primaires effectué avec les membres de la famille 62.** 131

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adénine
Å	angström(s)
AbfB	α -L-arabinofuranosidase B de <i>Streptomyces lividans</i> (enzyme)
AbfB ₂	domaine catalytique de l' α -L-arabinofuranosidase B de <i>Streptomyces lividans</i> (enzyme)
ADN	acide déoxyribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
C	cytosine
CM	groupement carboxyméthyle
cpm	comptes par minute
dNTP	déoxynucléotides triphosphate
Da	Dalton(s)
DPM	désintégrations par minute
EAC	1-éthyle-3(3-diméthyleaminopropyle)carbodiimide méthiodide
EDC	1-éthyle-3(3-diméthyleaminopropyle)carbodiimide
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
ESI	mode d'ionisation <i>electrospray</i> positif
FPLC	chromatographie liquide à performance rapide
G	guanine
<i>g</i>	unité gravitationnelle
GH	glycosyle hydrolase
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HPEAC	chromatographie à haute performance échangeuse d'anion
Hz	hertz(s)
IgG	immunoglobuline de type G
kDa	kiloDalton(s)

kpB	kilo paires de bases
K_M	constante de Michaelis-Menten
kPa	kilopascal(s)
kV	kilovolt(s)
LC	chromatographie liquide
mA	milliampère(s)
Mes	acide 4-Morpholineéthanesulfonique
MHz	méga hertz(s)
MS	spectromètre de masse
MUA	méthylumbélliféryle- α -L-arabinopyranoside
mV	millivolt(s)
m/z	valeur de la masse sur la charge
N	normale(s)
nC	nanocoulomb(s)
NTG	N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
OPA	one-phor-all
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAHBAH	acide <i>p</i> -aminohydroxybenzoïque hydrazine
pbs	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycole
pI	point isoélectrique
PMV	volume de mycélium compacte humide
pNPA	<i>p</i> -nitrophényle- α -L-arabinofuranoside
ppm	parties par million
p/p	poids/poids
p/v	poids/volume
PVDF	difluoride de polyvinylidène
RMN	résonance magnétique nucléaire
rpm	révolution par minute
SDS	sodium dodécyle sulphate

T	thymine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	Tris-Saline
TE	Tris-EDTA
TES	acide N-Tris (hydroxyméthyle) méthyle-2- aminoéthanesulfonique
TM	marque déposée
TFA	acide trifluoroacétique
Tris	tris(hydroxyméthyle)aminométhane
TSB	bouillon de tryptone de soya
U	unité(s)
UI	unité(s) internationale(s)
V	Volt(s)
V_{\max}	vitesse maximale de l'activité enzymatique en saturation de substrat
v/v	volume/volume
%	pourcentage

INTRODUCTION

La paroi primaire des cellules végétales est composée entre autre de fibres de cellulose et de fibres d'hétéroxylane. Dans l'environnement, plusieurs organismes tels les champignons et les bactéries dégradent ces composés. Les streptomycètes, qui sont des bactéries saprophytes du sol, libèrent des enzymes qui hydrolysent ces composés nécessaires à leur métabolisme. Parmi ces enzymes, certaines dégradent les différentes chaînes latérales associées à la chaîne principale de xylose. Entre autre, l'acétyl-xylane estérase libère des groupements acétyles et l' α -L-arabinofuranosidase B libère des résidus arabinoses. Ce débranchement permet un meilleur accès de la xylanase à la chaîne principale de xylose.

La plupart des enzymes impliquées dans la dégradation de l'hétéroxylane font partie des glycosyles hydrolases. Les glycosyles hydrolases ont la particularité d'hydrolyser les substrats soit par inversion ou par rétention de la configuration au niveau du carbone anomérique. De plus, les enzymes procèdent à l'hydrolyse du substrat à l'aide d'une diade composée de deux résidus carboxyliques.

Plusieurs organismes produisent des α -L-arabinofuranosidases. Différents rôles leur ont été attribués au cours des années. Par exemple, l'utilisation de cette enzyme pour le traitement des grains de céréales contenus dans la moulée animale afin d'augmenter la digestibilité des fibres végétales ou encore pour permettre la libération d'arômes lors de la fabrication du jus de raisin (Coughland et Hazlewood, 1993).

Ces enzymes ont été répertoriées dans les familles 43, 51, 54 et 62 des glycosyles hydrolases. Elles ont la propriété d'hydrolyser les liens α -L-1,2, α -L-1,3 et α -L-1,5-arabinofuranosyles substitués au xylane, au galactane et aux autres polysaccharides contenant des chaînes latérales d'arabinose (Kaneko et Kusakabe, 1995). La stéréochimie des α -L-arabinofuranosidases n'est pas encore bien connue. Il a été déterminé expérimentalement que les enzymes des familles 51 et 54 possédaient un mécanisme de rétention et que celles de la famille 43 possédaient un mécanisme d'inversion. Cependant, aucun résidu catalytique n'a été identifié expérimentalement. De plus, la structure en trois dimensions de ces enzymes n'a pas encore été révélée.

L' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces lividans* fait partie de la famille 62 des glycosyles hydrolases qui, avec les enzymes de la famille 43, compose le clan GH-F. Cette dernière a la particularité d'hydrolyser les liens α -L-1,2 et α -L-1,3 arabinofuranosyles situés sur les xylanes d'avoine, de seigle et de blé, ainsi que sur l'arabinane de la betterave à sucre (Vincent *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action de la famille 62 et les résidus catalytiques des membres de cette famille sont inconnus. L' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces lividans* est donc un excellent modèle d'étude pour cette famille. Ainsi, les conclusions qui auront été tirées pourront s'appliquer aux autres membres de la famille.

Un des objectifs de ce projet est de déterminer le mécanisme d'action de l' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces lividans* en identifiant l'anomère produit suite à l'hydrolyse du substrat. Les techniques de résonance magnétique nucléaire et de HPLC seront préconisées. L'autre objectif consiste à identifier les deux résidus catalytiques par modification chimique. Un carbodiimide spécifique pour les résidus carboxyliques sera utilisé.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. GLYCOSYLES HYDROLASES

1.1 Généralités

Les hydrates de carbone peuvent s'assembler en différentes combinaisons ce qui augmente par le fait même leur diversité fonctionnelle et structurelle. Les organismes vivants prennent avantage de cette diversité en utilisant les oligosaccharides et les polysaccharides pour diverses fonctions biologiques. En effet, l'hydrolyse sélective des liens glycosidiques est importante pour l'assimilation des sucres qui serviront à la formation d'énergie, pour la défense contre les pathogènes, pour la pénétration de certains pathogènes dans les cellules ou encore pour l'hydrolyse des polysaccharides (Henrissat, 1991). Les enzymes impliquées dans le processus d'hydrolyse des liens glycosidiques des sucres se nomment glycosyles hydrolases. La variété de ces glycosyles hydrolases est énorme vu le répertoire élevé de combinaisons saccharidiques. Ces protéines sont produites par le règne des archaebactéries, eubactéries et eucaryotes (Henrissat, 1991). Comme ces enzymes possèdent un rôle important dans plusieurs processus biologiques, elles sont très étudiées dans le domaine de la biochimie, de la médecine et de la biotechnologie. Elles sont utilisées, par exemple, pour le traitement de la nourriture (utilisation de l'invertase pour la production de sucres invertis, de la β -galactosidase pour l'hydrolyse du lactose), pour le bio-dé lavage des denims (cellulases) et pour le bio-blanchiment du papier (xylanases) (Withers et Aebersold, 1995). Elles peuvent aussi être utiles pour le traitement du cancer, du diabète, de l'obésité, du sida et de certaines infections virales (Hughes et Rudge, 1994).

1.2 Classification

De plus en plus de glycosyles hydrolases sont découvertes et répertoriées. Il est donc devenu nécessaire de les regrouper selon leurs particularités. Plusieurs systèmes de classification ont été élaborés pour regrouper les glycosyles hydrolases. La classification

peut être basée selon la spécificité au substrat, le mode d'action, la séquence primaire ou encore la structure en trois dimensions (Henrissat et Davies, 1997). La plus simple et la plus utilisée des classifications est celle basée sur la spécificité du substrat (Classification E.C. pour Enzyme Commission) qui est recommandée par l'International Union of Biochemistry and Molecular Biology (I.U.B.M.B.). Cependant, ce type de classification devient ambigu lorsqu'une enzyme possède une spécificité pour différents substrats. Les endoglucanases, par exemple, qui sont considérées comme des cellulases (E.C. 3.2.1.4), sont actives à différents degrés sur le xylane, le xyloglucane, le β -glucane et sur différents substrats artificiels (Henrissat et Davies, 1997). De plus, cette classification ne reflète pas les propriétés structurales des enzymes.

On peut aussi distinguer les différentes glycosyles hydrolases par la façon dont elles attaquent le substrat. En effet, certaines enzymes sont dites «exo» puisqu'elles peuvent attaquer les extrémités du polysaccharide, alors que d'autres appelées «endo» peuvent attaquer l'intérieur de la chaîne de polymère (Henrissat et Davies, 1997). Cette méthode de classification semble très efficace en théorie, mais en pratique, elle est plus ambiguë puisque plusieurs enzymes, par exemple les cellobiohydrolases, sont classées comme étant des «exo» alors qu'en réalité elles permettent la libération de disaccharides.

Une nouvelle façon de classer les glycosyles hydrolases a été proposée par Henrissat en 1991. Il s'agit de rassembler en familles les protéines en fonction de leur similarité de séquences en acides aminés. Une famille est définie lorsque au moins deux séquences primaires sont similaires et lorsque celles-ci ne sont pas similaires à d'autres séquences de familles différentes (Henrissat et Romeu, 1995). De plus, les enzymes faisant partie d'une même famille possèdent le même mécanisme de réaction. Jusqu'à ce jour, 70 familles ont été créées. Certaines de ces familles sont dites monospécifiques, puisqu'elles regroupent des enzymes qui agissent sur le même substrat (ex : famille 62→E.C. 3.2.1.55), alors que d'autres sont dites polyspécifiques puisque leurs membres agissent sur des substrats différents (ex : famille 43→E.C. 3.2.1.37 et E.C. 3.2.1.55).

À partir de 1995, ces familles ont été regroupées en clan en fonction de leur similarité de structure. Ainsi, des familles n'ayant entre elles aucune similarité de séquences en acides aminés ont pu être rassemblées dans un même clan à l'aide de la technique d'analyse des amas hydrophobes (Gaboriaud *et al.*, 1987). Cette dernière est très utile puisque le nombre de protéines ayant une structure en trois dimensions connue est peu élevé. L'analyse des amas hydrophobes est basée sur une prédiction de la structure en deux dimensions des protéines. Selon cette théorie, suite à la formation du peptide par le ribosome, ce dernier prendrait tout de suite une conformation bidimensionnelle en hélice α avant d'adopter sa conformation native. Cependant, cette affirmation n'a pas été prouvée expérimentalement. Ces hélices sont par la suite coupées virtuellement le long de leur axe et linéarisées pour en faciliter l'analyse (Henrissat *et al.*, 1995). Les acides aminés hydrophobes sont identifiés et les différents amas sont comparés d'une séquence à l'autre. Les membres d'un même clan possèdent donc une structure en trois dimensions semblable ou encore un même profil d'amas hydrophobes et un mécanisme de réaction identique. Dix clans ont jusqu'à maintenant été créés (Tableau I). Cette classification est avantageuse puisque l'obtention de résultats au niveau structurel et mécanistique d'un membre peuvent s'appliquer aux autres membres du clan.

1.3 Mécanismes d'action

Les glycosyles hydrolases catalysent l'hydrolyse des liens glycosidiques à l'aide de deux mécanismes différents : soit par rétention ou par inversion. La stéréochimie seule ne constitue pas une méthode de classification, mais elle révèle des informations essentielles au sujet de la catalyse. Bien que ces deux mécanismes soient distincts, ils possèdent un grand nombre de similarités. En effet, les deux passent par un état de transition à caractère oxocarbone et dans les deux cas, une paire d'acides carboxyliques joue le rôle de résidus catalytiques (Lawson *et al.*, 1996). Les acides aminés responsables de la catalyse sont donc un acide aspartique et/ou glutamique. Chez les enzymes utilisant le déplacement simple (SN_1 , substitution nucléophile à une étape), un des résidus catalytiques fonctionne comme acide et l'autre comme base (Figure 1). De plus, la distance moyenne entre les deux résidus est d'environ 10Å de manière à

Tableau I : Liste des familles comprises dans les différents clans formés chez les glycosyles hydrolases.

CLANS	FAMILLES
GH-A	1,2,5,10,17,26,30,35,39,42,51,53
GH-B	7,16
GH-C	11,12
GH-D	27,36
GH-E	33,34
GH-F	43,62
GH-G	37,63
GH-H	13,70
GH-I	24,46
GH-J	32,68

(http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_table.html)

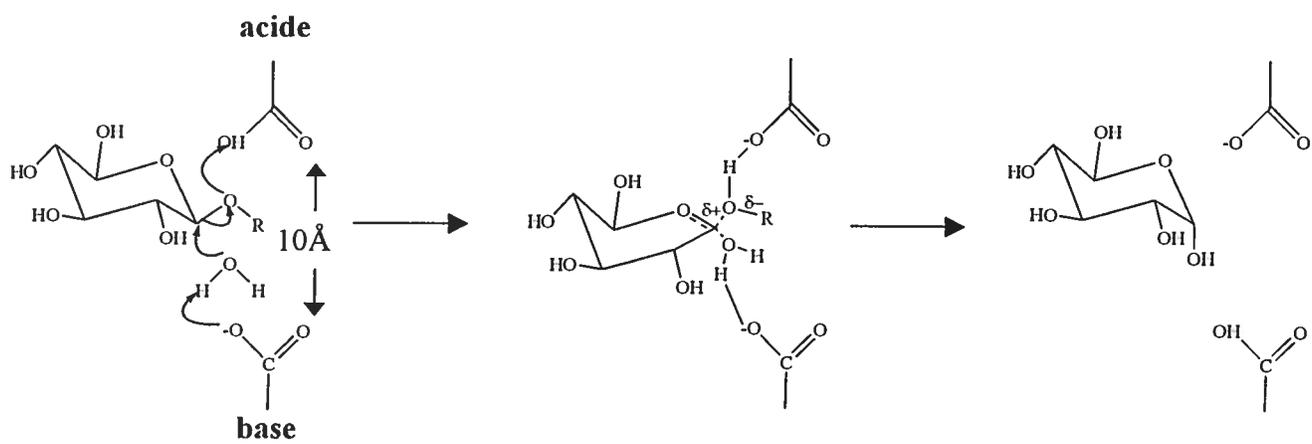


Figure 1 : Mécanisme d'inversion des glycosyles hydrolases. (Adaptée de Lawson, Wakarchuk et Withers, 1996)

accommoder une molécule d'eau (Lawson *et al.*, 1996). Dans ce mécanisme d'inversion, la molécule d'eau effectue un déplacement direct du groupement glycosidique provenant du centre anomérique. L'acide aminé agissant comme base aide à arracher un proton à la molécule d'eau nucléophile et l'acide aminé agissant comme acide ajoute un proton à l'atome d'oxygène dépourvu lors de la coupure du substrat (Withers et Aebersold, 1995). Le résidu formé possède donc une conformation anomérique inverse par rapport au résidu glycosidique coupé. Par contre, chez les mécanismes de type SN_2 (substitution nucléophile bimoléculaire), un des résidus catalytiques fonctionne comme acide/base et l'autre comme nucléophile (Figure 2). Le mécanisme de rétention est effectué par un déplacement double dans lequel un intermédiaire covalent est formé. Lors du premier déplacement, un des résidus agit comme nucléophile. Il attaque le carbone anomérique du substrat pour déplacer le groupe partant et former un intermédiaire covalent. L'autre résidu joue le rôle d'un catalyseur acide/base, il assiste à la formation de cet intermédiaire en donnant un proton au groupe partant. Dans la seconde étape d'hydrolyse, ce résidu fonctionne comme une base et enlève un proton à la molécule d'eau tandis que le groupement hydroxyle est transféré au carbone anomérique formant ainsi un nouveau sucre réducteur ayant la configuration de départ (White et Rose, 1997). Comparativement au mécanisme d'inversion, les résidus catalytiques sont positionnés à 5,5Å l'un de l'autre.

1.4 Topologie du site actif

Le repliement de plusieurs protéines a été visualisé à l'aide de la cristallographie. On ne connaît cependant pas la structure en trois dimensions de toutes les protéines classifiées chez les glycolyles hydrolases, mais trois topologies différentes ont pu être identifiées. Tout d'abord, la topologie «poche» ou «cratère» est parfaite pour la reconnaissance des extrémités non réductrices des saccharides. Elle est rencontrée chez les monosaccharidases (β -galactosidase, β -glucosidase, sialidase et neuraminidase) et chez les exopolysaccharidases (glucoamylase, β -amylase). Ces exopolysaccharidases sont adaptées pour des substrats ayant une grande quantité de chaînes terminales disponibles pouvant, par exemple, provenir des jeunes granules d'amidon. Ainsi, leur

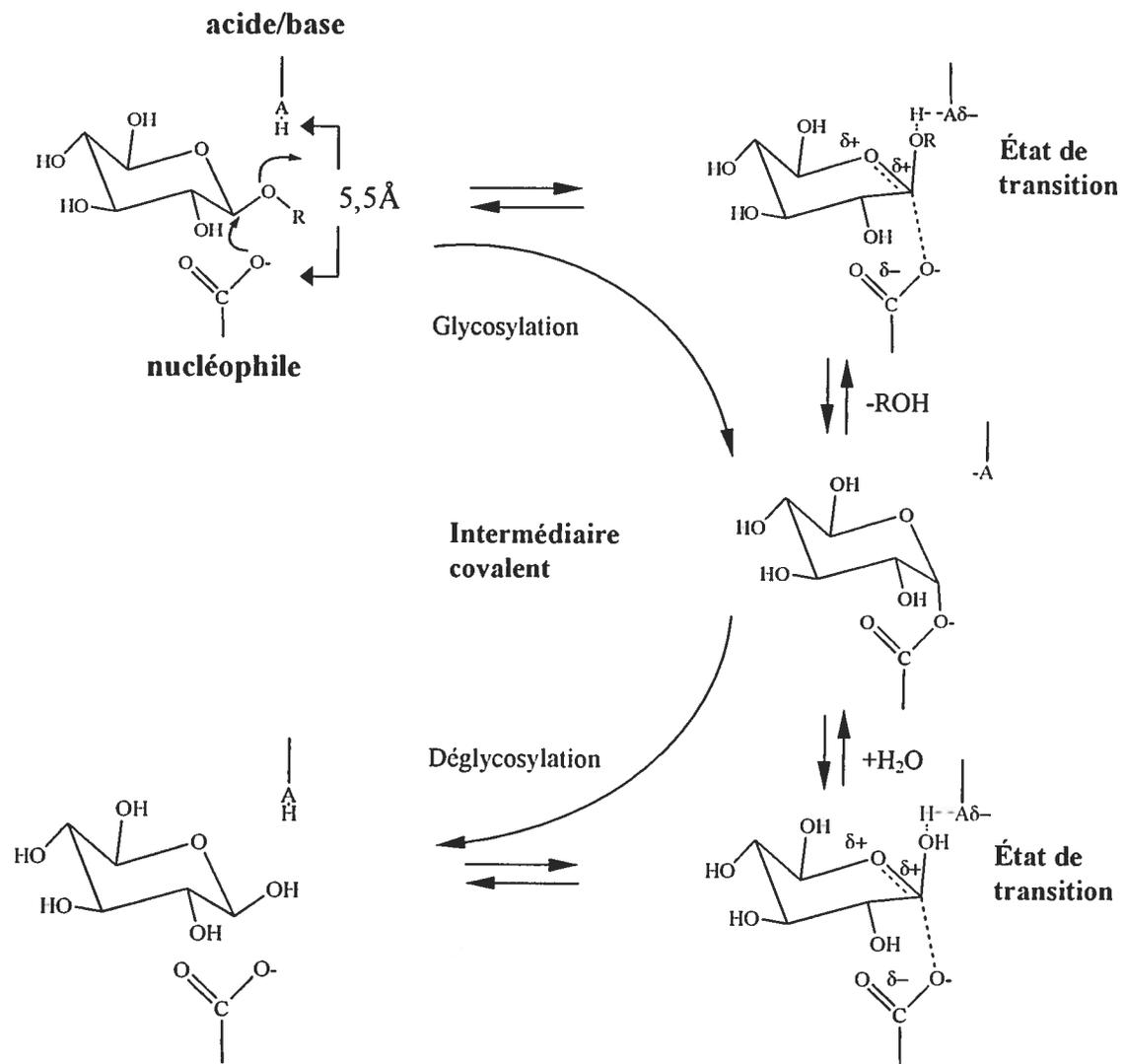


Figure 2 : Mécanisme de rétention des glycosyles hydrolases. (Adaptée de Lawson, Wakarchuk et Withers, 1996)

structure radiale dévoile toutes les extrémités terminales des chaînes non réductrices à la surface. Quant aux monosaccharidases, ce sont des enzymes qui permettent la libération de monosaccharides. Ces enzymes ne sont pas très efficaces pour les substrats fibreux comme la cellulose qui n'a pas beaucoup de chaînes terminales libres (Davies et Henrissat, 1995) (Figure 3a). De son côté, la structure ouverte appelée «clé» ou «sillon» permet la liaison de plusieurs unités de sucres de substrats polymériques. Elle est présente chez les polysaccharides de type «endo» comme les lysozymes, endocellulases, chitinases et xylanases (Davies et Henrissat, 1995) (Figure 3b). La topologie «tunnel» résulte de la précédente, cependant la protéine impliquée possède une boucle qui couvre une partie de la clé. Trouvée seulement chez les cellobiohydrolases, le tunnel permet à la chaîne de cellulose de passer à travers elle. Cette topologie permet à l'enzyme de relâcher le produit alors qu'elle demeure fermement liée à la chaîne de polysaccharides créant des conditions de processivité. La processivité étant probablement la façon dont se fait la dégradation de la cellulose microcristalline insoluble (Davies et Henrissat, 1995) (Figure 3c).

2. LES α -L-ARABINOFURANOSIDASES

2.1 Généralités

Plusieurs α -L-arabinofuranosidases ont été isolées des bactéries (Tableau II), des champignons (Tableau III) et des plantes (Tableau IV). Ces enzymes sont la plupart du temps retrouvées sous forme de monomères, mais des structures dimériques, tétramériques, hexamérique et octamériques ont été identifiées. Celles-ci peuvent avoir des masses moléculaires aussi élevées que 495 kDa et leur pI peut se situer entre 2,5 et 9,3 (Coughland et Hazlewood, 1993). Les arabinofuranosidases sont distinguées des autres enzymes par leur capacité à couper les résidus L-arabinosyles associés aux structures principales des arabinanes, arabinoxylanes et arabinogalactanes (Kaneko et Kusakabe, 1995). En effet, les arabinanes possèdent comme structure principale des résidus β -1,5-arabinofuranoses auxquels peuvent être associés des résidus arabinoses par

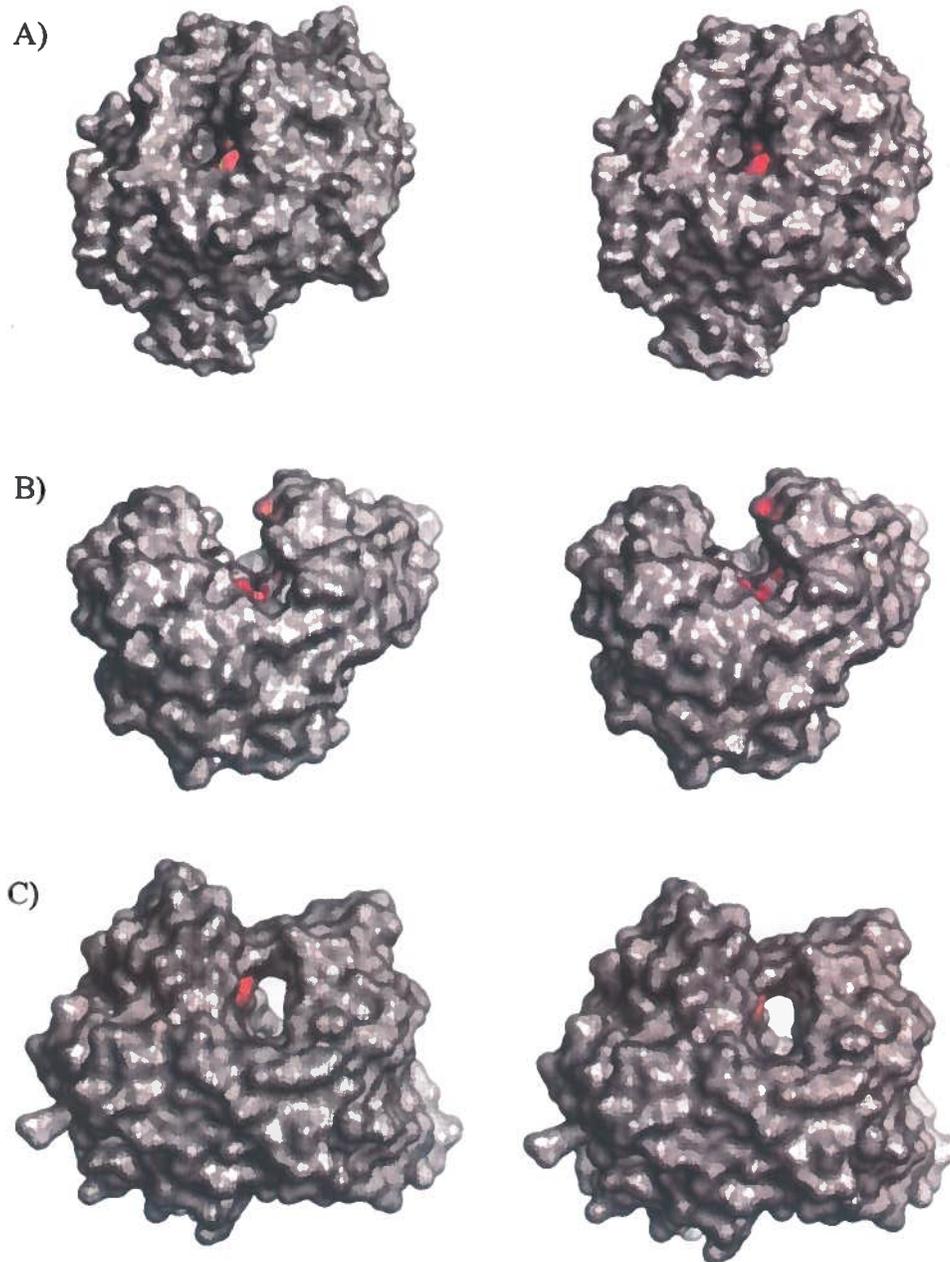


Figure 3 : Les trois types de sites actifs identifiés chez les glycosyles hydrolases. La « poche » ou « cratère » (glucoamylase de *Aspergillus awamori*). (b) La « clef » (endoglucanase E2 de *Thermomonospora fusca*). (c) Le « tunnel » (cellobiohydrolase II de *Trichoderma reesei*). Chaque enzyme est représentée par des paires stéréoscopiques et ses résidus catalytiques sont identifiés en rouge. (Tiré de Davies et Henrissat, 1995)

Tableau II : Liste des bactéries dont la production des α -L-arabinofuranosidases a été étudiée.

Microorganismes	Références
<i>Bacillus polymyxa</i>	Morales <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacillus sp.</i>	Karimi et Ward (1989)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6	Gilead et Shoham (1995)
<i>Bacillus subtilis</i> 3-6	Kaneko et Kusakabe (1995)
<i>Bacteroides ovatus</i>	Http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt
<i>Bacteroides xylanolyticus</i> X5-1	Schyns <i>et al.</i> (1994)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Utt <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Lee et Forsberg (1987)
<i>Clostridium stercorarium</i>	Schwarz <i>et al.</i> (1995)
<i>Cytophaga xylanolytica</i>	Kim <i>et al.</i> (1998)
<i>Prevotella ruminicola</i> B(1)4	Gasparic <i>et al.</i> (1995)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> subst. <i>Cellulosa</i>	Kellett <i>et al.</i> (1990)
<i>Ruminococcus albus</i> 8	Greve <i>et al.</i> (1984)
<i>Streptomyces diastaticus</i>	Tajana <i>et al.</i> (1992)
<i>Streptomyces lividans</i> 66	Manin <i>et al.</i> (1994)
<i>Streptomyces massasporus</i>	Kaji (1984)
<i>Streptomyces purpurascens</i> IFO 3389	Komae <i>et al.</i> (1982)
<i>Streptomyces sp.</i>	Kaji <i>et al.</i> (1981)
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Sinha et Sengupta (1995)
<i>Thermomonospora fusca</i>	Bachmann et McCarthy (1991)

Tableau III : Liste des champignons et des moisissures dont la production des α -L-arabinofuranosidases a été étudiée.

Microorganismes	Références
<i>Aspergillus awamori</i>	Wood <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Fernandezespinar <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus niger</i>	Crous <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus sojae</i>	Kimura <i>et al.</i> (1995)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Saha et Bothast (1998)
<i>Corticium rolfsii</i>	Kaji <i>et al.</i> (1970)
<i>Dichomitus squalens</i>	Brillouet <i>et al.</i> (1985)
<i>Geotrichum-candidatum-3C</i>	Gobulev <i>et al.</i> (1993)
<i>Monilinia fructigena</i>	Axamawaty <i>et al.</i> (1990)
<i>Penicillium capsulatum</i>	Filho <i>et al.</i> (1996)
<i>Rhodotorula flava</i> (levure)	Uesaka <i>et al.</i> (1978)
<i>Schizophyllum commune</i>	Http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt
<i>Sclerotinia fructigena</i>	Laborda <i>et al.</i> (1973)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Roche <i>et al.</i> (1994)
<i>Trichoderma reesei</i>	Margolles-Clark <i>et al.</i> (1996)

Tableau IV : Liste des plantes dont la production des α -L-arabinofuranosidases a été étudiée.

Organismes	Références
Feuilles d'épinards	Hirano <i>et al.</i> (1994)
Fèves de soya germées	Hatakana <i>et al.</i> (1991)
<i>Lupinus luteus</i>	Matheson et Saini (1977)
<i>Scopolia japonica</i>	Tanaka et Uchida (1978)

des liens α -1,2 et α -1,3 (Aspinal, 1980). Quant aux arabinoxylyanes, leur chaîne principale est constituée de résidus β -1,4-xylopyranosyles. Cette structure peut posséder comme chaînes secondaires des résidus α -L-arabinofuranosyles aux positions α -1,2 et α -1,3 (Aspinal, 1980). Les α -L-arabinofuranosidases ont pour rôle d'hydrolyser les résidus α -L-1,2, α -L-1,3 et α -L-1,5 arabinofuranosyles présents dans les bois mous et les graminées. Ces enzymes peuvent aussi avoir la capacité d'hydrolyser des substrats synthétiques comme le *p*-nitrophényle α -L-arabinofuranoside (pNPA) et le méthylumbelliféryle α -L-arabinofuranoside (MUA). Cependant, ce ne sont pas toutes les arabinofuranosidases qui ont la capacité d'hydrolyser tous ces substrats. En effet, l'arabinofuranosidase de la bactérie *Butyrivibrio fibrisolvens* relâche des arabinoses de beaucoup de substrats, incluant le pNPA, l'arabinane, l'arabinoxylyane et l'arabinoxylobiose. Elle est cependant inactive chez les arabinogalactane et les coumaroyle ou feryloyle arabinoxylobiose (Hespell et O'Bryan, 1992).

2.2 Classification

Comme il a été mentionné précédemment, la classification des glycosyles hydrolases peut se faire de plusieurs façons. Dans la classification basée sur la spécificité au substrat, on a attribué aux α -L-arabinofuranosidases le code 3.2.1.55 puisqu'elles hydrolysent (3.-.-) les liens *O*-glycosyles (3.2.1-) ce qui permet la libération

d'arabinoses (3.2.1.55). De plus, selon la classification de Henrissat, qui se base sur la séquence primaire de l'enzyme et sur le mécanisme de réaction, les α -L-arabinofuranosidases se retrouvent dans les familles 43, 51, 54 et 62 (Tableau V). Puisque le mécanisme de réaction n'est pas encore connu pour toutes ces enzymes, il est quelquefois impossible de les répertorier en fonction de celui-ci. Donc, la famille 43 possède un mécanisme d'inversion et fait partie du clan GH-F, la famille 51 possède un mécanisme de rétention et fait partie du clan GH-A, la famille 54 possède aussi un mécanisme de rétention et ne fait partie d'aucun clan jusqu'à maintenant, alors que la famille 62 fait partie du clan GH-F. Il a été démontré tout récemment, avec la découverte de la séquence nucléotidique de l'ArfB de *Clostridium stercoarium*, que les arabinofuranosidases de la famille 51 faisait bien partie du clan GH-A (Zverlov *et al.*, 1998). En effet, les alignements de séquences et l'analyse des amas hydrophobes ont révélé la présence de régions conservées munies de résidus catalytiques permettant la coupure des liens par un mécanisme de rétention. De plus, l'analyse a permis de supposer comme topologie générale, la structure de type $(\beta/\alpha)_8$ où les résidus d'acides glutamiques sont localisés aux extrémités C-terminales des feuillets β 4 et 7 (Zverlov *et al.*, 1998).

2.3 Applications

Puisque l'utilisation de l'arabinofuranosidase permet l'augmentation de la production d'oligosaccharides en combinaison avec certaines xylanases, il serait peut-être possible d'utiliser cette propriété pour augmenter le bio-blanchiment de la pâte à papier (Coughland et Hazlewood, 1993). Selon les mêmes auteurs, les arabinofuranosidases utilisées en concomitance avec d'autres enzymes xylanolytiques pourraient avoir plusieurs applications. (Tableau VI)

De plus, les arabinofuranosidases pourraient aussi être utilisées dans un nouveau traitement pour combattre le cancer. En effet, l'utilisation d'enzymes exogènes dépendants du pH en combinaison avec une prodrogue a été investiguée (Butschak *et al.*, 1990). La molécule chimique nécessaire pour l'inhibition de la mitose est associée à un

Tableau V : Différentes enzymes contenues dans les familles 43, 51, 54 et 62.

FAMILLES	ENZYMES	BACTÉRIES	E.C.
43	Endo-arabinase A	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.99
	Xylanase D	<i>Bacillus polymyxa</i>	3.2.1.8
	β -xylosidase	<i>Bacillus pumilus</i> souche IPO	3.2.1.37
	β -xylosidase XynB	<i>Bacillus pumilus</i> souche PLS	3.2.1.37
	β -xylosidase	<i>Bacillus sp. K-17</i>	3.2.1.37
	β -xylosidase	<i>Bacillus sp. KK-1</i>	3.2.1.37
	Endo-arabinase	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.99
	ORF	<i>Bacillus subtilis</i>	n.d.
	ORF AbnA	<i>Bacillus subtilis</i>	n.d.
	ORF XynB	<i>Bacillus subtilis</i>	n.d.
	ORF XynD	<i>Bacillus subtilis</i>	n.d.
	β -xylosidase /arabinofuranosidase	<i>Bacteroides ovatus</i>	3.2.1.37 3.2.1.55
	Arabinosidase	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	3.2.1.55
	β -xylosidase /arabinofuranosidase	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	3.2.1.37 3.2.1.55
	β -xylosidase /arabinofuranosidase	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	3.2.1.37 3.2.1.55
	β -xylosidase /arabinofuranosidase	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	3.2.1.37 3.2.1.55
	XynC (protéine à domaines multiples)	<i>Caldicellulosiruptor sp. Rt69B.1</i>	3.2.1.8
	β -xylosidase /arabinofuranosidase	<i>Clostridium stercorarium</i>	3.2.1.37 3.2.1.55
	β -xylosidase	<i>Cochliobolus carbonum</i>	3.2.1.37
	β -xylosidase hypothétique	<i>Escherichia coli</i>	n.d.
	β -xylosidase xynB	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	3.2.1.37
	β -xylosidase	<i>Prevotella ruminicola</i>	3.2.1.37
	Arabinanase A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2.1.55 3.2.1.99

Tableau V (Suite) : Différentes enzymes contenues dans les familles 43, 51, 54 et 62.

43	β -xylosidase	<i>Selenomonas</i>	3.2.1.37
	/arabinofuranosidase	<i>ruminantium GA192</i>	3.2.1.55
	Protéine CRG1	<i>Ustilago maydis</i>	n.d.
51	Arabinofuranosidase A	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase Abj A	<i>Bacillus sp. D3</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase 1	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase 2	<i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.55
	Arabinosidase 1	<i>Bacteroides ovatus</i>	3.2.1.55
	Arabinosidase 2	<i>Bacteroides ovatus</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase	<i>Clostridium stercorarium</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase I	<i>Cytophaga xylanotylica</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase II	<i>Cytophaga xylanotylica</i>	3.2.1.55
	Endoglucanase F	<i>Fibrobacter succinogenes S85</i>	3.2.1.4
54	ORF SCI35.05c	<i>Streptomyces coelicolor</i>	n.d.
	Arabinofuranosidase A	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase 2	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase B	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase	<i>Emericella nidulans</i>	3.2.1.55
	ORF AbfB	<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	n.d.
	Arabinofuranosidase /xylanase	<i>Trichoderma koningii</i>	3.2.1.55 3.2.1.8
62	Arabinofuranosidase AxA	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase AxA	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase AxA	<i>Aspergillus tubingensis</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase B (AbfB)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	3.2.1.55
	Arabinofuranosidase B	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.55

(Henrissat (1991), Henrissat et Bairoch (1993), Henrissat et Bairoch (1996), Davies et Henrissat (1995))

Tableau VI : Applications des différentes enzymes xylanolytiques.

Applications
-Détermination de la structure de différents xylanes
-Extraction de jus, saveurs, épices, huiles ou pigments
-Clarification du jus et du vin
-Production de xylane modifié comme agent pour la transformation de la nourriture
-Transformation du xylane en monomères pour la conversion en saccharines et en saveurs
-Modification de la farine de céréale pour augmenter le volume, la texture et la fraîcheur du pain
-Amélioration des qualités nutritionnelles des nourritures à base d'ensilage, de blé et de seigle pour le bétail, les cochons et les poulets
-Rouissage du lin, du chanvre, de la jute, de l'agave et du liber
-Raffinement de la pulpe dégradée pour la production de viscosse, d'esters de cellulose et d'éthers de cellulose
-Saccharification des déchets et des résidus agricoles et forestiers pour leur fermentation en carburant
-Blanchiment de la pâte à papier

(Coughland et Hazlewood, 1993)

glycoside. Le composé chimique serait activé lorsque séparé du glycoside par l'enzyme exogène. Cette réaction aurait lieu seulement dans la tumeur puisque le pH est moins élevé qu'au niveau des autres cellules permettant ainsi l'activation de l'arabinofuranosidase. L'ajout de glucose pourrait aussi augmenter l'activité de l'enzyme (Butschak *et al.*, 1990).

De plus, l'addition d'arabinofuranosidases au jus de raisin pourraient permettre la libération d'arômes. En effet, le raisin contient des glycosides terpéniques qui sont des précurseurs de la classe des terpénols. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la typicité des vins, mais ne sont pas formés puisque le raisin ne possède pas les enzymes nécessaires à la conversion des glycosides terpéniques en terpènes. Il semblerait que les arabinofuranosidases produites par les plantes et les microorganismes permettraient la

formation de terpénols en combinaison avec d'autres enzymes comme l' α -rhamnopyranosidase et la β -glucosidase lorsque ajouté à la préparation. Cette nouvelle technique est avantageuse puisqu'elle remplace les composés chimiques qui sont parfois ajoutés pour rehausser l'arôme des vins.

3. L' α -L-ARABINOFURANOSIDASE B DE *STREPTOMYCES LIVIDANS*

3.1 Généralité

L' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces lividans* (AbfB) a un poids moléculaire de 46 kDa et possède deux domaines (Vincent *et al.*, 1997). En effet, la structure modulaire de l'AbfB consiste en un domaine de fixation au substrat situé à l'extrémité N-terminale et relié par une région charnière à un domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale (Figure 4). La région charnière est riche en acides aminés contenant des groupements hydroxyles et donne une flexibilité à la protéine facilitant ainsi l'hydrolyse du substrat insoluble (Coughland et Hazlewood, 1993). Il semblerait que le domaine de fixation au substrat ne soit pas essentiel pour l'hydrolyse des polysaccharides.

L'AbfB est spécifique pour le débranchement des arabinofuranoses situés sur le xylane des *Gramineae* soit l'avoine, le seigle et le blé en position α -L-1,2 et α -L-1,3. Elle permet aussi la libération des arabinoses de l'arabinane de la betterave à sucre. En combinaison avec la xylanase A ou la xylanase C, on observe une augmentation impressionnante de la production d'oligosaccharides à partir du xylane de la farine de blé. Aucune hydrolyse n'a été observée pour les arabino-galactanes et les α -L-1,5-arabinanes de bouleau et de mélèze. L'enzyme n'a aussi qu'une faible activité envers des substrats synthétiques comme le pNPA et le MUA souvent utilisés pour la détection d'une activité enzymatique (Vincent *et al.*, 1997).

MHRGSLSRGQHVRGTRRRGAALAAALLVATAPAQAAGSGALRGAGSNRCLDVLGGSQDDGALLQLYDCW
 GGTNQQTSTDTGRLTVYGDKCLDVPGHATAPGTRVQIWSCSGGRNQQRVNSDGTVVGVESGLCLEAAGA
 GTPNGTAVGLWTCNNGGGNGKWTGLTGTPTDGTALPSTYRWSSTGVLAQPKSGWVALKDFTTVTHNGRHL
 VYGSTSSGSSYGSVMFSPFTNWSMASAGQONAMNQAAVAPTLFYFAPKNIWVLAYQWGSWPFIYRTSSDPT
 DPNGWSAPQPLFTGSI SGSDTGPIDQTLIADGQNMYLEFFAGDNGKIYRASMPIGNFPGNFGSSYTTIMSDT
 KANLFEQVQVYKVQGGQNYLMI VEAMGANGRYFRSFTASSLSGSWTPQAASEGNPFAGKANS GATWTNDIS
 HGD LVRDNPQTM TVDPCNLQFLYQGKSPNAGGDYNSLPWRPGVLT LRH

Figure 4 : Séquence peptidique de l'AbfB de *Streptomyces lividans*. La séquence en acides aminés du peptide signal est soulignée et en caractère gras. La séquence du domaine de fixation au substrat est représentée par la section en non gras, alors que la séquence du domaine catalytique est représentée par la partie en caractère gras.

L'AbfB a été classée dans la famille 62 (Tableau V) des glycosyles hydrolases. Son mécanisme d'action et ses résidus catalytiques n'ont pas encore été déterminés et aucune de ces caractéristiques n'est disponible pour les autres membres de la famille. Cependant, la famille 62 ainsi que la famille 43 font partie du clan GH-F et il a été démontré que la β -xylosidase/arabinofuranosidase de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Braun *et al.*, 1993), les endo-arabinanases d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus aculeatus* (Pitson *et al.*, 1993) de cette dernière famille possédaient un mécanisme d'inversion ; ce qui suggère le même mécanisme pour la famille 62.

4. APPROCHES POUR LA DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION

Plusieurs techniques existent pour déterminer le mécanisme impliqué dans la réaction des glycosyles hydrolases. Chacune de ces techniques possède ses forces et ses faiblesses. Cependant, elles doivent permettre de déterminer la position de l'hydrogène associé au carbone anomérique avant que la mutarotation se produise. La première méthode utilise la rotation optique (Nelson et Larner, 1970). Avec cette méthode, il est

possible d'identifier l'anomère préalablement formé puisque l'anomère α rotationne différemment de l'anomère β dans le plan de polarisation de la lumière. Cette méthode est cependant indirecte et l'information obtenue est quelquefois questionnable. Une autre procédure souvent utilisée fait appel à la chromatographie en phase liquide-gazeuse. Cette méthode utilise des produits qui sont initialement triméthylsilylés. Cette dernière peut être utilisée seulement pour des monosaccharides. La résonance magnétique nucléaire est grandement utilisée pour étudier la stéréochimie des produits libérés (Liu *et al.*, 1991 et Withers *et al.*, 1986). Cette méthode est rapide et elle permet une observation directe de l'anomère libéré, pour ces raisons elle est préférée aux précédentes. La dernière méthode permet de séparer les anomères d'oligosaccharides par la méthode HPLC. Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter la dérivation des produits libérés (Braun *et al.*, 1993). Ces deux dernières méthodes ont d'ailleurs permis d'étudier la stéréochimie d'hydrolyse de certains membres des familles de glycosyles hydrolases 43, 51 et 54. Les analyses par résonance magnétique nucléaire ont pu démontrer que les endo-(1 \rightarrow 5)- α -L-arabinanases d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus aculeatus* hydrolysaient l'arabinane linéaire avec un mécanisme d'inversion (Pitson *et al.*, 1996). Le mécanisme d'action des arabinofuranosidases d'*Aspergillus niger* et de *Bacillus subtilis* faisant partie des familles 51 et 54 a été déterminé par résonance magnétique nucléaire et par chromatographie à haute performance échangeuse d'anion (Pitson *et al.*, 1996).

5. APPROCHES POUR L'IDENTIFICATION DES RÉSIDUS CATALYTIQUES CHEZ LES GLYCOSYLES HYDROLASES

Il existe plusieurs méthodes pour permettre l'identification des acides aminés impliqués dans les mécanismes de réaction. Ainsi, avec l'augmentation des séquences peptidiques disponibles et leur classification dans des groupes de protéines homologues, l'alignement de ces séquences est devenu très utile. Une fois les séquences en acides aminés d'un groupe de protéines homologues alignées, leurs résidus acides conservés sont analysés (Withers et Aebersold, 1995). Cette méthode permet la suggestion des résidus catalytiques, mais elle n'est pas optimale puisque dans la plupart des cas, une

grande quantité de résidus glutamates et aspartates sont observés et non impliqués dans le mécanisme de réaction. Cependant, la mutagenèse dirigée vient compléter cette méthode ce qui permet de déterminer le rôle des résidus susceptibles d'être impliqués dans ce mécanisme.

L'identification des acides aminés impliqués dans le site actif peut aussi se faire avec l'étude de la structure en trois dimensions. La détermination de la structure du complexe enzyme/substrat ou du complexe enzyme/inhibiteur est nécessaire pour identifier ces résidus puisque ceux-ci deviennent apparents lorsque la protéine est associée à une molécule (Withers et Aebersold, 1995). La structure en trois dimensions n'est cependant pas disponible pour une grande majorité de glycosyles hydrolases; et pour celles dont la structure est connue, l'obtention d'informations sur la structure du complexe enzyme/ligand peut être fastidieuse. De plus, l'identification des résidus situés à proximité du substrat ne permet pas de déterminer leur rôle spécifique. Donc, la vérification du rôle dans la catalyse de ces résidus nécessite la création et l'analyse de mutants.

Plusieurs techniques utilisant des agents chimiques ont aussi été exploitées pour permettre l'identification des résidus impliqués dans la catalyse enzymatique. Les groupements spécifiques marqués (ex : carbodiimide) sont désignés pour former des liens stables et covalents avec des groupes fonctionnels présents chez la protéine (Withers et Aebersold, 1995). Cependant, ces groupements spécifiques ne permettent pas de différencier les groupements fonctionnels localisés au site actif de ceux localisés ailleurs dans la protéine. De plus, ce sont les agents les moins spécifiques pour l'identification des résidus du site actif et leur utilisation peut amener à des conclusions erronées (Withers et Aebersold, 1995).

Une autre technique privilégie l'utilisation d'une classe de réactifs formés d'un sucre qui procure la spécificité pour le site actif et d'un réactif inhérent dont la fonction est de former un conjugué stable avec l'enzyme (Withers et Aebersold, 1995). Plusieurs types d'agents marqués possédant une affinité ont été utilisés pour l'étude du

fonctionnement des glycosyles hydrolases. Le *N*-bromoacétyle glycosylamine a été utilisé pour inactiver la β -galactosidase de *Escherichia coli* (Naider *et al.*, 1972) et la β -glucosidase de *Aspergillus wentii* (Legler, 1990). L'isothiocyanate (Shulman *et al.*, 1976) a aussi été utilisé pour inactiver la β -glucosidase provenant des amandes. Ces agents n'ont cependant pas permis l'identification des bons résidus impliqués dans la catalyse enzymatique. Des efforts considérables ont été effectués pour l'exploitation de dérivés de glycosyles époxydes comme agents. Les dérivés époxydes fonctionnent comme suit : la protonation de l'époxyde (spécifiquement par l'acide ou non spécifiquement par d'autres résidus) génère un composé réactif prédisposé à une attaque nucléophile (Withers et Aebersold, 1995). Les 2,3-époxypropyle glycosides du *N*-acétyle-glucosamine, chitobiose et chitotriose ont été synthétisés et utilisés pour démontrer leur affinité pour les lysozymes. Les époxyalkyles glycosides ont aussi été utilisés pour un grand nombre de glycosidases. Une version plus raffinée des inactivateurs époxyde a été trouvée dans le conduritole époxyde qui contient un époxyde endocyclique à l'intérieur de l'anneau cyclitole mimant ainsi l'anneau de sucre (Withers et Aebersold, 1995). Une grande quantité de ces époxydes a été synthétisée pour qu'ils puissent s'associer de façon spécifique à un grand nombre de glycosidases. La liaison de l'agent se fait de façon très similaire à la liaison du substrat habituel et il s'ensuit une inactivation de l'enzyme. La protonation de l'époxyde et l'attaque concomitante du nucléophile mène à la formation d'un dérivé covalent. Le conduritole aziridine est un très bon inactivateur de l' α - et de la β -glucosidases (Legler, 1990). Cependant, dans beaucoup de cas, les conduritoles époxydes ne s'apparient pas bien au site actif de l'enzyme. Ce mauvais appariement est probablement dû à une mauvaise imitation du sucre servant de substrat.

L'identification des résidus catalytiques peut aussi se faire par le marquage du site actif à l'aide d'un mécanisme utilisant un inhibiteur. Cette technique, qui est très efficace chez les glycosyles hydrolases, utilise des ligands chimiques inertes qui requièrent une activation pour ensuite réagir de façon covalente avec l'enzyme. La première classe d'inhibiteurs comprend les conduritoles époxydes et les glycosyles méthyles triazènes (Whiters et Aebersold, 1995). La protonation, consécutive à la liaison de ces réactifs,

permet leur décomposition rapide pour générer de l'azote, un arylamine et de façon plus importante, un ion glycosyleméthyle carbonium hautement réactif (Whiters et Aebersold, 1995). Cet électrophile réactif, généré au site actif, réagit rapidement avec le nucléophile, bloquant ainsi le site actif et inactivant l'enzyme. L'utilisation d'un inactivateur radiomarqué permet de marquer et d'identifier les deux résidus impliqués dans la catalyse. La deuxième classe utilise des inhibiteurs qui se lient à l'enzyme permettant la séparation du lien glycosidique d'un glycoside non réactif essentiel libérant alors un aglycone qui se réarrange en une espèce hautement réactive chimiquement. Le difluoroalkyle glycoside et le difluorotolyle glycoside sont des agents inhibiteurs compris dans cette classe (Whiters et Aebersold, 1995).

Finalement, les 2-déoxy-2-fluoro glycosides activés, une nouvelle classe d'inactivateurs, ont été développés (Whiters *et al.*, 1987, 1988). Ceux-ci permettent la formation et l'accumulation d'intermédiaires glycosyle-enzyme relativement stables. Ces activateurs permettent l'identification des nucléophiles impliqués dans le site actif d'un grand nombre de glycosyles hydrolases.

La stratégie traditionnelle employée pour l'identification des résidus catalytiques fait appel à la synthèse et à l'utilisation d'un inactivateur radio-marqué qui génère une enzyme marquée. La séparation des peptides modifiés se fait par HPLC et est guidée par la présence du radio-isotope. Les peptides purifiés sont ensuite séquencés. Cependant, l'utilisation d'inactivateurs basés sur des groupes spécifiques, sur l'affinité ou sur un mécanisme pour l'identification des résidus présents dans le site actif ont tous quelque chose en commun. En effet, leur succès dépend de la sensibilité, de la vitesse et de la clarté de la méthode utilisée (Whiters et Aebersold, 1995). Ainsi, pour contrer les limites de la méthode de radio-marquage, une technique utilisant la spectrométrie de masse pour l'identification des résidus modifiés de façon covalente par des inhibiteurs a été mise au point. Cette méthode consiste au marquage covalent des enzymes avec un inhibiteur non-radioactif suivi de la digestion protéique des peptides inactivés et marqués, de l'identification et de la purification de ces peptides par HPLC (Whiters et Aebersold, 1995).

6. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les objectifs majeurs de ce projet sont de déterminer le mécanisme de réaction employé par l'AbfB pour hydrolyser le substrat et d'identifier les résidus catalytiques responsables de l'hydrolyse. Afin d'effectuer ces études sur le domaine catalytique de l'AbfB, le gène de cette dernière sera cloné dans un vecteur d'expression de façon à obtenir une grande quantité d'enzyme produite. Les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de chromatographie à haute performance échangeuse d'anion (HPEAC) seront utilisées pour déterminer si on observe un mécanisme d'inversion par l'AbfB. À cause de l'abondance des acides aminés aspartate et glutamate dans la séquence peptidique du domaine catalytique de l'enzyme, une technique mettant en œuvre une modification chimique de ces derniers sera utilisée.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

II. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

1.1 *Streptomyces lividans*

La souche bactérienne de *S. lividans* IAF10-164 est utilisée pour la production d' α -L-arabinofuranosidase B. Cette souche qui ne produit pas de cellulases et de xylanases a été obtenue par mutagenèse à l'aide du N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (Mondou *et al.*, 1986) de la souche sauvage 1326 (Hopwood, Institut John Innes, Norwich, Grande-Bretagne). La souche obtenue a été caractérisée et possède une mutation au niveau du gène *msiK* empêchant la liaison de l'ATP à la protéine MsiK (Mondou *et al.* 1986). Le transport des oligosaccharides inducteurs est ainsi interrompu empêchant l'induction et la production des cellulases et des xylanases. L'AbfB sera la protéine dominante dans le surnageant de culture.

1.2 *Escherichia coli*

La souche DH11S (*mcrA*, Δ (*mrr*-RMS-*mcrBC*), Δ (*lac-proAB*), Δ (*recA* 1398), *deoR*, *rpsH*, *srl*, *thi*⁻/F', *proAB*⁺, *lacI*^qZ Δ M15) (Gibco BRL) est utilisée comme hôte lors de l'infection par le phage M13 pour la production d'ADN simple brin servant au séquençage de l'ADN cloné.

2. PLASMIDES UTILISÉS

2.1 pIAFC109

Le plasmide pIAFC109, un dérivé du plasmide pIJ702, est utilisé pour le clonage du fragment codant pour la protéine chimère. Le plasmide pIJ702 est un vecteur à copies multiples qui contient une région essentielle nécessaire à sa répllication dans *S. lividans*. Il contient un gène de résistance à la thiostreptone qui permet de sélectionner les

transformants. Il possède aussi le gène *mel* qui code pour une tyrosinase impliquée dans la formation des pigments de mélanine. L'insertion d'un fragment d'ADN interrompant le gène *mel* empêche la formation de pigments. De cette façon, il est possible de sélectionner les transformants possédant les plasmides recombinants. Finalement, il contient le promoteur fort C109, qui est non réprimé par le glucose. Ce dernier a été créé par mutagenèse à l'aide du NTG sur le promoteur de la xylanase C.

2.2 pIAF933

Le plasmide pIAF933 est un dérivé du vecteur pIJ702. Il contient un fragment d'ADN qui code pour le peptide signal de la xylanase A et pour le domaine catalytique de la cellulase B. Ce plasmide est utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR de l'ADN codant pour le peptide signal de la xylanase A.

2.3 pIAF31

Le plasmide pIAF31 est un autre dérivé du plasmide pIJ702. Il contient un insert d'ADN chromosomique provenant de la souche de *S. lividans* 1326. À partir du plasmide pIAF31, un fragment d'ADN simple brin d'une longueur de 3,9 kb contenant le gène de l'AbfB a été isolé. C'est donc à partir de cette matrice qu'est amplifié le domaine catalytique de l'AbfB.

3. CONSERVATION DES SOUCHES DE *S. LIVIDANS*

On incube quinze plaques de Pétri contenant du milieu Bennett (Annexe II) pendant 7 jours à 34°C. Le mycélium est par la suite gratté et récupéré à l'aide d'une préparation de lait écrémé 10% (p/v) stérilisé. Le mycélium (maximum 12 mL) est ensuite réparti dans des ampoules de verre stériles pour la lyophilisation. La suspension est préalablement congelée à l'aide d'un mélange de glace sèche et d'acétone. Après 24 heures de lyophilisation, les ampoules sont scellées sous vide à l'aide d'un chalumeau et

conservées à 4°C. Les souches peuvent aussi être conservées sur un milieu Bennett à 4°C pour une durée maximale de 2 mois.

4. CONSTRUCTION DE L'INSERT

4.1 Amplification

L'amplification des fragments d'ADN est effectuée avec l'appareil à PCR LKB•Gene ATAQ Controller de Pharmacia. Le mélange réactionnel est composé de 10% (v/v) de tampon pour polymérase *Pfu* (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris (hydroxyméthyle) aminométhane (Tris)-HCl (pH 8,75), 20 mM MgSO₄, 1% Triton[®] X-100 et 1 mg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA)), de 0,8 mM de déoxynucléotides triphosphate (dNTP), de 4% (v/v) de propionamide, de 0,05% (v/v) de Tween 20, de 1 ng d'ADN matrice, de 50 pmol de chacune des deux amorces respectives (Tableau VII), de 2,5 U de polymérase *Pfu*, de 5 mM de MgSO₄ dans un volume final de 100 µL. On ajoute finalement 75 µL de paraffine liquide. Le mélange réactionnel est contenu dans un microtube à paroi mince. Le milieu est porté à 95°C et maintenu 5 minutes à cette température de façon à dissocier l'ADN en ses deux brins, puis il est refroidit à 55°C (5 minutes), température à laquelle les amorces s'apparient aux brins complémentaires, finalement la température du milieu est augmentée à 72°C (3 minutes) pour permettre l'élongation des amorces. Par la suite, 30 cycles de séparation des brins d'ADN de 1 minute à 94°C, d'hybridation de 1 minute à 55°C et d'élongation de 3 minutes à 72°C sont effectués. Le programme se termine par une élongation finale d'une durée de 7 minutes à 72°C.

4.2 Mutagenèse dirigée par PCR utilisée pour enlever le site de restriction *SphI*

Des amorces internes (Mut 1 et Mut 2) (Tableau VII) sont utilisées pour créer la mutation désirée. Lors d'un premier PCR, l'ADN qui code pour l'extrémité N-terminale de la protéine est amplifiée (section 4.1) à l'aide d'une amorce mutagène et d'une amorce externe. En simultanément, un deuxième PCR permet d'amplifier l'ADN qui code pour

Tableau VII : Séquences des amorces utilisées dans les différents PCR.

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques des amorces
XlnA 5'	5'-GCATGCGCTCCTACGCCCTTCCCAGATCA-3'
AbfB 3'	5'-CCCGAGCTCTCAGTGCCGCAGGGTGAG-3'
XlnAAbf 2	5'-CCGCCGGGGGCACACGCCGACGGCACGTGTGCGCTTCCGTC-3'
XlnAAbf 3	5'-GACGGAAGCGCACACGTGCCGTCGGCGTGTGCCCGGCGGC-3'
Mut 1	5'-AAGATCTACCGGGCGTCGATGCCGATCGGGA [†] ACTTC-3'
Mut 2	5'-GAAGTTCCCGATCGGCATCGACGCCCGGTAGATCTT-3'

Les nucléotides en caractère gras composent le codon muté.

l'extrémité C-terminale de la protéine à l'aide des autres amorces mutagène et externe. Un troisième PCR permet de mettre en commun les produits de PCR obtenus auparavant. Suite à l'étape de dissociation, les brins complémentaires mutés pourront s'apparier et il y aura amplification totale du gène à l'aide des deux amorces externes. (Figure 5)

4.3 Purification de l'ADN

Le produit de PCR est isolé suite à une migration sur gel d'agarose (0,7-1,0% (p/v)). Les échantillons sont placés dans un tampon constitué de 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) de xylène de cyanole et de 30,0% (v/v) de glycérol. La migration est effectuée dans du tampon Tris-Borate-éthylènediaminetétraacétate (EDTA) (TBE) (90 mM Tris, 90 mM acide borique et 2 mM EDTA) à l'aide d'un courant électrique. Les fragments d'ADN d'intérêt sont visualisés à l'aide des ultraviolets et ensuite découpés et purifiés avec la trousse SephaglasTM BandPrep de Pharmacia Biotech. Le carré d'agarose contenant l'ADN à purifier est submergé par 250 µL de la solution de Gel solubilizer à laquelle a été ajouté 1% (v/v) d'acide acétique. La solution qui contient une concentration élevée d'iode de sodium sert à la dissolution du gel d'agarose et favorise la liaison de l'ADN à la matrice. Cette étape est effectuée à 60°C jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissout. La solution de Sephaglas BP (20% (p/v) Sephaglas BP et 0,15% de Kathon[®]CG/ICP Biocide) est par la suite ajoutée au tube pendant 5 minutes pour permettre la liaison de l'ADN aux billes. Le tube est ensuite centrifugé

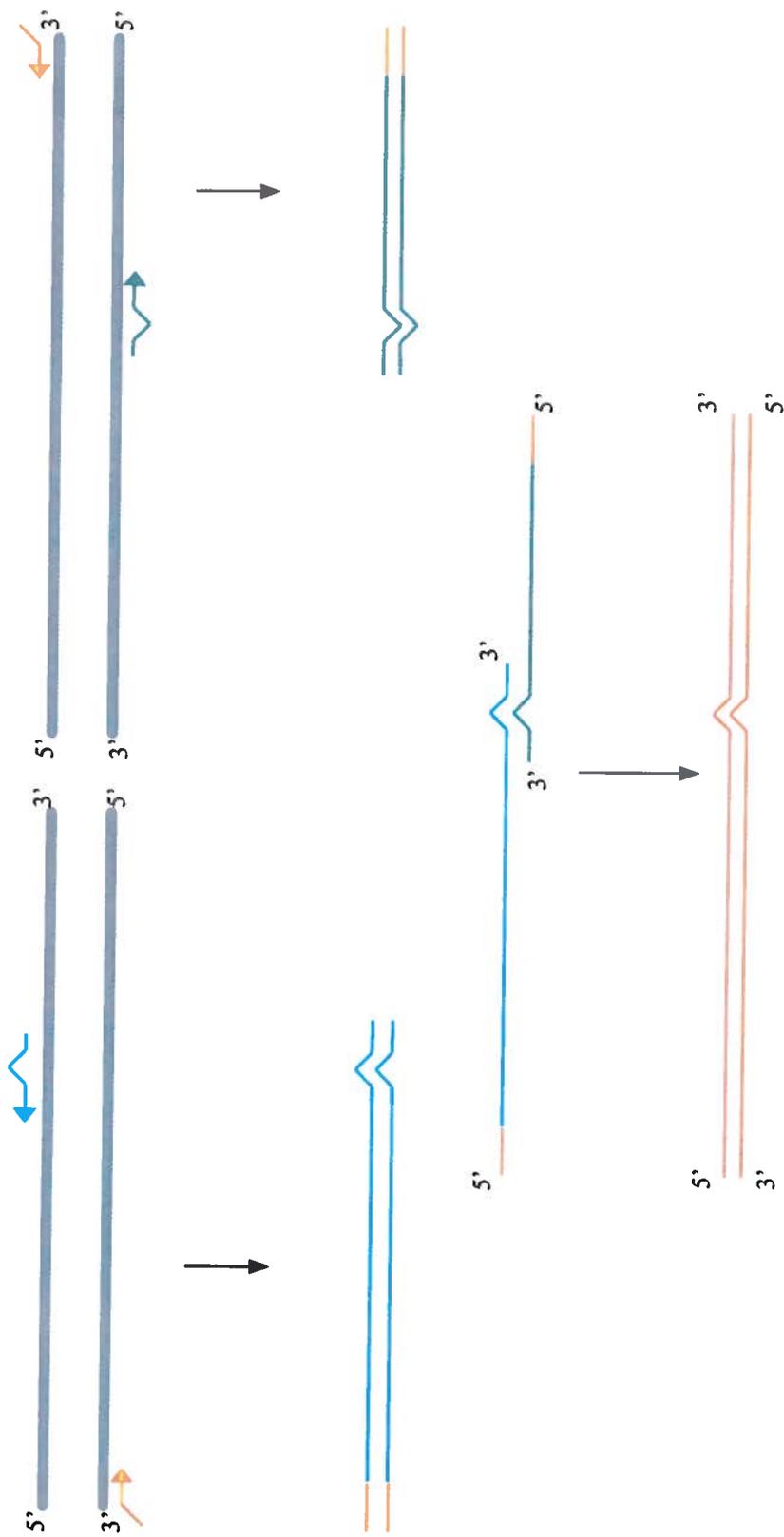


Figure 5 : Schéma illustrant la technique de mutagenèse dirigée par PCR. (Adapté de Higuchi, 1990)

pendant 30 secondes à $15\ 000 \times g$ à la température de la pièce. Le culot est séparé du surnageant et lavé 3 fois avec un tampon (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA et 0,1 mM NaCl) contenant de l'éthanol 95% (v/v) pour enlever les contaminants, les protéines et les nucléotides libres sans toutefois déloger l'ADN de la matrice. Il est ensuite séché pendant 10 minutes pour permettre l'évaporation de l'éthanol qui pourrait interférer dans des manipulations enzymatiques subséquentes. Finalement, l'ADN est resuspendu dans 50 μL de tampon d'éluion de faible force ionique (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) et centrifugé pendant 30 secondes à $15\ 000 \times g$ à la température de la pièce pour permettre la séparation de l'ADN de la matrice. Cette étape d'éluion est répétée pour s'assurer d'avoir délogé entièrement l'ADN.

5. CLONAGE ET TRANSFORMATION

5.1 Endonucléases de restriction

Dans un tube sont contenus environ 1 μg d'ADN, 1,5 U d'endonucléase *SphI* et 4 U d'endonucléase *SacI*, 20% (v/v) de tampon OPA (One-Phor-All) (100 mM Tris-acétate (pH 7,5), 100 mM magnésium acétate et 500 mM potassium acétate) pour un volume final de 20 μL . Le mélange est centrifugé pendant 5 secondes à $15\ 000 \times g$ à la température de la pièce. Par la suite, il est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les endonucléases sont finalement inactivées à l'aide d'une incubation d'une heure à 85°C.

5.2 Ligation

On ajoute dans un microtube 0,5 μg d'insert ainsi que 200 à 400 ng de plasmide pIAFC109 préalablement digéré dans les mêmes conditions qu'à la section 5.1 et purifié comme mentionné à la section 4.3, 10% (v/v) de tampon OPA (section 5.1), 1mM d'ATP et 1 U d'ADN T4 ligase et on complète le volume à 20 μL . Le mélange est gardé à 10°C pendant toute la nuit pour permettre la ligation.

5.3 Transformation dans des protoplastes de la souche 10-164

Les protoplastes de *S. lividans* sont préparés selon la méthode décrite par Hopwood *et al.* (1985). Dans cette expérience, 5 μL du produit de ligation sont nécessaires à la transformation. On ajoute 200 μL d'une solution 25% (v/v) de polyéthylène glycole (PEG) 1500 (Boehringer Mannheim, Laval, Canada) stérile dans un Eppendorf stérile qui contient 50 μL de protoplastes, pour fragiliser la membrane de ces derniers. La solution est agitée doucement et incubée pendant 2 minutes à température pièce. Différentes quantités de suspension cellulaire (50 μL , 75 μL et 125 μL) contenant le produit de ligation sont par la suite étalées de façon stérile sur le milieu de régénération R5 (Annexe III). Suite à une incubation de 24 heures à 34°C permettant la régénération des cellules, il y a ajout de 1 mL de thiostreptone (0,5 mg/mL) sur chaque gélose. Une fois que l'antibiotique a bien pénétré à l'intérieur des gélouses, celles-ci sont réincubées jusqu'à l'apparition de colonies résistantes à la thiostreptone (Hopwood *et al.*, 1985).

5.4 Isolement du plasmide

L'isolement de plasmide est fait à partir d'un prélèvement de 1 mL d'une culture en milieu minimal M14 (Annexe VII) contenant 10% (v/v) de cellules. La méthode choisie est celle utilisant le lysozyme et la lyse alcaline décrite par Hopwood *et al.* (1985). Le culot cellulaire est lavé avec du tampon sans lysozyme (10,3% (p/v) sucrose, 25 mM Tris et 25 mM EDTA à pH 8,0). Par la suite, les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C dans le même tampon contenant une concentration de 2 mg/mL de lysozyme (volume final de 500 μL) afin de pré-digérer la membrane cellulaire. 250 μL d'une solution d'une concentration de 300 mM NaOH et de 2% (p/v) sodium dodécyle sulfate (SDS) est ajoutée et l'échantillon est incubé 15 minutes à 70°C. Une fois l'échantillon refroidi, 80 μL d'une solution de phénol-chloroforme (83 g de phénol Analar et 83 mg d'hydroxyquinoline dans une solution de chloroforme 83% (v/v)) sont ajoutés pour permettre l'élimination des débris d'ADN. Après une centrifugation (3 minutes à 13 000 $\times g$, température pièce), la phase supérieure (700 μL) est transférée dans un tube propre auquel est ajouté 70 μL d'acétate de sodium 3 M et 700 μL d'isopropanol

95% (v/v). Après une incubation de 5 minutes à la température de la pièce et une centrifugation de 2 minutes à 13 000 x g (température pièce), le culot est resuspendu dans 50 µL de tampon Tris-EDTA (1 mM Tris et 1 mM EDTA pH 8,0), dans 5 µL de tampon sodium acétate 3 M, ainsi que dans 25 µL de Phénol-neutre pour effectuer une seconde extraction. La phase supérieure est finalement précipitée avec 50 µL d'isopropanol 100% (v/v) et après centrifugation (2 minutes à 13 000 x g à la température de la pièce) l'ADN plasmidique est récupéré dans 50 µL d'eau distillée.

6. SÉQUENÇAGE DU GÈNE

6.1 Sous-clonage dans M13

Le fragment d'ADN d'intérêt d'un clone est isolé suite à une extraction de plasmide (section 5.4), à une digestion du plasmide avec les endonucléases *SphI* et *SacI* (section 5.1) et à une purification de ce fragment (section 4.3). Les vecteurs M13mp18 et M13mp19 (Pharmacia) sont digérés avec les deux endonucléases *SphI* et *SacI*. La ligation est effectuée dans les conditions suivantes : 0,5 µg d'insert, 200 à 400 ng de vecteur M13mp18 ou M13mp19, 10% (v/v) de tampon OPA (section 5.1), 1 mM d'ATP et 1 U de T₄ ADN ligase dans un volume final de 20 µL suivie d'une incubation à température pièce pendant au moins 2 heures.

6.2 Transfection

Des cellules compétentes de la souche *E. coli* DH11S sont préparées selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989) et transfectées avec 10 µL de la solution de ligation. Les cellules transfectées sont mélangées avec 3 mL de gélose molle fondue constituée de Bacto-tryptone (Difco) 1% (p/v), de NaCl 0,8% (p/v) et de Bacto-agar (Difco) 0,8% (p/v) auxquelles 300 µL de cellules de fond *E. coli* DH11S provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle dans le milieu 2xTY (Annexe IV), 10 µL d'isopropyle-β-D-thiogalactopyranoside 100 mM et 50 µL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside 2% dans du diméthylformamide sont ajoutés. On laisse

le milieu gélifiant de 15 à 30 minutes sur des plaques de Pétri contenant le milieu H (Annexe V) à la température de la pièce et on incube 16 heures à 37°C.

6.3 Production et purification de l'ADN simple brin

Les colonies blanches sont repiquées avec des cure-dents stériles dans 1,5 mL de milieu 2xTY contenant un inoculum de 1% (v/v) de cellules DH11S provenant d'une culture de 16 heures. On incube 5 à 6 heures à 37°C avec agitation. La culture est par la suite transférée dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL et centrifugée 10 minutes à 15 000 x *g* à la température de la pièce. On transvide 1 mL de surnageant contenant les particules phagiques dans 250 µL d'une solution de PEG 6000 20% (v/v) et de chlorure de sodium 2,5 M, mélangé et incubé à 4°C au moins 60 minutes pour permettre la précipitation de la forme répliquative du phage. Suite à l'incubation, les phages sont récupérés à l'aide d'une centrifugation de 10 minutes à 15 000 x *g* à la température de la pièce. Après avoir séché le culot à l'air, celui-ci est dissout dans 100 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris et 1 mM EDTA pH 8,0). Pour extraire les protéines et les impuretés, 50 µL de phénol saturé sont ajoutés, le mélange est agité 10 secondes et incubé 15 minutes à la température de la pièce. On ajoute 50 µL de chloroforme et après avoir agité, on incube 5 minutes à la température de la pièce. La phase aqueuse contenant l'ADN est ensuite récupérée en centrifugeant 5 minutes à 15 000 x *g* à la température de la pièce et transférée dans un tube neuf. L'ADN est précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95% (v/v) pendant 30 minutes à -20°C. L'ADN est récupéré par une centrifugation de 15 minutes à 15 000 x *g* à la température de la pièce, séché et resuspendu dans 30 µL d'eau distillée.

6.4 Protection à la nucléase S1

Une expérience de protection à la nucléase S1 est utilisée pour vérifier l'insertion du fragment *SphI-SacI* dans l'ADN simple brin. La méthode consiste en l'hybridation de 1 µL d'ADN simple brin provenant du sous-clonage dans M13mp18 avec 1µL du brin complémentaire provenant de M13mp19. Cette dernière est effectuée dans une solution

de NaCl 0,2 M et le tube est placé dans un bain d'eau à 90°C qui est par la suite lentement refroidi à la température de la pièce. Ensuite, il s'agit de centrifuger 5 secondes à $15\,000 \times g$ à la température de la pièce, d'ajouter 1 U de nucléase S1 contenue dans 50% (v/v) de tampon S1 (acétate de sodium 0,5 M (pH 4,5), ZnSO₄ 45 mM) afin d'hydrolyser les brins d'ADN qui ne ce sont pas hybridés. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Finalement, 3 µL de tampon de chargement pour électrophorèse sont ajoutés et l'ADN est séparé sur un gel d'agarose 0,7% (p/v). Les fragments sont protégés de l'attaque de la nucléase S1 où il y a eu hybridation et sont observés sur le gel d'agarose.

6.5 Séquençage

L'ADN simple brin est ensuite séquençé selon la méthode de Sanger *et al.* (1977) en utilisant des amorces universelles. Les réactions de polymérisation et les migrations ont été réalisées par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. La trousse «ALF express Cycle Sequencing Kit» et le séquenceur automatique «ALF DNA Sequencer» de la compagnie Pharmacia ont été utilisés.

7. FERMENTATION

7.1 Inoculation de la pré-culture

À partir d'une plaque de Pétri contenant du milieu Bennett-thio et incubée pendant 7 jours, deux pré-cultures de 25 mL en milieu tryptone de soya (TSB) (Annexe VI) supplémentées de 5 µg/mL de thioestreptone sont inoculées. Des billes stériles sont ajoutées dans les Erlenmeyers pour empêcher l'agrégation des bactéries. Une fois l'inoculum homogénéisé celui-ci est ajouté au milieu. Les cultures sont incubées pendant 24 heures à 34°C dans un agitateur à 240 rpm. L'inoculum est par la suite lavé 3 fois à l'aide du milieu M14 ou M15 (Annexe VII et VIII) et homogénéisé. Ce dernier est ajouté à 500 mL de milieu M14 ou M15 et incubé pendant 48 heures à 34°C sur un agitateur à 240 rpm.

7.2 Inoculation du fermenteur

La production de l'enzyme est effectuée à l'aide d'un fermenteur de marque Microferm Fermentor. La pré-culture de 500 mL est ajoutée à 7 L d'un milieu de culture M14 ou M15. La culture est incubée jusqu'à l'obtention d'une sécrétion maximale d'enzyme. Les conditions de fermentation sont 400 rpm, 34°C et 10 L d'air par minute.

8. PURIFICATION DE L'ENZYME

8.1 Ultrafiltration à débit tangential

Le surnageant de culture est séparé des bactéries à l'aide d'un filtre Whatman catégorie #1 de 24,0 cm de diamètre. Le filtrat est par la suite filtré par aspiration à l'aide d'une cartouche contenant une membrane de 2 μm de marque Sartorius et concentré à l'aide de l'appareil Pellicon[®] de Millipore[®] qui possède une membrane ayant une surface totale de 5 pieds carrés et une porosité de 3,000 Daltons de type OMEGA[™] (Filtron). La membrane est tout d'abord rincée avec 4 L d'eau déionisée, par la suite, celle-ci est imprégnée de tampon citrate 100 mM pH 6,0. Les protéines sont concentrées à une vitesse de 100 mL/min (pression à l'entrée : 138 kPa et pression du rétentat : 69 kPa). Une fois les protéines concentrées et récupérées, la membrane est imprégnée de tampon citrate 100 mM à pH 6,0 qui contient 1 M de NaCl et par la suite dans du NaOH 1 M. La membrane est ainsi nettoyée et celle-ci est rincée avec du tampon jusqu'au rétablissement du bon pH. La membrane est finalement conservée dans de la formaldéhyde 4%. Toutes les étapes de purification sont effectuées à 4°C.

8.2 Dialyse

Deux dialyses d'une durée de 8 à 16 heures chacune sont effectuées dans un tampon succinate 5 mM pH 4,5. Les membranes utilisées sont d'une perméabilité de 3,500 Daltons (PIERCE). La conductivité et le pH sont mesurés à la fin de la dialyse.

8.3 Chromatographie échangeuse d'ions

La colonne utilisée est une échangeuse de cations (CM Sepharose CL-6B de Pharmacia Biotech de 1,7 × 20 cm). L'appareil utilisé pour la chromatographie est un FPLC de marque Waters modèle LC systems 625. La colonne est lavée en passant du tampon succinate 20 mM à pH 4,5 muni de 1 M NaCl à un débit linéaire de 59,7 cm/h. Par la suite, la colonne est équilibrée avec du tampon succinate 20 mM à pH 4,5. L'échantillon est filtré avec un filtre de 0,2 µm (Millipore) et chargé sur la colonne. Suite à l'élimination, avec le tampon succinate, des protéines ne s'étant pas accrochées à la colonne, le programme d'élution est par la suite démarré (Tableau VIII). L'élution des protéines est suivie par absorbance à 280 nm à l'aide d'un détecteur de marque Waters modèle 484. La colonne est conservée dans une solution d'azodure de sodium 0,02% (p/v).

Les fractions positives sont identifiées par SDS-PAGE et Western, (section 9.2 et 9.4). Elles sont rassemblées et concentrées à l'aide d'un appareil Amicon à 342 kPa muni d'une membrane Omega (Pall Filtron) d'une porosité de 3,000 Daltons jusqu'à une concentration finale de 15 mg/mL.

8.4 Tamis moléculaire

La colonne Superdex HR-75 (3,5 × 100 cm) servant au tamis moléculaire est équilibrée dans le tampon sodium phosphate 100 mM pH 6,0 à un débit linéaire entre 9,7 et 19,5 cm/h réglé avec une pompe péristaltique (Pharmacia LKB•Pump P-1). L'échantillon est filtré avec un filtre de 0,2 µm (Acrodisc, Gelman Sciences) et 30 mg de protéines sont chargées avec l'injecteur automatique V-7 (Pharmacia Biotech). Les protéines sont détectées à 280 nm à l'aide d'un détecteur (Pharmacia LKB•Optical Unit UV-1). Les fractions contenant des protéines sont analysées par SDS-PAGE (section 9.2).

Tableau VIII : Programme d'élution utilisé lors de la chromatographie échangeuse de cations.

Temps (minutes)	Débit linéaire (cm/h)	Tampon succinate 20mM pH 4,5	Tampon succinate 20 mM pH 4,5 + 1 M NaCl
0	59,7	100 %	0 %
5	59,7	100 %	0 %
95	59,7	0 %	100 %
140	59,7	0 %	100 %
145	59,7	100 %	0 %
180	59,7	100 %	0 %
185	6,0	100 %	0 %

8.5 Concentration et lyophilisation de l'échantillon

Les fractions positives identifiées sont par la suite recueillies et rassemblées. Trois lavages sont effectués avec de l'eau Milli Q à l'aide de l'appareil Amicon dans les conditions énumérées à la section 8.3. L'échantillon est par la suite congelé pour finalement être lyophilisé.

9. ANALYSE DES PROTÉINES

9.1 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées en utilisant la méthode développée par Lowry *et al.* (1951) en utilisant la fraction V de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard.

9.2 SDS-PAGE

Deux techniques ont été utilisées pour effectuer la séparation des protéines par SDS-PAGE 12,5% (p/v). La première nécessite l'utilisation de l'appareil Mini-PROTEAN® II de Bio-Rad et est décrite par Laemmli *et al.* (1970). Dans ce cas-ci, les

gels sont colorés au bleu de Coomassie R-250 (0,1% (p/v) bleu de Coomassie R-250, 40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique). La deuxième technique utilise l'appareil Phast System de Pharmacia. Les PhastGel[®] sont colorés au nitrate d'argent suite à leur migration selon les protocoles de séparation et de développement Nos 111 et 210 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden).

9.3 Détermination du point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique est aussi effectuée à l'aide de l'appareil Phast System de Pharmacia. Les échantillons à analyser sont séparés sur un gel contenant des ampholytes de pH 3 à 9 (Phast Gel de Pharmacia) et colorés selon les protocoles de séparation et de développement Nos 100 et 210 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden).

9.4 Transfert de type Western et immunodétection

Suite à une électrophorèse SDS-PAGE avec l'appareil Mini-PROTEAN[®] II (section 9.2), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec le système «Mini Trans-Blot cells» (Bio-Rad). Le transfert est réalisé dans un tampon contenant du Tris 25 mM, de la Glycine 192 mM et du méthanol 20% (v/v) à 30V pendant toute la nuit.

Une fois la membrane séchée, cette dernière est incubée dans la solution de blocage (gélatine 3% (p/v) dans du tampon Tris salin (TBS) (pH 7,5) (Tris 20 mM, NaCl 500 mM)) pendant 1 heure. La membrane est par la suite lavée 3 fois avec une solution de lavage (Tween 80 0,05% (v/v) dans du TBS (pH 7,5)). La membrane est par la suite incubée pendant 1 heure dans la solution d'anticorps primaires (0,13% (v/v) d'antisérum de lapin spécifique à l'AbfB dans un tampon contenant 0,1% (p/v) de gélatine et 0,048% (v/v) de Tween 80 dans du TBS (pH 7,5)). La membrane est lavée encore 3 fois avant l'incubation d'une heure avec la solution d'anticorps secondaires (0,05% (v/v) d'anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline dans un tampon contenant 1% (p/v) de gélatine

et 0,033% (v/v) de Tween 80 dans du TBS (pH 7,5)). Suite à 3 lavages et à une incubation dans le tampon TBS pH 7,5 pendant 5 minutes, la membrane est incubée dans la solution de développement (0,15% (v/v) de chlorure de nitro bleu tétrazolium/phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (Boehringer) dans une solution de coloration (Tris 100 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1% (p/v), 100 mM NaCl (pH 9,5)). Lorsque la coloration désirée est obtenue la réaction est arrêtée avec de l'eau distillée.

9.5 Transfert sur membrane PVDF et séquençage de l'extrémité N-terminale

Tout d'abord, une migration de la protéine pure dans un gel de polyacrylamide est effectuée avec l'appareil Mini-PROTEAN[®] II de Bio-Rad selon la méthode de Laemmli (section 9.2). De l'acide thioglycolique est ajouté au tampon de la chambre supérieure pour une concentration finale de 150 μ M. Suite à une migration de 150 V-h, les protéines sont transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF). La membrane est tout d'abord rincée dans du méthanol 100% (v/v) pour une minute. La membrane et les gels sont par la suite trempés pendant 5 minutes dans le tampon de transfert (10 mM d'acide 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonique et 10% (v/v) méthanol, pH 11,0). Le transfert est réalisé avec l'appareil système «Mini Trans-Blot cells» (Bio-Rad) à 250 mA pendant 15 minutes à température de la pièce.

La membrane est lavée dans l'eau distillée pendant 5 minutes avant d'être colorée une minute dans une solution de coloration (Bleu Brillant de Coomassie R-250 0,1% (p/v) dans du méthanol 50% (v/v)). La membrane est finalement décolorée dans une solution de méthanol 50% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v).

Le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine est effectué à partir de la membrane PVDF. Ce dernier est obtenu en effectuant une dégradation d'Edman à l'aide du séquenceur automatisé de marque PE-Biosystems modèle 494-cLC-Procise selon le protocole de Hewick *et al.* (1981). Le séquençage a été effectué à l'Institut de recherche en biotechnologie par Madame France Dumas.

10. PRÉPARATION DES SUBSTRATS

10.1 Xylane d'épeautres d'avoine

La partie soluble du xylane d'épeautres est isolée de la façon suivante : 35 g de xylane (Sigma) est bouilli dans un volume de 2 L d'eau distillée pour 2 heures, la fraction soluble est récupérée suite à une centrifugation de 35 minutes à $13\,325 \times g$ à la température de la pièce. Une deuxième centrifugation est effectuée avec le surnageant pour séparer le substrat insoluble résiduel du substrat soluble. La fraction soluble est finalement lyophilisée.

10.2 Arabinoxylane de seigle et de blé

La poudre d'arabinoxylane de seigle ou de blé (Megazyme) est tout d'abord dissoute dans de l'éthanol 95% (v/v). Par la suite, l'échantillon est dilué dans de l'eau et porté à ébullition. Ce dernier est ensuite refroidit à 4°C avant d'ajuster le volume pour obtenir une concentration finale de 1% (p/v). Le substrat est lyophilisé juste avant son utilisation pour pouvoir le resuspendre dans le tampon utilisé.

10.3 Arabinane de betterave à sucre

La poudre d'arabinane de betterave à sucre (Megazyme) est tout simplement dissoute dans une quantité de tampon ou d'eau de façon à obtenir une concentration finale de 1% (p/v).

11. DOSAGE DE L'ARABINOSE LIBÉRÉ

11.1 Test colorimétrique

La méthode utilisée a été adaptée de celle de Lever (1984) et permet de mesurer la quantité de sucres réducteurs libérés par l'enzyme à l'aide de l'acide

p-aminohydroxybenzoïque hydrazine (PAHBAH). Le test est fait dans un volume final de 1 mL contenant une concentration de substrat de 1% (p/v) (section 10.0) et 45 nM d'AbfB₂ dissout dans du tampon citrate 45 mM pH 6,0 et incubé à 49°C. Après 10 minutes d'incubation, 100 µL du milieu réactionnel est ajouté à 300µL de PAHBAH 0,25% (p/v) dissout dans du NaOH 0,5 N. Les tubes sont incubés pendant 5 minutes à 95°C avant d'être refroidit pendant 5 minutes dans un bain de glace et d'eau. Le PAHBAH, en solution alcaline, réagit avec l'extrémité réductrice des sucres. Il y a production d'un chromophore lorsqu'il est incubé à une température élevée. L'absorbance est mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique à lecture de microplaques (Bio Tek Instruments). L'arabinose est utilisé comme standard.

11.2 Chromatographie à haute performance échangeuse d'anion (HPAEC)

Le dosage de l'arabinose libéré lors de la détermination des paramètres cinétiques, lors des expériences effectuées pour la détermination du mécanisme de réaction et lors des expériences d'inactivation a été évalué par chromatographie à haute performance échangeuse d'anion (HPEAC) à l'aide d'une colonne CarboPakTM PA-1 (4 × 250 mm) de Dionex. Cette dernière est reliée à un système HPLC Dionex DX-500 muni d'un détecteur ampérométrique en champ pulsé. Un échantillonneur AS3500 de Thermo Separation Products et un ordinateur possédant le logiciel PeakNet 5.1 nécessaire pour l'acquisition des données sont aussi reliés au système HPLC. Les monosaccharides sont séparés en appliquant un gradient linéaire de NaOH 150 mM à un débit linéaire de 7,5 cm/h.

12. ANALYSES PAR RMN

Le substrat arabinoxylane de seigle (10 mg/mL dans le tampon citrate 50 mM pH 6,0) et l'AbfB₂ (12 µM) sont resuspendus et lyophilisés 3 fois dans le D₂O (Sigma) pour substituer les atomes de H¹ pour des D². L'hydrolyse du substrat est par la suite effectuée dans des tubes pour RMN (535-PP de Wilmad glass co., inc.). L'acquisition des données est effectuée à 40°C selon le temps à l'aide de l'appareil AMX2-500 de Bruker (500

MHz) muni d'une sonde de 5mm (broadband multinuclear inverse probehead). Chaque spectre a été enregistré suite à 8 balayages utilisant 8192 points en utilisant une largeur spectrale de 3623,19 Hz. L'analyse a été effectuée par la compagnie Pharmacor en collaboration avec Monsieur Nicolas Leberre.

13. ANALYSES EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE

13.1 Analyses en mode d'ionisation *electrospray* positif (ESI)

Avant de procéder à l'analyse en spectrométrie de masse, les échantillons sont séparés des sels et des autres contaminants qu'ils pourraient contenir. Les échantillons sont donc dialysés (cassette Pierce d'une porosité de 3 kDa). Deux dialyses entre 8 et 16 heures chacune sont effectuées dans 4 L d'eau milli Q. Il est important de rincer préalablement les contenants afin d'éviter la contamination de l'échantillon par les détergents résiduels du lavage.

Lors de l'analyse en mode *electrospray* avec le spectromètre de masse (Micromass modèle Quatro II), les acquisitions ont été effectuées dans un intervalle de valeurs de m/z de 1200 à 2400. Les conditions étaient : un voltage de 3,00 kV attribué au capillaire, un voltage de 40 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C attribuée à l'azote pour la désolvation. Les données recueillies sont traitées par le logiciel MassLynx version 3,3. Il est à noter que toutes les analyses ont été effectuées à l'INRS-IAF avec l'aide du Dr. François Lépine.

13.2 Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS)

L'injection de l'échantillon dans un HPLC (Hewlett Packard 1100) branché en série avec le spectromètre de masse (Micromass modèle Quatro II) est réalisée lorsque la protéine a été digérée. Les peptides générés sont donc séparés à l'aide d'une colonne C₁₈ (2,1 mm × 150 mm) de marque Supelco. Un gradient linéaire d'acétonitrile 68% dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,05% à un débit linéaire de 866,15 cm/h est

appliqué pendant 80 minutes pour séparer les peptides. L'élution des peptides est suivie par absorbance à 215 nm avec un détecteur à ultraviolets de marque Hewlett Packard branché en série avec un spectromètre de masse à triple quadrupôle.

L'analyse en spectrométrie de masse, suite à la chromatographie, est effectuée en mode *electrospray*. Les acquisitions ont été effectuées dans un intervalle de 400 à 1600 valeurs de m/z . Les conditions employées pour l'analyse sont les suivantes : un voltage de 3,50 kV attribué au capillaire, un voltage de 31 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 200°C attribuée à l'azote pour la désolvation.

13.3 Analyses en mode *nanospray*

L'analyse en mode *nanospray* permet d'analyser les échantillons à des faibles débits. Avant d'injecter les peptides dans le spectromètre de masse, ces derniers sont purifiés à l'aide des Microcon-SCX (Millipore) selon le protocole établi par la compagnie. Les peptides sont absorbés par une membrane échangeuse de cations. Ils sont ainsi concentrés et séparés des contaminants. Une autre technique utilise une résine C_{18} qui se trouve dans des embouts de pipette (ZipTipTM de Millipore). Les peptides iront se fixer à la résine ce qui permettra de les concentrer et de les purifier. La première technique permet cependant de purifier une plus grande quantité de peptides. En effet, jusqu'à 400 µg de peptides peuvent être purifiés par Microcon-SCX, alors que les ZipTip ne peuvent contenir que 2 µg de peptides. L'injection des peptides dans le spectromètre de masse est effectuée dans les conditions suivantes : un voltage de 0,86 kV est attribué au capillaire, un voltage de 34 V au cône, un voltage de 6 V pour l'extraction et une température de 80°C au bloc source. Lors de la fragmentation des ions peptidiques dans le deuxième quadrupôle, un voltage de 34,5 V est attribué à la cellule de collision. Les acquisitions ont été effectuées dans un intervalle de 400 à 1600 valeurs de m/z . Les données recueillies sont traitées par le logiciel MassLynx version 3,3.

14. DIGESTION PEPTIDIQUE

14.1 Digestion de l'enzyme par la trypsine

L'enzyme (quantité variable) est tout d'abord dénaturée pendant 30 minutes à 50°C avec 6 M de Guanidine-HCl (25 µL) qui est contenue dans le tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM pH 8,6. Une étape de réduction est ensuite effectuée pendant 2 heures à 30°C en ajoutant 0,5 µL de dithioerythritol 1M. L'étape d'alkylation est effectuée en ajoutant 2 µL d'iodoacétamide 500 mM. L'incubation est effectuée à la noirceur pendant 30 minutes. Avant d'effectuer la digestion, 137,5 µL de Guanidine-HCl sont rajoutés au mélange. Par la suite, ce dernier est dilué 10 fois avec un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 8,6. Une solution de trypsine porcine modifiée (Promega) est ajoutée dans une proportion 1 : 20. Le mélange est incubé toute la nuit à une température de 37°C.

Les peptides sont purifiés par Microcon-SCX (Millipore) selon le protocole établi par la compagnie. Les échantillons sont évaporés pendant 30 minutes par centrifugation sous vide (Speed-Vac).

14.2 Analyses des peptides par HPLC

Les échantillons sont resuspendus dans 100 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,065% et filtrés sur une membrane de 0,45µm (Millipore). Les peptides sont injectés dans une colonne C₁₈ (Nova-Pak) d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre de 4 mm par l'entremise d'un HPLC de marque Waters modèle 510. Un gradient linéaire d'acétonitrile 68% dans une solution de TFA 0,05% à un débit linéaire de 238,7 cm/h est appliqué pendant 80 minutes pour séparer les peptides. L'élution des peptides est suivie par absorbance à 215 nm avec un détecteur à ultraviolets de marque Waters M-490. Le logiciel PeakNet version 5.1 sert à l'acquisition des données. L'analyse des peptides peut aussi se faire par LC-MS (section 13.2) ou par MS en mode *nanospray* (section 13.3).

14.3 Mesure de la radioactivité des peptides

Les peptides radioactifs sont préalablement séparés avec la colonne C₁₈ branchée au HPLC (section 14.2). Des fractions de 2 minutes sont récoltées immédiatement après l'injection de l'échantillon. Suite à l'ajout de 7,5 mL de liquide à scintillation (EcoLite), la radioactivité est mesurée avec un appareil Beckmann modèle LS-1701.

15. SYNTHÈSE DE CARBODIIMIDES SOLUBLES DANS L'EAU

Le carbodiimide 1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide méthiodide (EAC) non-radioactif est créé en ajoutant 0,01 mole de 1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide (EDC) (Fluka Chemika) à 0,02 moles d'iodométhane dans 50 mL d'éther anhydre. Suite à une agitation à la température pièce pendant 24 heures, la poudre est récupérée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Le EAC marqué au carbone 14 est synthétisé à partir de 2,5 mmoles de EDC (Fluka Chemika) et de 5 mmoles d'iodométhane radioactif (1 mCi). La réaction s'est effectuée dans une solution d'éther anhydre pendant 24 heures.

16. DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTS CARBODIIMIDES ENVERS L'ABFB₂

Les carbodiimides 1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (Sigma), EDC (Fluka Chemika) et EAC (Aldrich et fabriqué à partir du EDC) sont utilisés comme inhibiteurs spécifiques des résidus carboxyliques aspartate et glutamate. La détermination du meilleur inhibiteur est effectuée en incubant différentes concentrations de ces derniers (10 mM à 100 mM) avec l'AbfB₂ (2,5 μM) dans du tampon acide 4-Morpholineéthanesulfonique (Mes)/NaOH 50 mM, pH 6,0 à 25°C (Bray et Clarke, 1990). Des aliquots sont prélevés au cours du temps et inactivés avec un volume de tampon acétate de sodium 200 mM, pH 5,0. Le dosage de l'activité résiduelle est effectué en incubant 0,125 μM d'enzyme modifiée avec de l'arabinoxylane

de blé 1% dans du tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,0 à 49°C. Le dosage de l'arabinose libéré est par la suite évalué par HPEAC (section 11.2).

17. MODIFICATION DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES

17.1 Utilisation d'un carbodiimide

L'inactivation des enzymes (5 μ M) est effectuée dans un tampon Mes/NaOH 50 mM pH 6,0 avec une concentration de 100 mM de EDC, EAC ou [14 C]EAC. Suite à l'ajout du carbodiimide, le pH est ajusté à 6,0 avec une solution d'acide chloridrique 12 N. Après une incubation de 3 heures à la température de la pièce pour le EDC et de 22 heures pour le EAC, la réaction est arrêtée avec un volume de tampon acétate de sodium 200 mM, pH 5,0. L'échantillon est ensuite dialysé 2 fois pendant 8 à 16 heures dans de l'eau milli Q avec une cassette de marque Pierce d'une porosité de 10 kDa. Ce dernier est finalement lyophilisé.

17.2 Utilisation d'un amine

L'inactivation des enzymes (5 μ M) est effectuée dans un tampon Mes/NaOH 50 mM pH 6,0 avec une concentration de 100 mM de EDC et de 260 mM de glycine méthyle ester ou de [14 C]glycine éthyle ester. Suite à l'ajout du carbodiimide, le pH est ajusté à 6,0 avec une solution d'acide chloridrique 12 N. Après une incubation de 3 heures à la température de la pièce, la réaction est arrêtée avec un volume de tampon acétate de sodium 200 mM, pH 5,0. L'échantillon est ensuite dialysé 2 fois pendant 8 à 16 heures dans de l'eau milli Q avec une cassette de marque Pierce d'une porosité de 10 kDa. Ce dernier est finalement lyophilisé.

17.3 Marquage des résidus catalytiques

La première étape d'inactivation de l'AbfB₂ (5 μ M) est effectuée dans un tampon Mes/NaOH 50 mM pH 6,0 avec une concentration de 100 mM de EDC avec ou sans

ajout de glycine méthyle ester (260 mM) en présence d'arabinoxylotétraose ou d'arabinoxypentaose 1%. Suite à l'ajout du carbodiimide, le pH est ajusté à 6,0 avec une solution d'acide chloridrique 12 N. Après une incubation de 3 heures à la température de la pièce, la réaction est arrêtée avec un volume de tampon acétate de sodium 200 mM, pH 5,0. Le substrat est éliminé suite au lavage des échantillons par ultrafiltration avec des membranes d'une porosité de 10 kDa (Centricon fabriqué par Amicon). Les échantillons sont ensuite lyophilisés. Dans la seconde étape d'inactivation, l'AbfB₂ est incubée avec une concentration de 100 mM de EDC et de 260 mM de glycine éthyle ester radioactive (1 µCi) pendant 3 heures ou encore avec seulement 200 mM de [¹⁴C]EAC (2 µCi) pendant 22 heures. Finalement, l'enzyme est introduite dans une cassette à dialyse de marque Pierce d'une porosité de 10 kDa, dialysée deux fois pendant 8 à 16 heures dans un litre d'eau distillée et lyophilisée.

18. AUTORADIOGRAMME

Tout d'abord, une migration des protéines radiomarquées dans un gel de polyacrylamide est effectuée avec l'appareil Mini-PROTEAN[®] II de Bio-Rad selon la méthode de Laemmli (section 9.2). Les protéines sont par la suite fixées dans une solution contenant 25% (v/v) d'isopropanol et 10% (v/v) d'acide acétique pendant 30 minutes. Le gel est submergé pendant 30 minutes avec agitation dans la solution d'amplification contenant un réactif fluorogénique (Amplify de Amersham Life Science). Le gel est finalement séché sous vide pendant une heure avant d'être exposé à un film X-OMAT[™] de Kodak. Le temps d'exposition dépend de la quantité de radioactivité dans le gel (voir tableau dans le livre du fabricant).

RÉSULTATS

III. RÉSULTATS

1. CONSTRUCTION ET AMPLIFICATION DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE

La partie du gène codant pour le domaine catalytique de l' α -L-arabinofuranosidases B contenue dans le fragment d'ADN matrice de 3,9 kpb provenant du plasmide pIAF31 a été amplifiée à l'aide des amorces XlnAAbf 2 et AbfB 3' (Tableau VII). Le fragment obtenu est d'une longueur de 939 paires de bases (Figure 6). Par la suite, l'ADN codant pour le peptide signal de la xylanase A a été amplifié avec les amorces XlnA 5' et XlnAAbf 3 (Tableau VII) en utilisant le plasmide pIAF933 comme matrice. Un fragment de 148 paires de bases a été obtenu (Figure 6). Un PCR recombinant a été effectué pour joindre l'ADN du peptide signal et l'ADN du domaine catalytique préalablement amplifiés. L'amplification de la totalité du gène donne un fragment d'une longueur de 1046 paires de bases (Figure 6). Cette dernière a été réalisée en utilisant les amorces XlnA 5' et AbfB 3' qui possèdent respectivement les sites de restriction *SphI* et *SacI* nécessaires pour l'insertion du gène dans le plasmide (Tableau VII). Deux oligonucléotides (Mut 1 et Mut 2) (Tableau VII) ont été utilisés pour permettre l'enlèvement du site de restriction *SphI* contenu dans l'ADN du domaine catalytique de l'AbfB. L'enlèvement de ce site de restriction (GCATGC) permettra le clonage du gène muté dans le plasmide pIAFC109. Pour ce faire, deux PCR ont été effectués en parallèle pour permettre la mutation dans la portion de l'ADN qui code pour l'extrémité N-terminale de la protéine chimère et dans la portion de l'ADN qui code pour l'extrémité C-terminale de la protéine chimère. Deux fragments de 452 paires de base et de 627 paires de bases ont été générés (Figure 6). Ceux-ci ont ensuite été utilisés comme matrice pour permettre l'amplification complète du gène muté. Les fragments possédant une région complémentaire au niveau de la mutation s'apparieront et il y aura amplification de la totalité du gène. Pour vérifier si la mutation a été effectuée, le fragment a été digéré avec l'endonucléase *SphI*. Puisqu'un seul fragment a été visualisé sur gel d'agarose, le site de restriction a bel et bien été éliminé. (Figure 7)

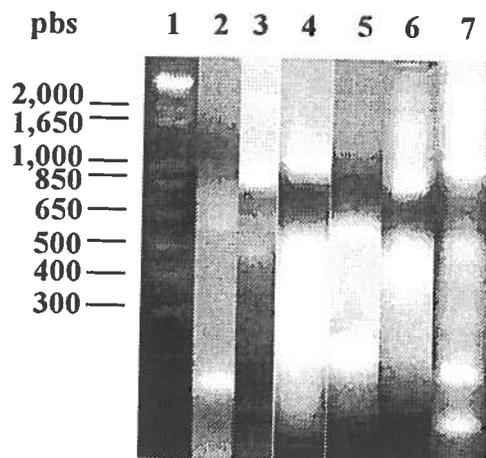


Figure 6 : Gels d'agarose montrant les différents fragments d'ADN amplifiés par PCR nécessaires à l'enlèvement du site de restriction *SphI* contenu dans le domaine catalytique de l'AbfB et à la création de la protéine chimère.

Légende :

- 1 : standards de poids moléculaire 1 kb (GibcoBRL)
- 2 : fragment codant pour le peptide signal de la xylanase A (148 pbs)
- 3 : fragment codant pour le domaine catalytique de l'AbfB (939 pbs)
- 4 : fragment codant pour la protéine chimère composé des fragments 2 et 3 (1046 pbs)
- 5 : fragment muté codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine chimère (627 pbs)
- 6 : fragment muté codant pour l'extrémité C-terminale de la protéine chimère (452 pbs)
- 7 : fragment codant pour la protéine chimère mutée (1046 pbs)

2. SOUS-CLONAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE

Le fragment d'ADN codant pour la protéine chimère mutée a été sous-cloné dans le plasmide à copies multiples pIAFC109 entre les sites *SphI* et *SacI* (Figure 8) générant un nouveau plasmide nommé pIAF942. L'insertion du fragment à cet endroit a permis l'inactivation du gène de la tyrosinase qui est une enzyme intermédiaire dans la voie de synthèse de la mélanine. La majorité des colonies sur milieu R5 étaient donc blanches. 100 colonies ont été repiquées sur un milieu Bennett-Thio. Ces mêmes colonies ont par la suite été repiquées sur un milieu de détection Stewart-4MUA (Annexe IV). De ces 100 colonies, seulement 9 ont été sélectionnées. Ces dernières possédaient un halo fluorescent lorsque exposées aux ultraviolets, ce qui indique la présence d'une enzyme capable de dégrader la molécule méthylumbelliféryle- α -L-arabinopyranoside (4-MUA) (Figure 9). Ces 9 colonies ainsi qu'un clone négatif ont été encore une fois repiquées sur milieu Bennett-Thio et sur milieu Stewart-4MUA. De ces 9 clones, quatre ont été sélectionnés aléatoirement et mis en culture dans un milieu M14-xylose. L'analyse des surnageants de culture des clones par SDS-PAGE et immunodétection de type Western à 48 et 72 heures d'incubation a démontré la sécrétion d'une protéine majoritaire qui réagissait avec les anticorps primaires d'antisérum de lapin spécifique à l'AbfB chez le clone 5. De plus, l'extraction et la digestion de plasmides aux sites *SphI* et *SacI* a permis de visualiser un fragment de 1034 paires de base chez le clone 5 suite à une électrophorèse sur gel d'agarose confirmant la présence du fragment codant pour la protéine chimère mutée.

3. SÉQUENÇAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE

Le séquençage du fragment d'ADN d'une longueur de 1034 pbs a permis de confirmer la mutation effectuée pour éliminer le site de restriction *SphI* (Figure 10). Cependant, une substitution C→A à l'avant dernier nucléotide de l'extrémité 3' du gène codant pour le peptide signal a été notée. Cette mutation aura pour effet de remplacer

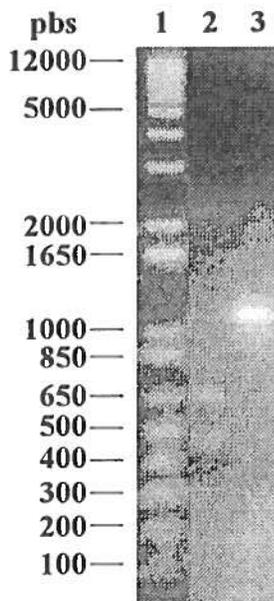


Figure 7 : Gel d'agarose montrant la mutation du site de restriction *SphI* contenu dans le gène codant pour le domaine catalytique de l'AbfB.

Légende :

- 1 : standards de poids moléculaire 1 kb Plus (GibcoBRL)
- 2 : fragments d'ADN obtenus suite à la digestion par l'endonucléase *SphI* du gène codant pour la protéine chimère n'ayant pas été mutée
- 3 : fragment d'ADN obtenu suite à la digestion par l'endonucléase *SphI* du gène codant pour la protéine chimère ayant été mutée

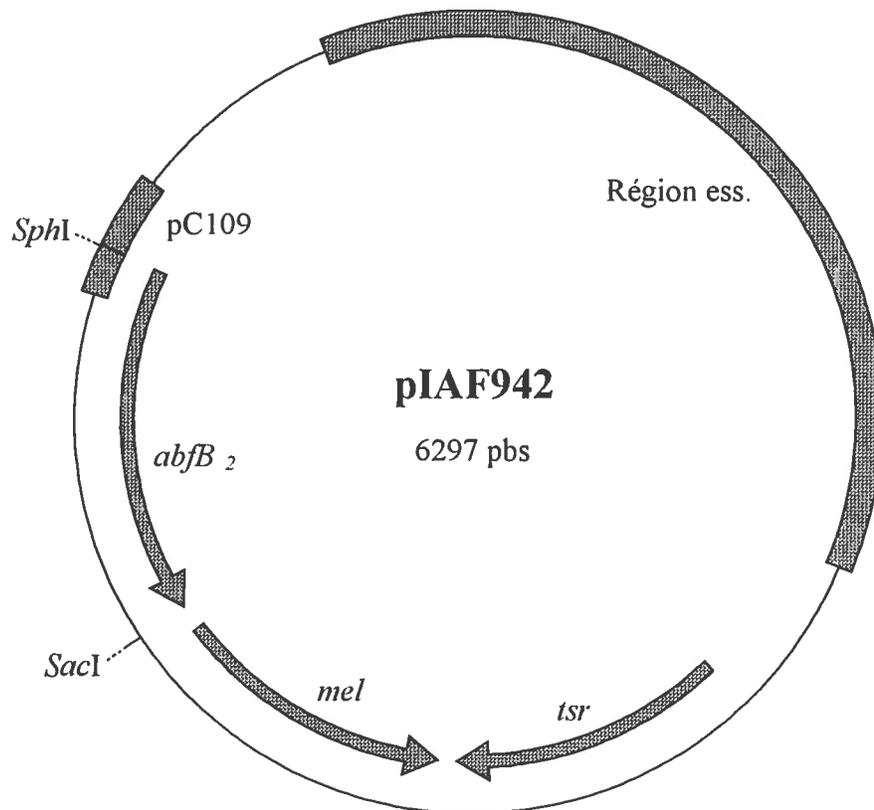


Figure 8 : Représentation du plasmide pIAF942. Le plasmide pIAF942 a été construit à partir du plasmide pIAFC109 et du fragment d'ADN codant pour la protéine chimère mutée sous-cloné entre les sites de restriction *SphI* et *SacI*. Région ess., région essentielle à la réplication du plasmide; *tsr*, gène de résistance à la thiostreptone; *mel*, gène codant pour l'enzyme tyrosinase; *abfB₂*, gène codant pour le domaine catalytique muté de l'AbfB; *PS3-xlnA*, gène codant pour le peptide signal de la xylanase A; pC109, promoteur C109.

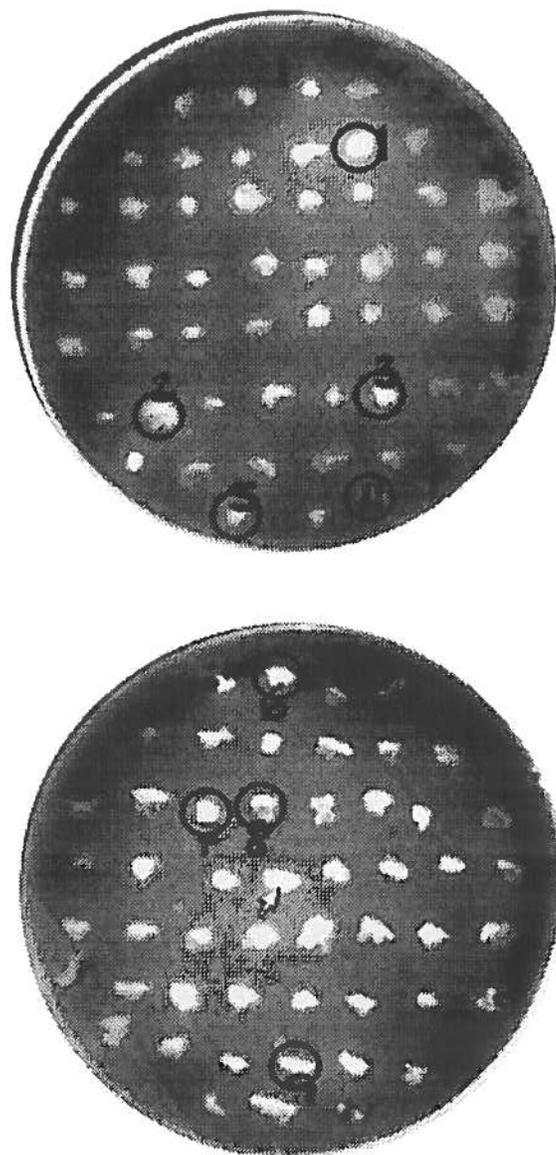


Figure 9 : Détection de la présence d'une enzyme capable de dégrader la molécule méthylumbélliféryle- α -L-arabinopyranoside (4-MUA) sur milieu minimal Stewart-4MUA (0,03% (p/v)). La fluorescence émise par certaines colonies, suite à une exposition aux ultraviolets, indique la présence d'une enzyme capable de dégrader la molécule de 4-MUA. Les clones sélectionnés sont encerclés en noir. Il ne faut pas tenir compte des numéros et de la flèche.

5' CATGCGCTCCTACGCCCTTCCCAGATCAGGTGTCCGCAGGAGCATTTCGCGTCTGCTGCTGGC
 M G S Y A L P R S G V R R S I R V L L A L A
 GCTGGTTCGTCGGCGTACTCGGCACGGCCACCGCACTGATCGCGCCCGCCGGGGGCACACG&CGACG
 L V V G V L G T A T A L I A P P G A H D D
 GCACGTGTGCGCTTCCGTCGACGTACCGGTGGTCTCGACGGGGTCTGGCACAGCCGAAGAGC
 G T C A L P S T Y R W S S T G V L A Q P K S
 GGGTGGGTTCGCGCTGAAGGACTTCACCACGGTGACGCACAACGGCAGGCACCTGGTCTACGGGTC
 G W V A L K D F T T V T H N G R H L V Y G S
 GACCTCTTCGGGGTCTCGTACGGCTCGATGGTGTTCAGCCCCTTCACCAACTGGTTCGGACATGG
 T S S G S S Y G S M V F S P F T N W S D M
 CGTCGGCCGGACAGAACCGGATGAACCAGGCCGCGGTGGCGCCCACGCTGTTCTACTTCGCGCCC
 A S A G Q N A M N Q A A V A P T L F Y F A P
 AAGAACATCTGGGTGCTGGCGTACCAGTGGGGCTCGTGGCCCTTCATCTACCGCACGTCGAGCGA
 K N I W V L A Y Q W G S W P F I Y R T S S D
 CCCCACCGACCCCAACGGCTGGTCCGCTCCGCAGCCGCTGTTACCGGGAGCATCTCCGGCTCCG
 P T D P N G W S A P Q P L F T G S I S G S
 ACACCGGCCCGATCGATCAGACCCTGATCGCCGACGGCCAGAACATGTACCTGTTCTTCGCGCGGT
 D T G P I D Q T L I A D G Q N M Y L F F A G
 GACAACGGCAAGATCTACCGGGCGTCGATGCCGATCGGGAACTTCCCGGGCAACTTCGGTTCCTC
 D N G K I Y R A S M P I G N F P G N F G S S
 GTACACGACGATCATGAGCGACACGAAGGCCAACCTGTTTCGAGGGCGTACAGGTCTACAAGGTCC
 Y T T I M S D T K A N L F E G V Q V Y K V
 AGGGCCAGAACCAGTACCTCATGATCGTTCGAGGCGATGGGCGCGAACGGGGCGCTACTTCCGCTCC
 Q G Q N Q Y L M I V E A M G A N G R Y F R S
 TTCACGGCCTCCAGTCTGAGCGGCTCGTGGACCCCGCAGGCCCGCCAGTGAGGGCAACCCCTTCGC
 F T A S S L S G S W T P Q A A S E G N P F A
 GGGCAAGGCCAACAGCGGGGCCACCTGGACCAACGACATCAGCCACGGCGACCTGGTCCGCGACA
 G K A N S G A T W T N D I S H G D L V R D
 ACCCCGACCAGACCATGACCGTCGACCCCTGCAACCTGCAGTTCCTCTACCAGGGCAAGTCCCCG
 N P D Q T M T V D P C N L Q F L Y Q G K S P
 AACCGGGCGGGGACTACAACCTCGCTGCCGTGGCGGCCGGGAGTCTCACCTGCGGGCACTGAG3'
 N A G G D Y N S L P W R P G V L T L R H

Figure 10 : Séquence d'ADN obtenue lors du séquençage du fragment d'ADN associé à la protéine chimère mutée qui a été sous-cloné dans le plasmide pIAFC109. La partie en caractère gras représente la séquence d'ADN codant pour le domaine catalytique de l'AbfB alors que l'autre partie correspond à la séquence d'ADN codant pour le peptide signal de la xylanase A. La partie soulignée représente le codon muté pour éliminer le site de restriction *Sph*I. La croix rouge indique la substitution qui a eu lieu à l'extrémité 3' de la séquence d'ADN du peptide signal.

l'acide aminé alanine pour un acide aspartique. Comme la protéine était sécrétée et que son poids moléculaire sur le gel de polyacrylamide correspondait au poids moléculaire attendu, le clone 5 a donc été lyophilisé pour la conservation.

4. PRODUCTION DE L'ENZYME

L'enzyme AbfB₂ a été produite par fermentation dans un milieu minimal M15 (Annexe VIII) contenant du glucose comme source de carbone ou encore dans un milieu minimal M14 contenant du xylose (Annexe VII). Les analyses effectuées sur des prélèvements à 24, 30, 48, 54 et 72 heures d'incubation indiquent que le milieu M15 n'est pas favorable à la sécrétion d'AbfB₂ comparativement au milieu M14. En effet, il n'y a eu aucune augmentation du volume de mycélium compact humide (PMV) et de la quantité de protéines sécrétées dans le milieu M15 (Tableau IX). Quant au milieu M14, il offre une bonne croissance bactérienne et une bonne sécrétion protéique (Tableau X). Par contre, une baisse de pH a été observée chez ce dernier, nous obligeant à interrompre la culture à 72 heures.

5. PURIFICATION DE L'ENZYME

L'enzyme a été purifiée à l'aide de trois étapes décrites dans le tableau XI. Tout d'abord, le surnageant de culture a été concentré 14 fois. L'AbfB₂ a été purifiée sur une colonne échangeuse de cations (CM Sepharose) par chromatographie liquide. L'enzyme a été éluée avec un gradient de chlorure de sodium à partir de 0,3 M en un seul pic. Cette étape permet la séparation de l'enzyme d'un pigment qui ne se fixe pas à la résine. Comme les fractions contenant l'enzyme n'étaient pas encore pures, un tamis moléculaire a été effectué (Figure 11).

Tableau IX : Données recueillies sur les différentes analyses effectuées lors de la production d'AbfB₂ en milieu minimal M15.

Prélèvements (heures)	pH	PMV (%)	[Protéines extracellulaires] (mg/mL)
24	7,45	<1	0,233
30	7,44	<1	0,221
48	7,26	1	0,249
54	7,43	1	n.d.
72	7,47	1	n.d.

PMV : volume de mycélium compact humide

n.d.: non-déterminé

Tableau X : Données recueillies sur les différentes analyses effectuées lors de la production d'AbfB₂ en milieu minimal M14.

Prélèvements (heures)	pH	PMV (%)	[Protéines extracellulaires] (mg/mL)
24	7,08	1,0	0,327
30	7,03	1,5	0,363
48	6,87	3,0	0,538
56	6,09	4,5	0,515
72	5,45	4,5	0,777

PMV : volume de mycélium compact humide

Tableau XI : Différentes étapes nécessaires à la purification de l'enzyme AbfB₂ produite en fermenteur.

Étapes	Volume (mL)	Concentration (mg/mL)	Protéines totales (mg)	Rendement (%)
Surnageant de culture	7000	0,39	2730,0	100
Après concentration au Pellicon	610	1,46	890,6	32,6
Après CM Sepharose	166	1,64	272,2	10,0
Après tamis moléculaire	374	0,65	243,4	8,9

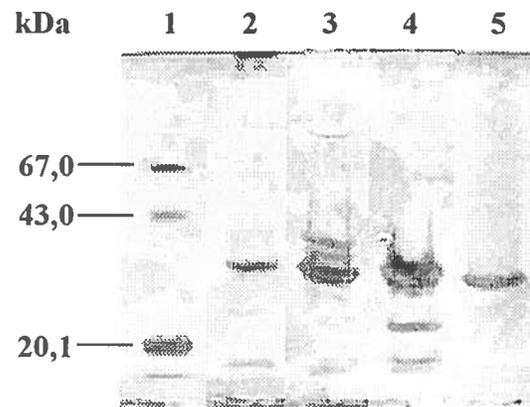


Figure 11 : Gels SDS-PAGE 12,5% des différentes étapes nécessaires pour purifier l'enzyme AbfB₂.

Légende :

- 1 : standards de poids moléculaire
- 2 : surnageant de culture
- 3 : après concentration au Pellicon
- 4 : après CM Sepharose
- 5 : après tamis moléculaire

6. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME

6.1 Séquençage N-terminal de l'enzyme

Le séquençage de l'extrémité N-terminal de l'enzyme a été effectué suite à l'identification de la mutation à l'extrémité 3' du gène du peptide signal lors du séquençage. La séquence des 15 premiers acides aminés obtenue est : GAHDDGTXALPSTYR (X étant un acide aminé non identifié lors du séquençage). La protéine sécrétée contient 4 acides aminés (GAHD) qui appartiennent à la séquence C-terminal du peptide signal de la xylanase A. Le poids moléculaire théorique de l'enzyme est donc maintenant de 33 187,7 Da au lieu de 32 807,3 Da.

6.2 Masse moléculaire et point isoélectrique

La masse moléculaire de l'AbfB₂ déterminée par SDS-PAGE a été évaluée à 32 000 Da par rapport aux standards de poids moléculaire (Figure 12). Cette dernière ne correspond pas à la masse moléculaire prédite de l'AbfB₂ de 33 187,7 Da calculée à partir de sa séquence en acides aminés. Lors de l'analyse de la protéine en spectrométrie de masse deux espèces moléculaires étaient présentes. L'une ayant une masse de 33 183,4 Da et l'autre ayant une masse de 32 915,9 Da (Figure 13). Ces dernières étaient présentes dans un ratio 1,66 : 1. Lors de la focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide, deux espèces moléculaires étaient aussi présentes. Ces dernières possèdent des points isoélectriques de 8,18 et 8,40 (Figure 14).

6.3 pH et température optimaux

Pour déterminer le pH optimal de l'enzyme, des tests d'activité enzymatique ont été effectués à différents pH en utilisant le test PAHBAH (section 11.1 de l'approche expérimentale). Ceux-ci démontrent que l'AbfB₂ est plus active lorsque le pH du tampon est de 6,0 que ce soit un tampon phosphate ou citrate (Figure 15). La température optimale de l'enzyme a aussi été déterminée en utilisant le test PAHBAH (section 11.1 de

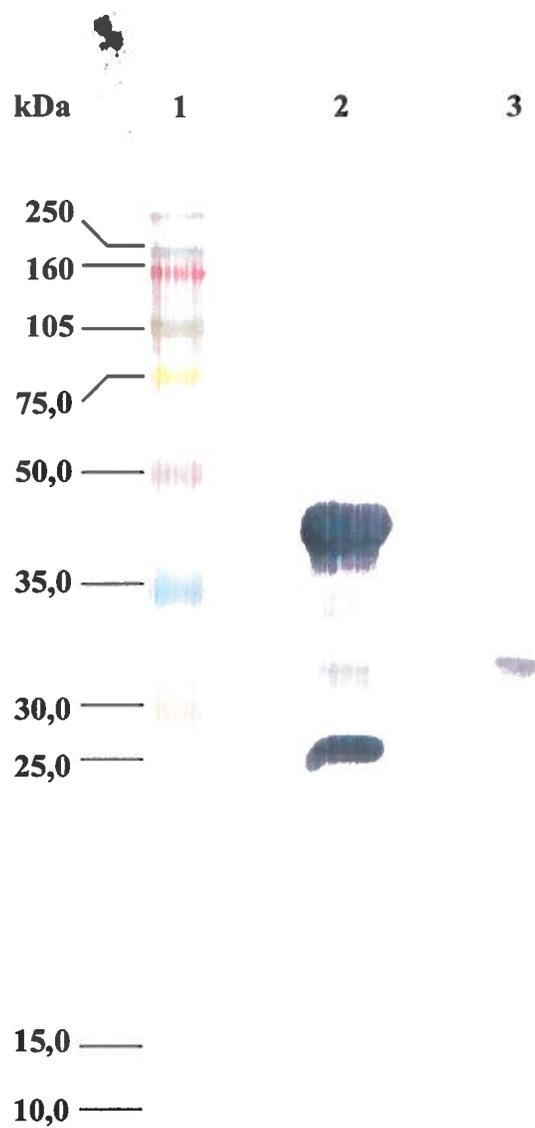


Figure 12 : Immunotransfert de type Western effectué à partir d'un SDS-PAGE 12,5% montrant le poids moléculaire de l'AbfB₂.

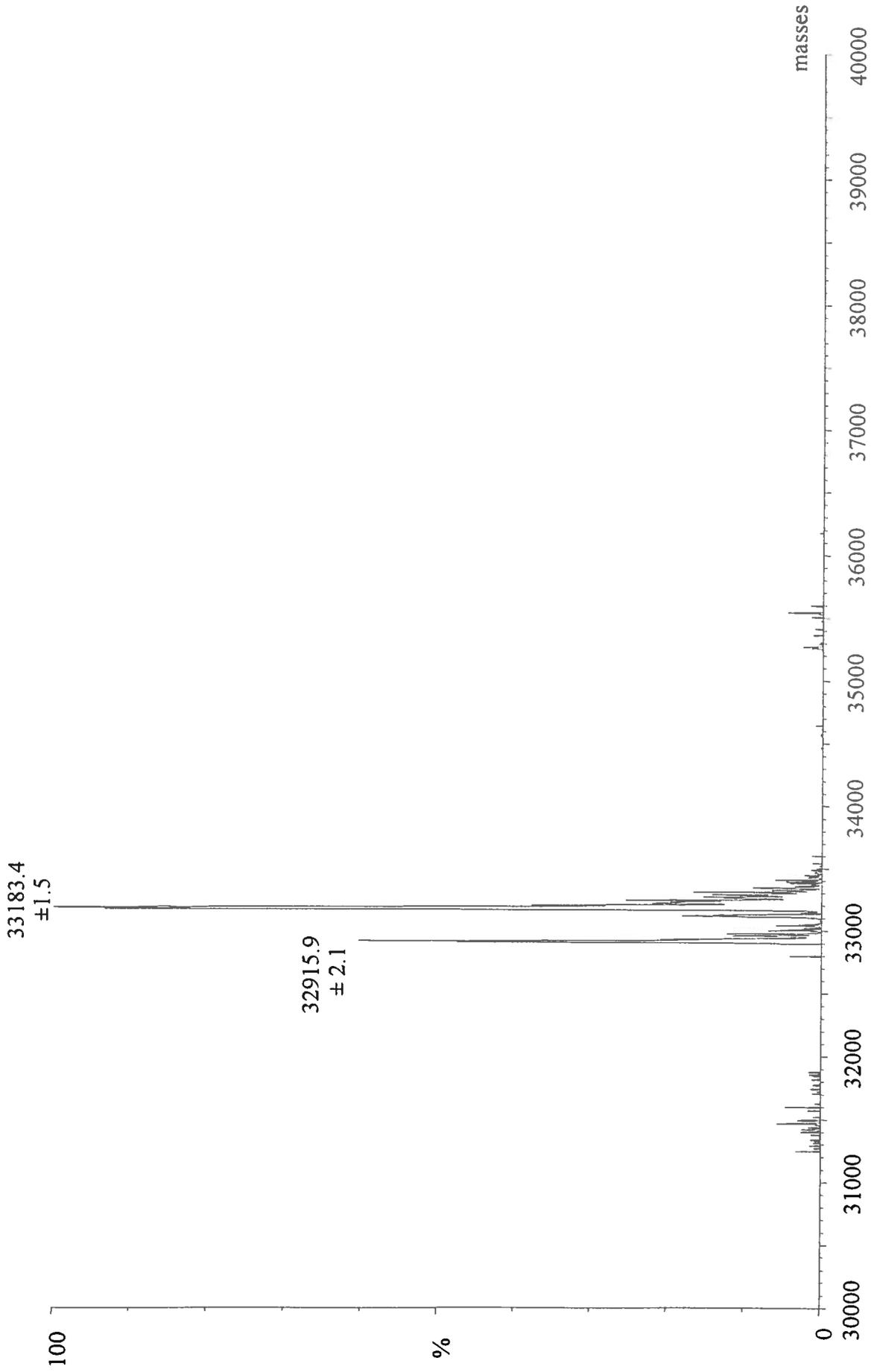
Légende :

1 : standards de poids moléculaire Rainbow mix (Amersham)

2 : AbfB complète

3 : AbfB₂

Figure 13 : Spectre de masse de l'AbfB₂. Ce spectre a été obtenu suite à la transformation des valeurs de m/z présentées à l'annexe X. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,17 kV est attribué au capillaire, un voltage de 47 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.



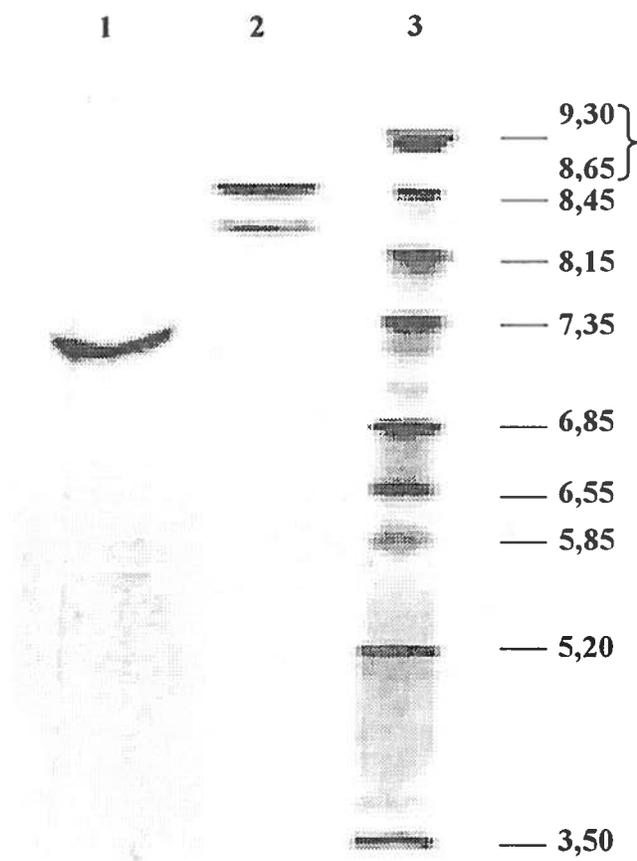


Figure 14 : Focalisation isoélectrique sur un gel de polyacrylamide de l'AbfB₂.

Légende :

1 : AbfB complète

2 : AbfB₂

3 : standards de point isoélectrique

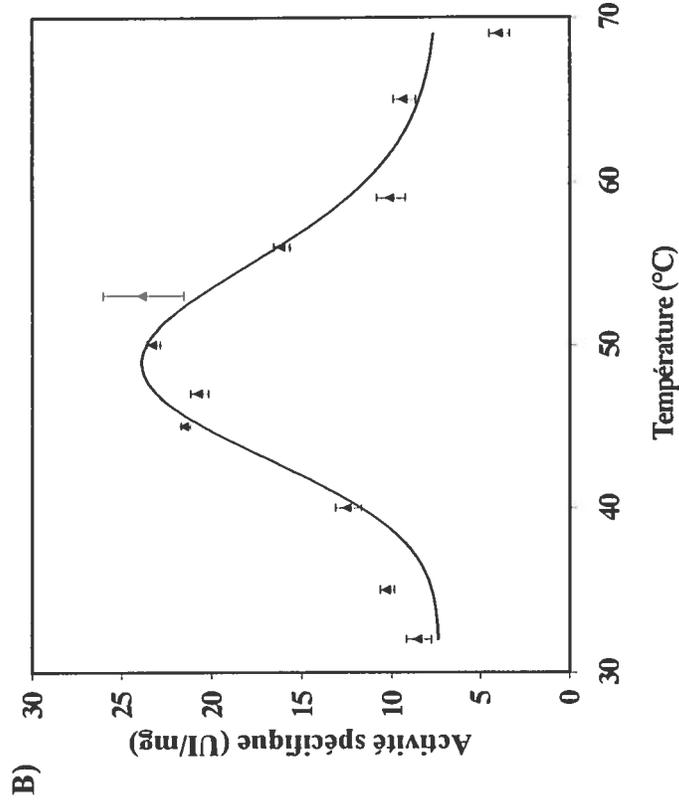
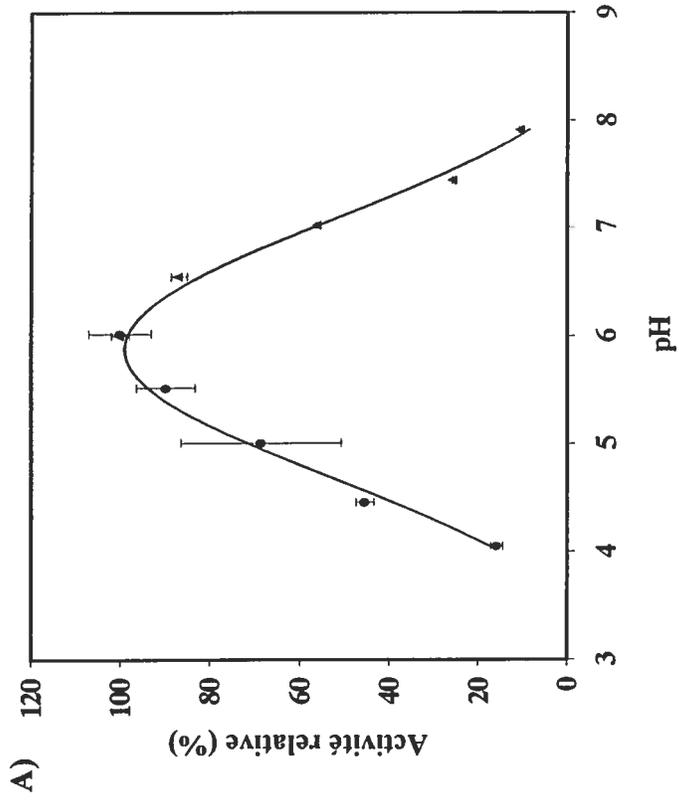


Figure 15 : Effet A) du pH et B) de la température sur l'activité enzymatique de l'AbfB₂. Le substrat xylane d'épeautres d'avoine d'une concentration de 10 mg/mL a été hydrolysé pendant 10 minutes avec 45 nM d'AbfB₂.

- Tampon phosphate de sodium 50 mM
- ▲ Tampon citrate de sodium 50 mM

l'approche expérimentale) à la valeur du pH optimal soit 6,0. La courbe de l'activité enzymatique en fonction de la température démontre une activité optimale à 49°C (Figure 15). L'activité spécifique envers la partie soluble du xylane d'épeautres d'avoine aux conditions de pH et de température optimales de l'AbfB₂ est de 699 UI/μM.

6.4 Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique a été déterminée dans les conditions de pH et de température optimales. Plusieurs tests d'activité spécifique ont été effectués à différentes concentrations de substrats (0,4 à 5,0 mg/mL) et à différents temps. Le dosage de l'arabinose libéré a été effectué par HPAEC (section 11.2 de l'approche expérimentale). Les vitesses initiales aux différentes concentrations de substrats sont déterminées à l'aide des graphiques tracés avec le logiciel informatique Sigma Plot 1997. Le K_M et le V_{max} sont déterminés en traçant une courbe de Michaelis-Menten avec le logiciel informatique Grafit version 3,09b. Les valeurs de K_M et de V_{max} sont de 2,03 mg/mL et de 1,87 μM/sec respectivement (Figure 16).

6.5 Profils d'hydrolyse

Les profils d'hydrolyse ont été effectués sur les substrats arabinoxylane de seigle, de blé et arabinane de betterave à sucre à une concentration de 10 mg/mL. La libération d'arabinose a été dosée par HPAEC (section 11.2 de l'approche expérimentale). Le substrat arabinoxylane de seigle a permis de libérer la plus grande quantité d'arabinose. (Figure 17) L'activité spécifique de l'enzyme envers l'arabinoxylane de seigle est de 492 UI/μM. Celle envers l'arabinoxylane de blé est de 366 UI/μM, alors que celle envers l'arabinane de betterave à sucre est de 9,29 UI/μM. Le dosage de l'arabinose libéré a été effectué par le test PAHBAH (section 11.1 de l'approche expérimentale).

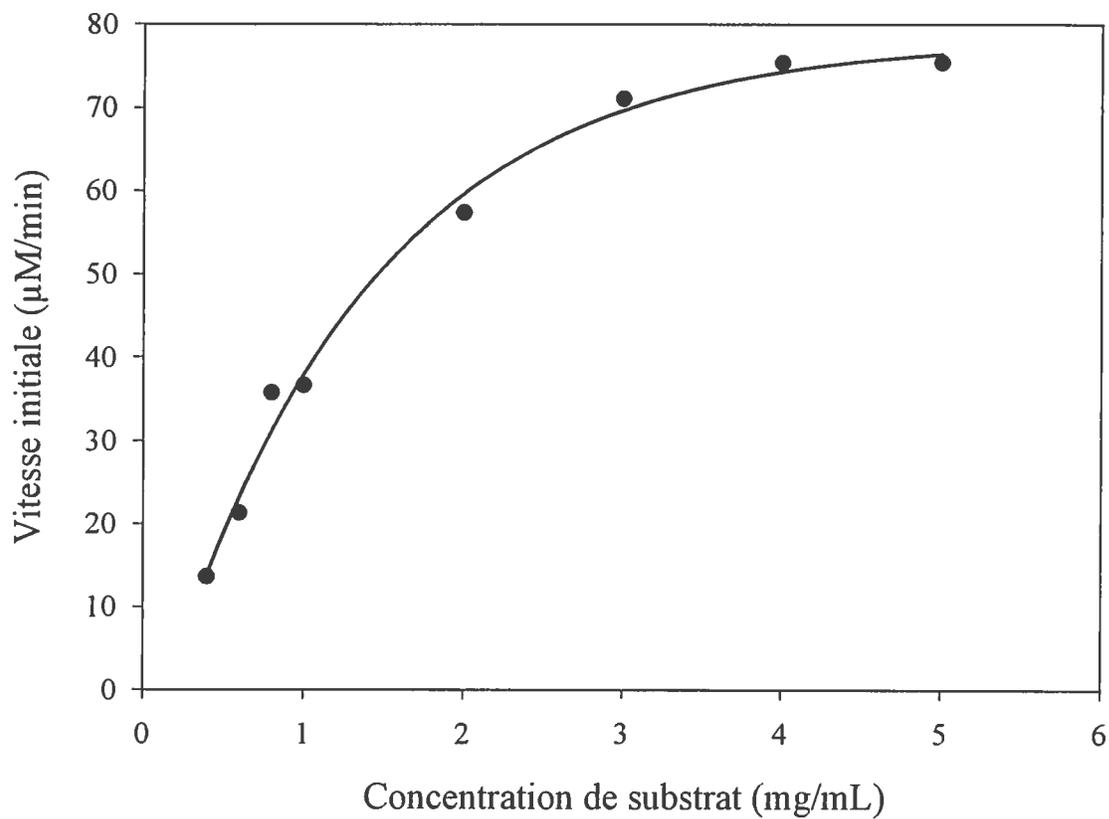


Figure 16 : Détermination du K_M et du V_{max} de l'AbfB₂. Le substrat est le xylane d'épeautres d'avoine utilisé à différentes concentrations dans du tampon citrate de sodium pH 6,0 et il a été hydrolysé avec 121 nM d'AbfB₂ à 49°C.

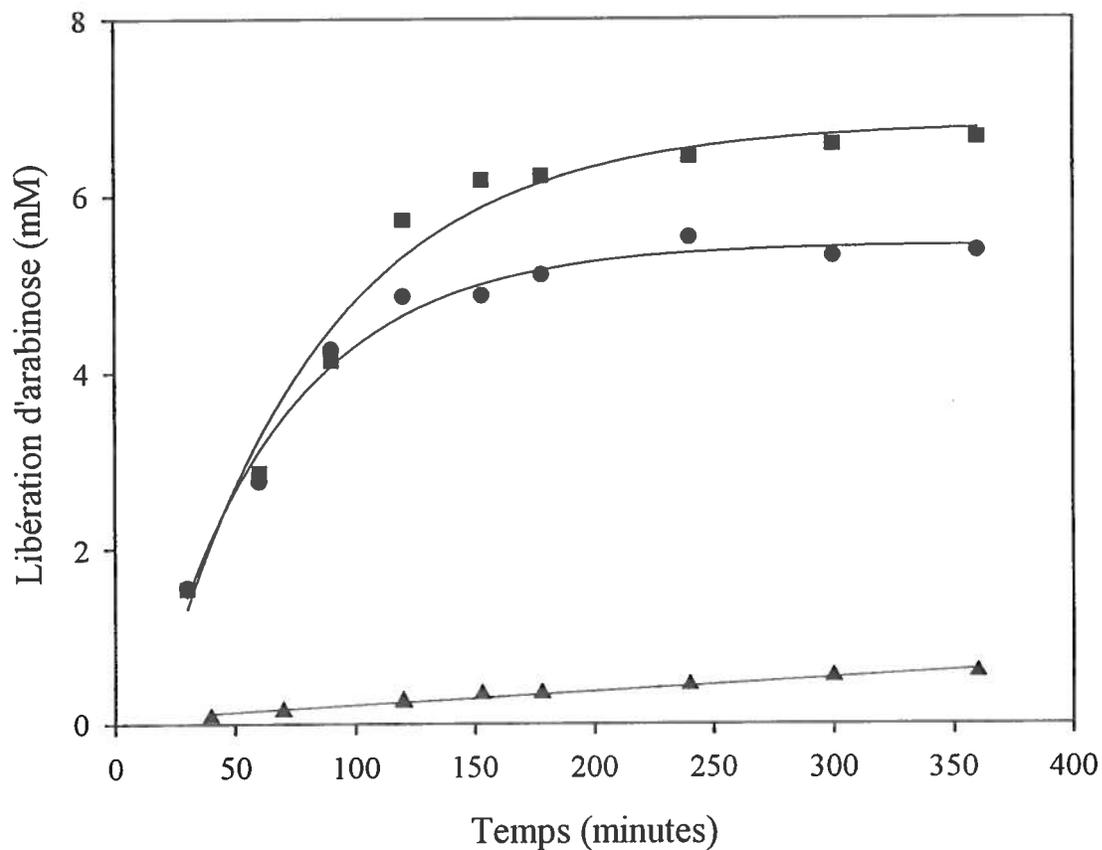


Figure 17 : Libération d'arabinose par l'AbfB₂ sur différents substrats. Différents substrats solubles à une concentration de 10 mg/mL dans du tampon citrate de sodium pH 6,0 ont été hydrolysés avec 121 nM d'AbfB₂ à 49°C.

- Arabinoxylane de blé
- Arabinoxylane de seigle
- ▲ Arabinane de la betterave à sucre

7.0 DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION

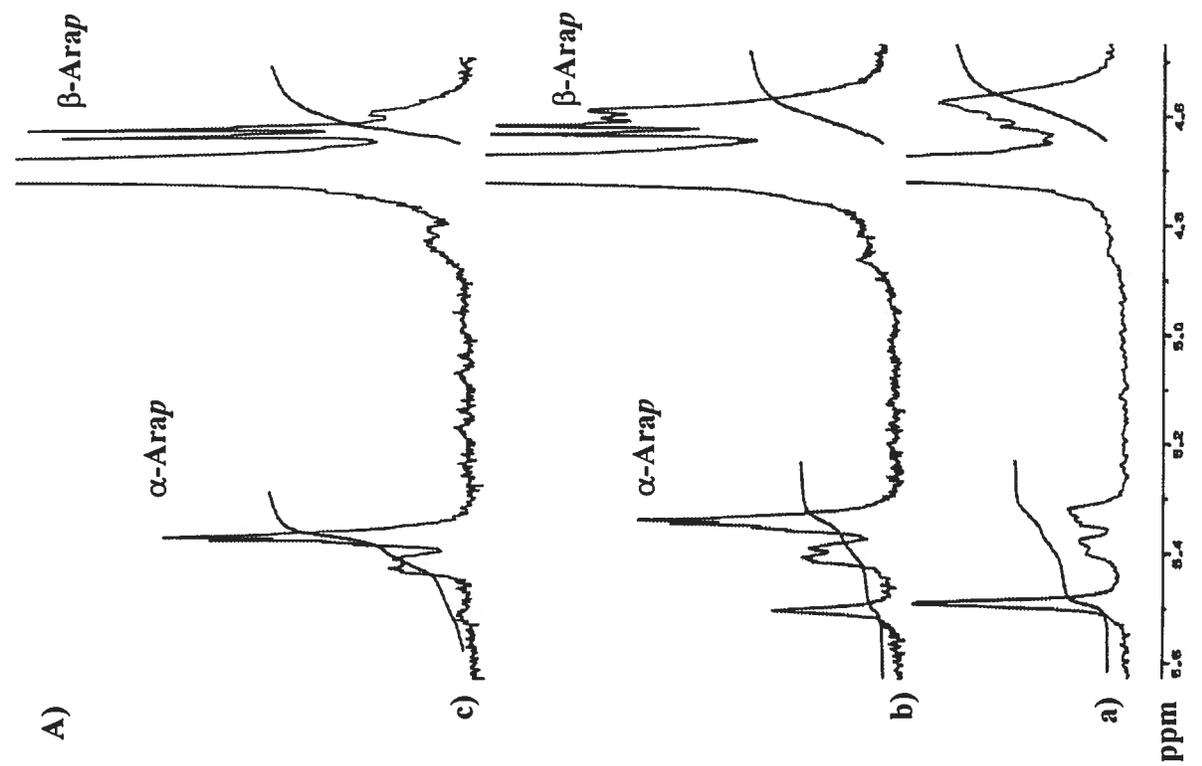
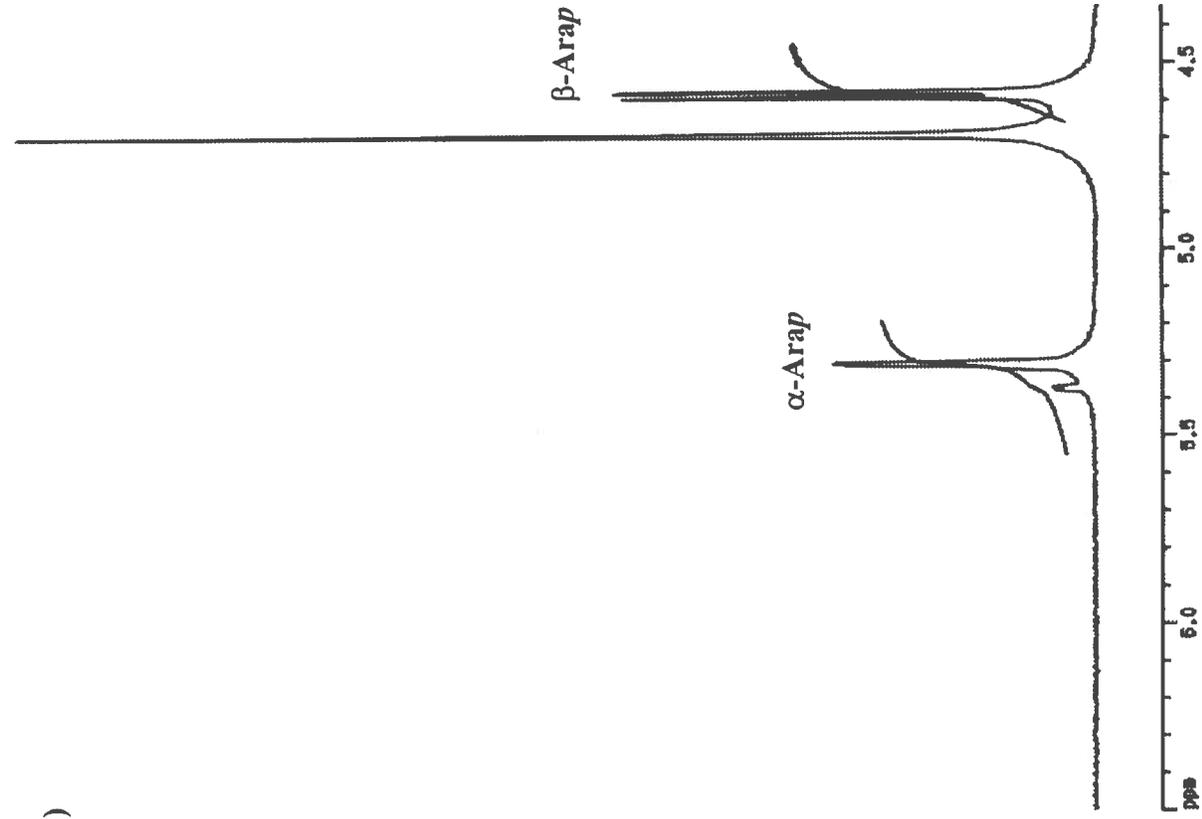
7.1 Analyses par RMN

Des analyses par RMN ont été effectuées pour déterminer le mécanisme de réaction de l'AbfB₂. Plusieurs spectres ont été enregistrés au cours du temps lors de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme. La portion des spectres correspondant à la région anomérique de l'arabinose libéré a été analysée. Il y a apparition de deux doublets au cours du temps. Ces doublets apparaissent à 5,3 ppm et à 4,6 ppm de façon proportionnelle tout au cours du temps et sont associés à la conformation α et β respectivement au niveau du carbone anomérique de l'arabinopyranose (Figure 18). L'apparition de ces doublets se fait dans le rapport 1 : 1,94 qui est identique à celui retrouvé dans les préparations commerciales de L(+)-arabinose (Figure 18).

7.2 Analyses par HPAEC

La détermination du mécanisme de réaction chez plusieurs arabinofuranosidases des familles 51 et 54 a été effectuée par Pitson et ses collaborateurs (1996). Cette dernière a été rendue possible grâce à l'utilisation du méthanol qui est un nucléophile plus puissant que l'eau. L'expérience a été reproduite en utilisant l'arabinofuranosidase A d'*A. niger* (Megazyme). Comme il a été démontré par Pitson, l'ajout de méthanol, lorsque l'enzyme hydrolyse le substrat, permet un transfert des résidus α -L-arabinofuranosyles provenant du substrat au méthanol. Un nouveau produit qui correspond au méthyle α -L-arabinofuranose a été identifié lors de l'analyse par HPAEC (Figure 19). Cependant, lorsque l'expérience a été effectuée avec l'AbfB₂ de *S. lividans*, il n'y a pas eu apparition de résidus arabinofuranosyles méthylés (Figure 20). L'expérience a aussi été effectuée avec des substrats synthétiques comme le pNP- α -L-arabinofuranoside, pNP- α -L-arabinopyranoside, le 4-MU- α -L-arabinofuranoside et le 4-MU- α -L-arabinopyranoside. Le pNP α -L-arabinopyranoside et le 4-MU α -L-arabinofuranoside étaient les substrats qui ont permis la libération d'arabinose. Cependant, il n'y a pas eu apparition de résidus arabinofuranosyles méthylés.

Figure 18 : Spectres de RMN- H^1 partiels de la région anomérique A) de l'arabinose libéré pendant l'hydrolyse de l'arabinoxylane de seigle (10 mg/mL) par l'AbfB₂ (12 μ M) et B) d'une préparation commerciale de L(+)-arabinose. Les résonances H-1 à l'extrémité anomérique des résidus d'arabinoses libérés sont indiqués comme suit : α -L-arabinopyranose (α -Arap) et β -L-arabinopyranose (β -Arap). Spectres après a) 3 minutes d'hydrolyse, b) 10 minutes d'hydrolyse et c) 15 minutes d'hydrolyse.



A)

B)

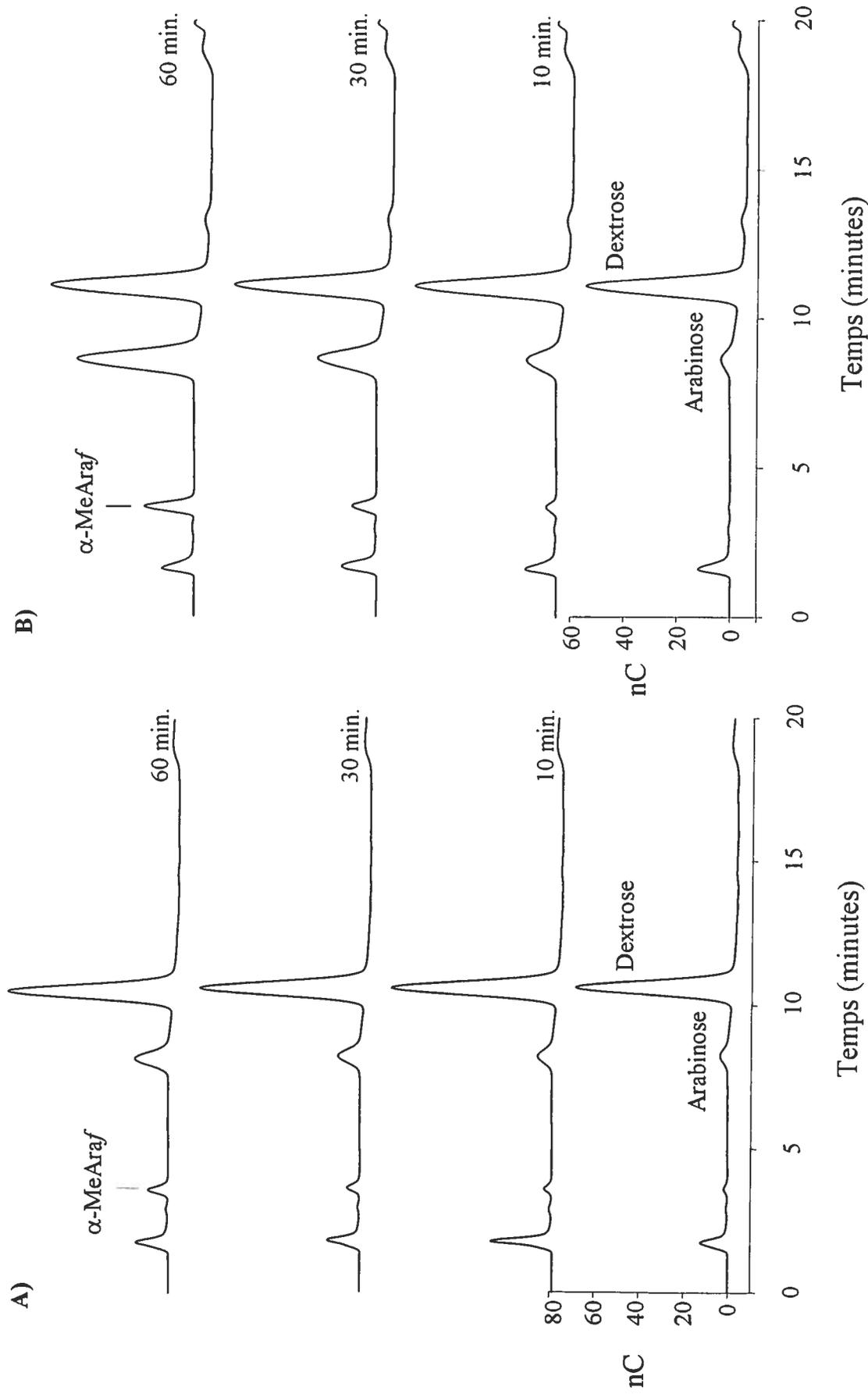


Figure 19 : HPLC des produits de la réaction de l'hydrolyse A) de l'arabinoxylane de blé 10 mg/mL et B) de l'arabinane de la betterave à sucre 10 mg/mL en présence de 2,5 M de méthanol par 30 mU d'arabinofuranosidase B d'*A. niger*. Le méthyle α -L-arabinofuranose est représenté par l'abréviation α -MeAraf. Le dextrose a été utilisé comme standard interne.

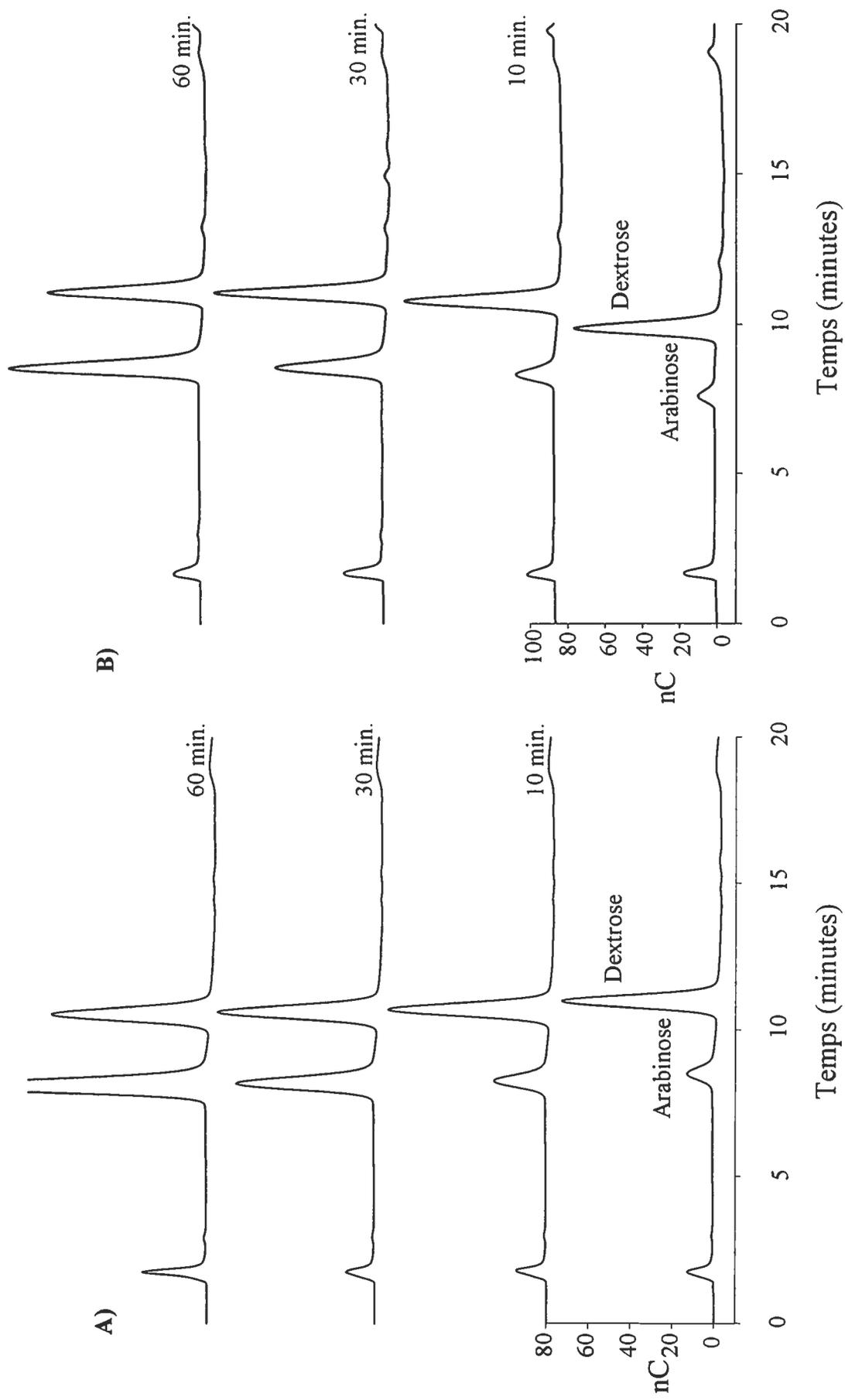


Figure 20 : HPLC des produits de la réaction de l'hydrolyse A) de l'arabinoxylane de blé 10 mg/mL et B) de l'arabinane de la betterave à sucre 10 mg/mL en présence de 2,5 M de méthanol par 30 mU d'AbfB₂ de *S. lividans*. Le dextrose a été utilisé comme standard interne.

8. MODIFICATION DE L'ENZYME PAR DES AGENTS CHIMIQUES SPÉCIFIQUES AUX RÉSIDUS CARBOXYLIQUES

8.1 Détermination de l'efficacité de différents carbodiimides

Les différents carbodiimides EDC·HCl, EAC et EDC varient grandement dans leur capacité à inhiber l'AbfB₂. Le carbodiimide EDC·HCl permet d'inhiber l'enzyme à 96% mais seulement après 20 heures d'incubation (Figure 21). Le EAC commercial provenant de la compagnie Aldrich ne réussit pas à inhiber l'AbfB₂, alors que le EAC fabriqué à partir du EDC (Fluka) possède une activité inhibitrice de 70% après 22 heures (Figure 22). Le EDC provenant de la compagnie Fluka a permis d'inhiber complètement l'enzyme après seulement 1 heure d'incubation (Figure 23). Pour cette raison, il y aura utilisation du EDC pour la suite des expérimentations. Le dosage de l'arabinose libéré suite aux tests d'hydrolyse effectués avec l'enzyme modifiée a été effectué par HPAEC.

8.2 Vérification du marquage par le carbodiimide et de l'amidation de l'enzyme

Le marquage de l'enzyme par le EDC (section 17.1 de l'approche expérimentale) a été confirmé par SDS-PAGE (Figure 24) et par spectrométrie de masse (Figure 25) en comparant le poids moléculaire de l'enzyme inactivée avec celui de l'enzyme n'ayant pas été inactivée. Une différence de migration a donc été observée entre l'enzyme inactivée et l'enzyme n'ayant pas été inactivée (Figure 24). De plus, les masses de l'enzyme inactivée sont plus élevées et sont comprises entre 33 500 et 34 600 Da lors de l'analyse en spectrométrie de masse (Figure 25). Le point isoélectrique a augmenté à 8,80 suite à l'inactivation de l'enzyme (Figure 24) et il y eu perte du doublet présent chez la protéine n'ayant pas été inactivée.

Le marquage de l'enzyme a aussi été effectué en utilisant un amine, la glycine méthyle ester. L'enzyme complètement inactivée possède un poids moléculaire et un point isoélectrique différents de l'enzyme n'ayant pas été inactivée (Figure 26). La protéine inactivée a migré plus loin sur le gel de polyacrylamide que la protéine n'ayant

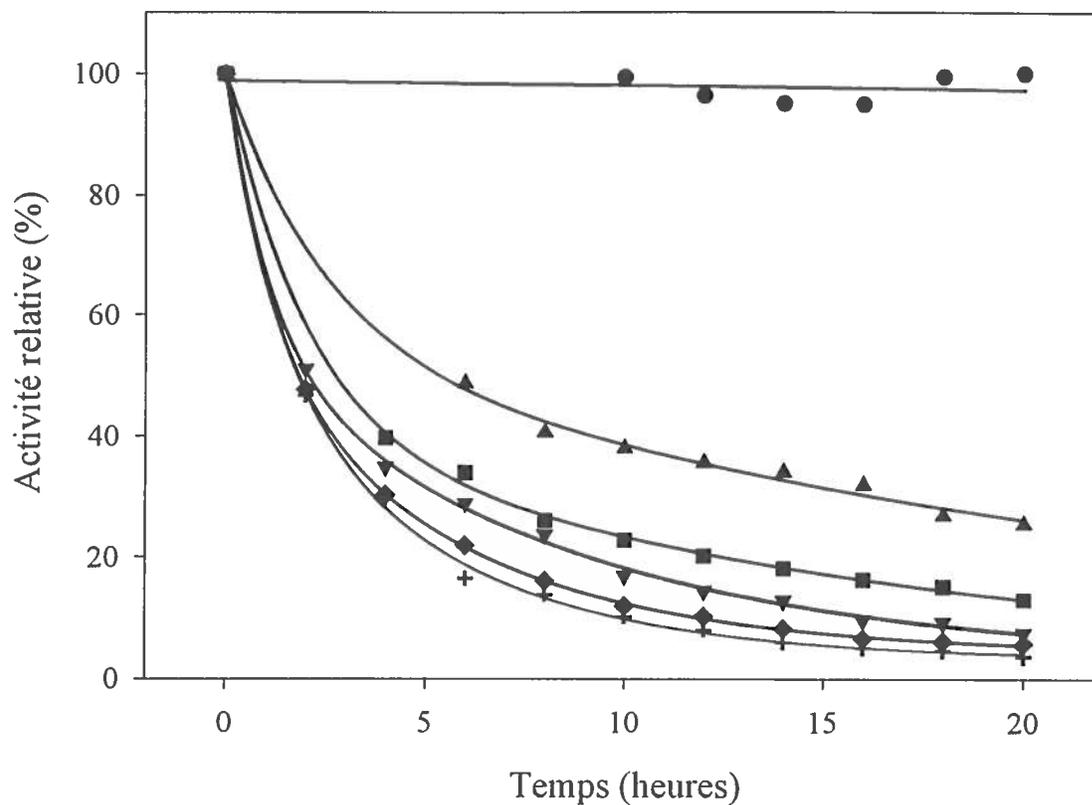


Figure 21 : Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EDC·HCl. L'AbfB est incubée avec l'inhibiteur pour la durée indiquée et l'activité résiduelle est mesurée en incubant 0,125 μ M d'enzyme modifiée avec de l'arabinoxylane de blé 10 mg/mL dans du tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,0 à 50°C. Le dosage de l'arabinose libéré a été évalué par HPAEC.

- 0 mM EDC-HCl
- ▲ 10 mM EDC-HCl
- 20 mM EDC-HCl
- ▼ 30 mM EDC-HCl
- ◆ 40 mM EDC-HCl
- + 50 mM EDC-HCl

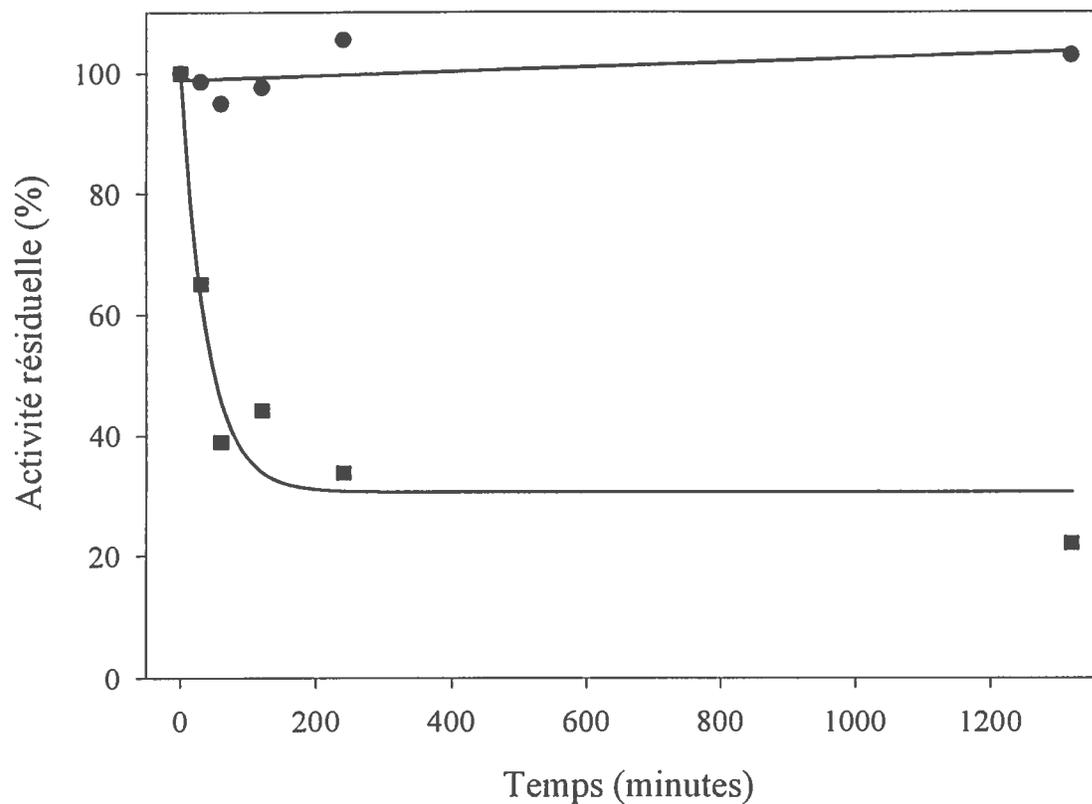


Figure 22 : Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EAC. L'AbfB est incubée avec l'inhibiteur pour la durée indiquée et l'activité résiduelle est mesurée en incubant 0,125 μ M d'enzyme modifiée avec de l'arabinoxylane de blé 10 mg/mL dans du tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,0 à 50°C. Le dosage de l'arabinose libéré a été évalué par HPAEC.

● 0 mM EAC

■ 50 mM EAC

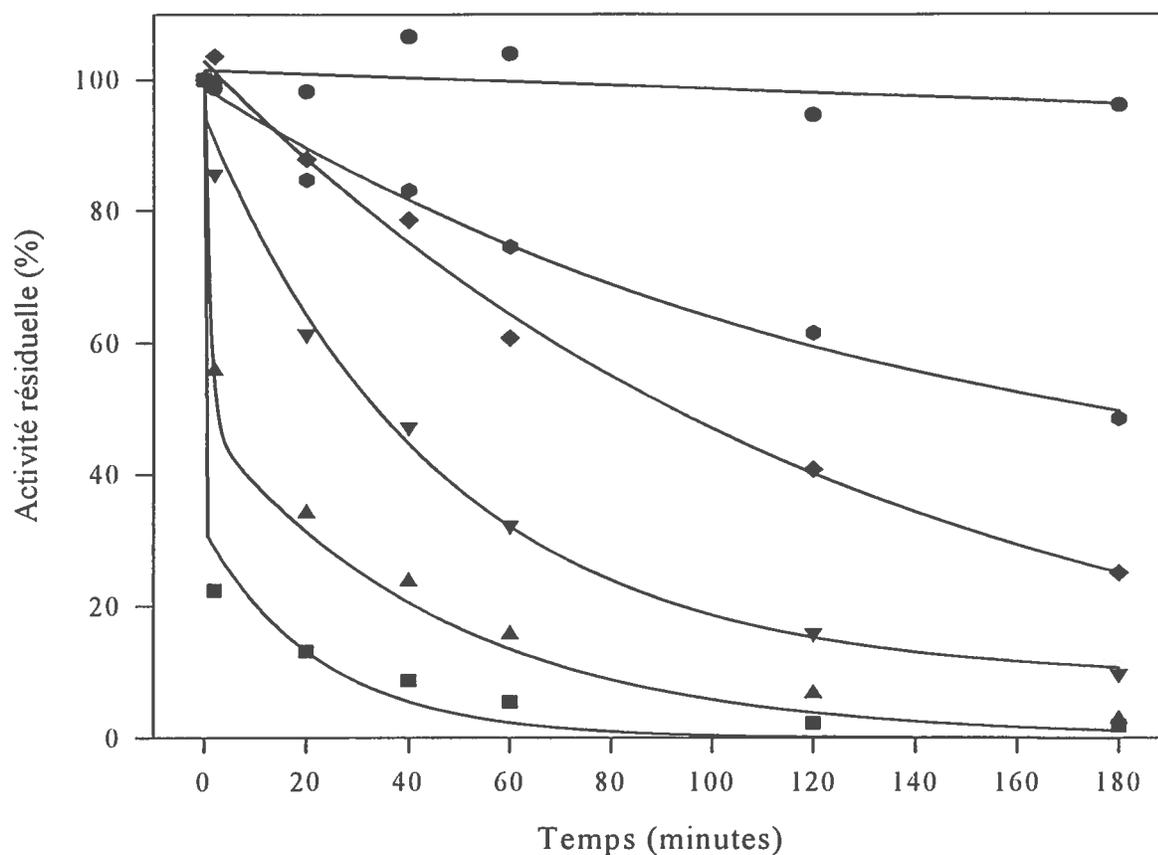


Figure 23 : Inactivation des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec le carbodiimide EDC. L'AbfB est incubée avec l'inhibiteur pour la durée indiquée et l'activité résiduelle est mesurée en incubant 0,125 μ M d'enzyme modifiée avec de l'arabinoxylane de blé 10 mg/mL dans du tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,0 à 50°C. Le dosage de l'arabinose libéré a été évalué par HPAEC.

- 0 mM EDC
- ◆ 20 mM EDC
- ◆ 40 mM EDC
- ▼ 60 mM EDC
- ▲ 80 mM EDC
- 100 mM EDC

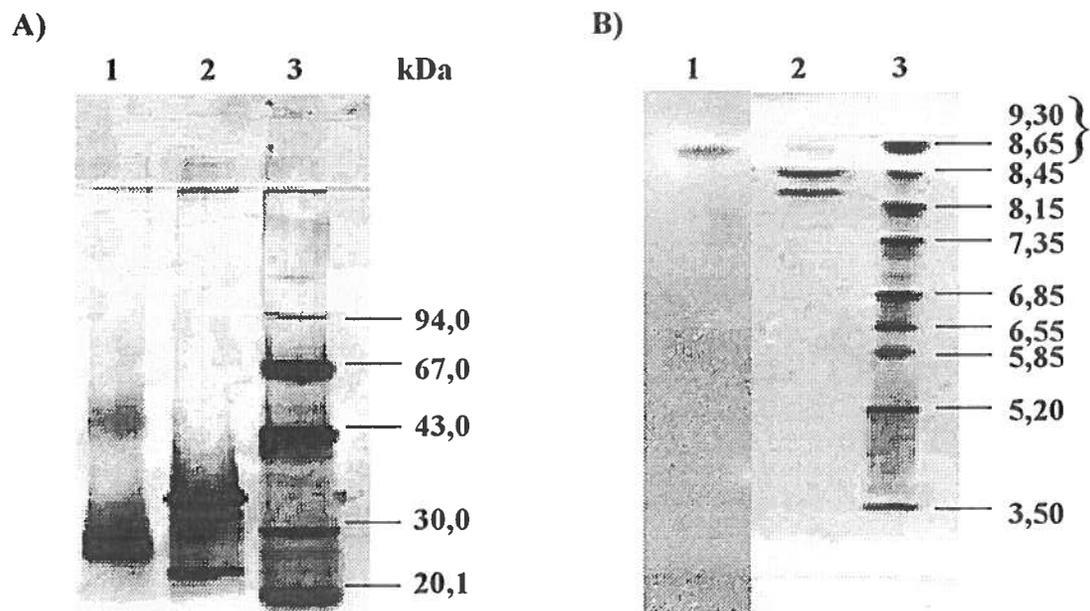


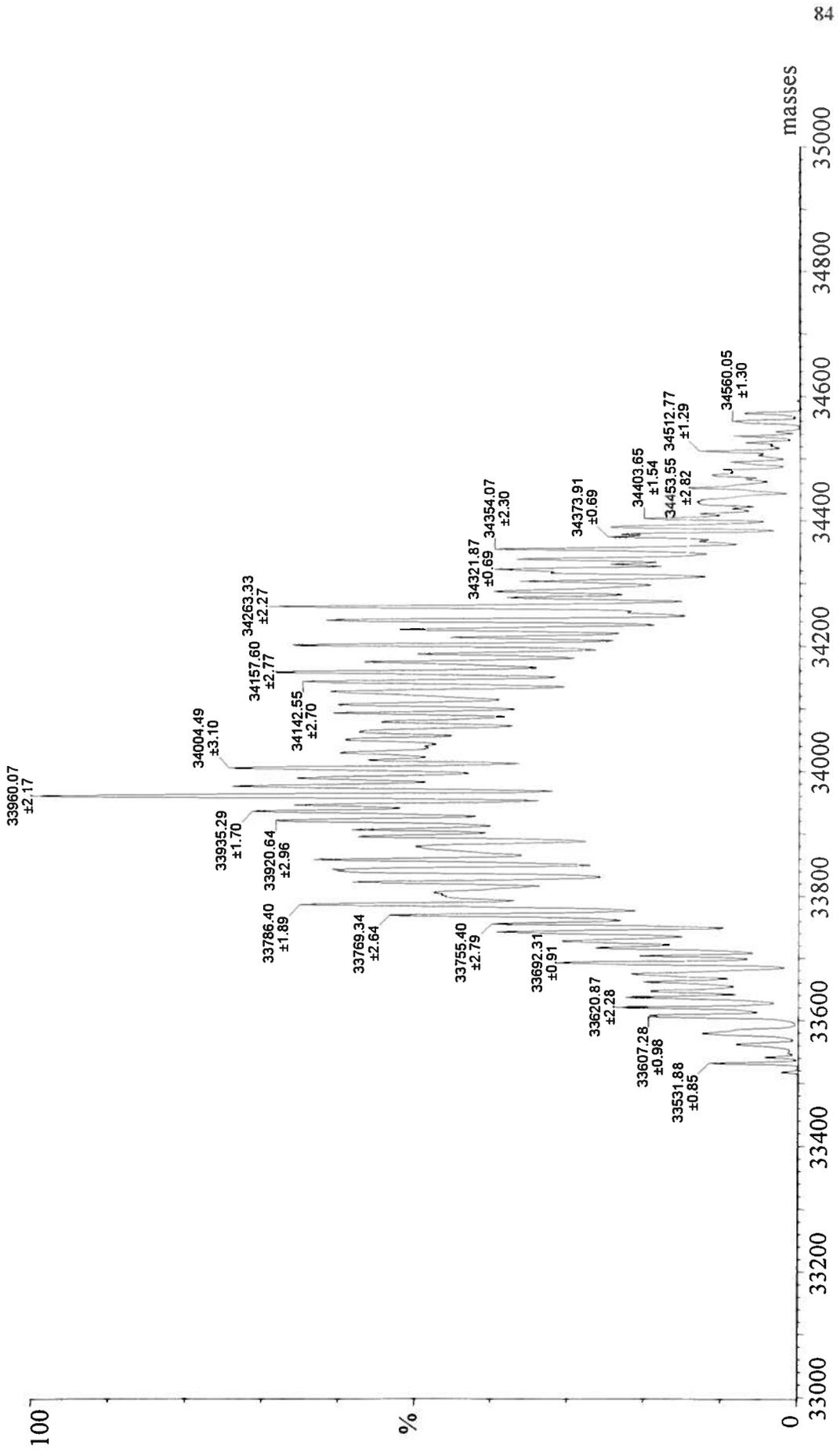
Figure 24 : A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide de l'AbfB₂ ayant subi une inactivation à l'aide du carbodiimide EDC.

Légende :

1 : AbfB₂ inactivée
 2 : AbfB₂
 3 : Standards de poids moléculaire

1 : AbfB₂ inactivée
 2 : AbfB₂
 3 : Standards de point isoélectrique

Figure 25 : Spectre de masse de l'AbfB₂ ayant subi une inactivation par le carbodiimide EDC. Ce spectre a été obtenu suite à la transformation des valeurs de m/z présentées à l'annexe XI. L'analyse a été effectuée en mode *nanospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 1,29 kV est attribué au capillaire, un voltage de 41 V au cône, une température de 100°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.



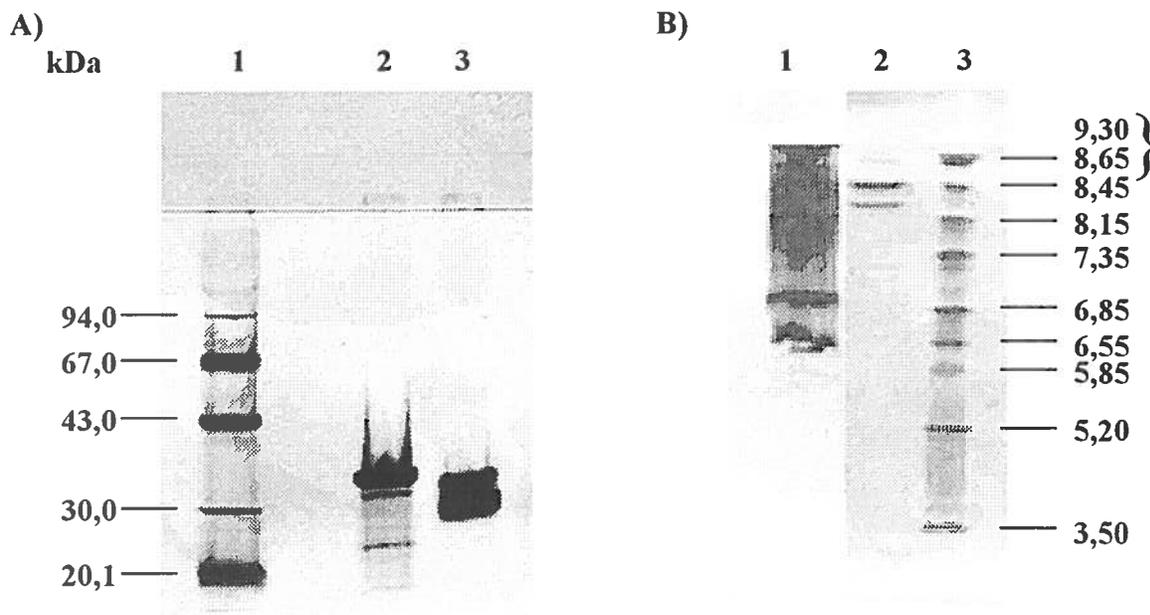


Figure 26 : A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide de l'AbfB₂ ayant subi une amidation par la glycine méthyle ester des groupements carboxyliques suite à une inactivation à l'aide du carbodiimide EDC.

Légende :

1 : Standards de poids moléculaire
2 : AbfB₂
3 : AbfB₂ inactivée

1 : AbfB₂ inactivée
2 : AbfB₂
3 : Standards de point isoélectrique

pas été inactivée. Quant au point isoélectrique, il est maintenant de 6,90 comparativement à 8,40 pour l'enzyme non marquée. De plus, leurs spectres de masse sont différents. En effet, les masses retrouvées chez l'enzyme complètement inactivée (Figures 27) sont beaucoup plus élevées soit entre 33 700 et 34 200 Da, que celle de 33 183 Da qui correspond au poids moléculaire de l'enzyme n'ayant pas été modifiée (Figure 13).

Le marquage de l'enzyme a également été réalisé en protégeant les résidus catalytiques avec un oligosaccharide (section 17.3 de l'approche expérimentale) empêchant ainsi la fixation de l'amine sur ces derniers. Donc, lorsqu'il y a protection des résidus catalytiques par un oligosaccharide, il y a moins d'ajout de carbodiimides (Figure 28). En effet, les masses sont comprises entre 33 600 et 34 200 Da. Le substrat a protégé un résidu carboxylique comparativement à l'enzyme complètement inactivée (Figure 27).

8.3 Digestion enzymatique de l'enzyme

Une digestion enzymatique de la protéine active par la trypsine a été effectuée pour pouvoir identifier les peptides générés. La trypsine qui est une endoprotéinase, hydrolyse les protéines du côté C-terminal des arginines et des lysines sauf quand ces derniers sont suivis d'une proline. L'analyse a été effectuée par spectrométrie de masse en mode *nanospray* et *electrospray*. L'analyse en mode *nanospray* nous a permis d'identifier un grand nombre de peptides. En analysant les valeurs de m/z , 20 ions ont été identifiés comme étant des peptides de l'AbfB₂ (Tableau XII et Figure 29). L'analyse en mode *nanospray* a permis de séquencer les peptides obtenus. Les ions peptidiques sont fragmentés dans la cellule de collision (deuxième quadrupôle). Les ions générés sont par la suite séparés dans le troisième quadrupôle pour permettre le séquençage des acides aminés (Annexe XIV). L'analyse en mode *electrospray* qui est précédée d'une chromatographie liquide (LC-MS), a permis aussi d'identifier un grand nombre de peptides. Vingt-trois ions ont permis d'identifier 16 peptides de l'AbfB₂ (Tableau XII, Figure 30 et Annexe XV).

Figure 27 : Spectre de masse de l'AbfB₂ ayant subi une amidation par la glycine méthyle ester des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC. Ce spectre a été obtenu suite à la transformation des valeurs de m/z présentées à l'annexe XII. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,0 kV est attribué au capillaire, un voltage de 40 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.

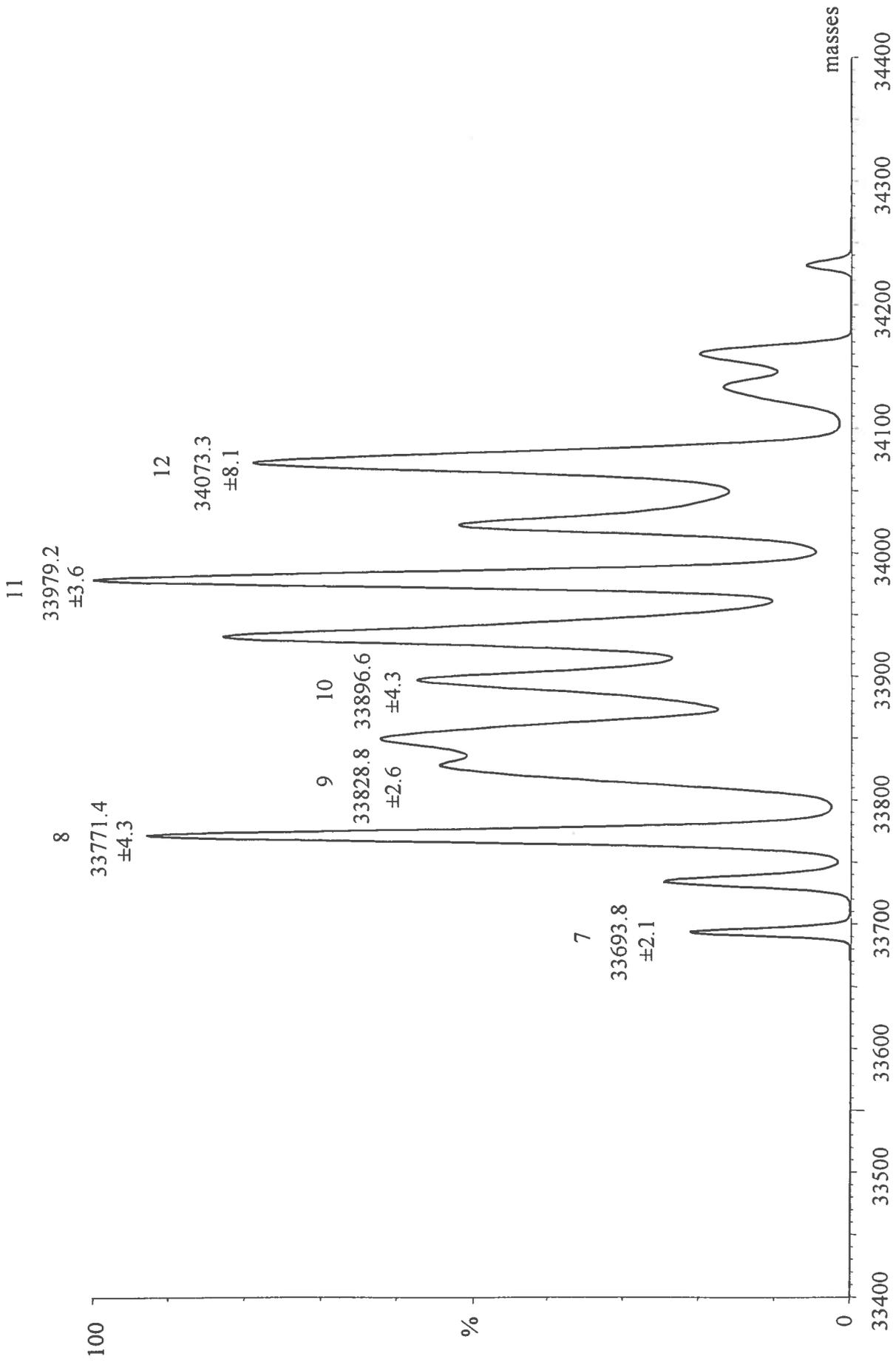


Figure 28 : Spectre de masse de l'AbfB₂ protégée par un oligosaccharide ayant subi une amidation par la glycine méthyle ester des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC. Ce spectre a été obtenu suite à la transformation des valeurs de m/z présentées à l'annexe XIII. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,0 kV est attribué au capillaire, un voltage de 40 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvation.

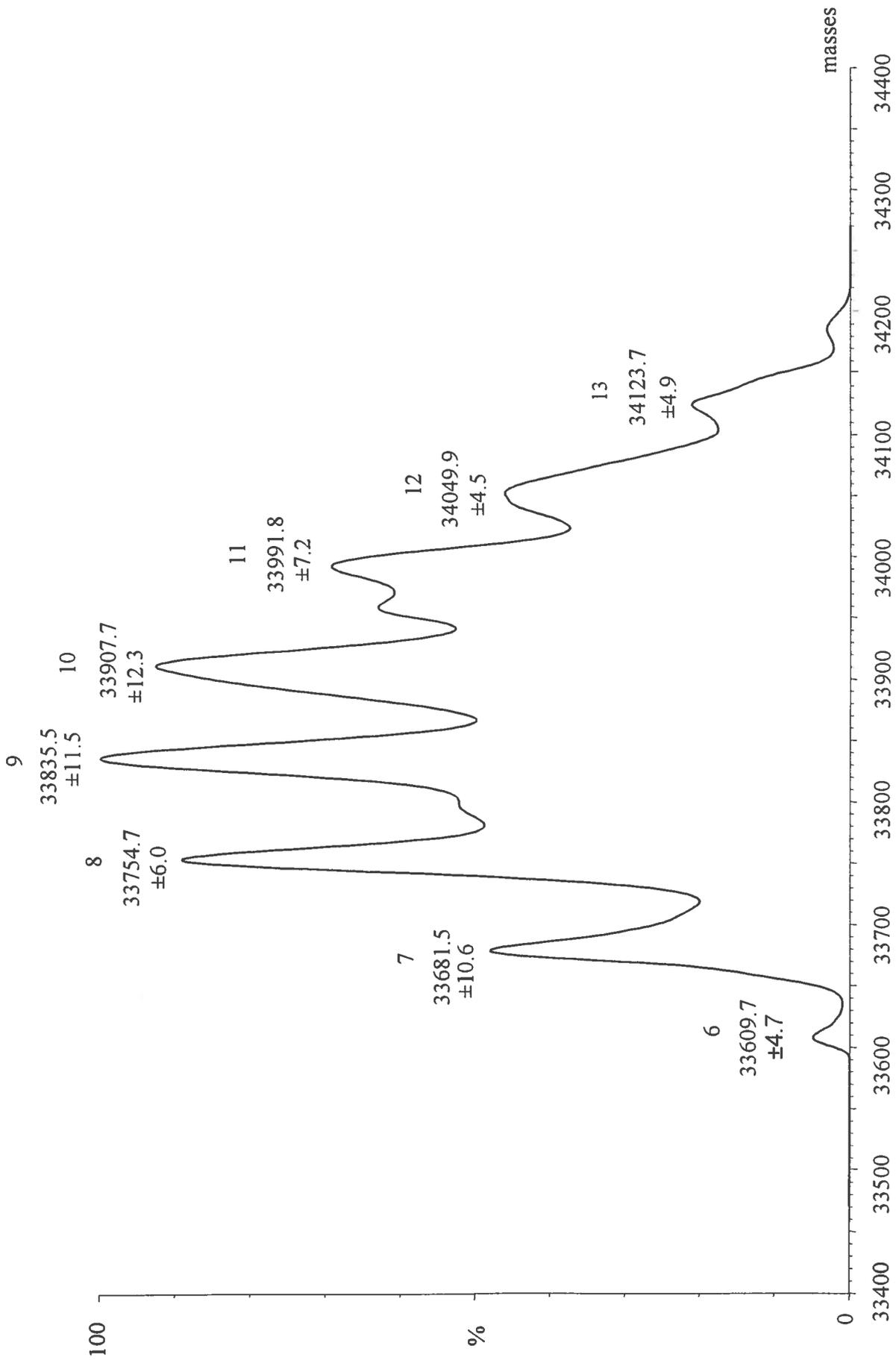


Tableau XII : Peptides obtenus lors de la digestion théorique de l'AbfB₂ par la trypsine. Les valeurs m/z théoriques de ces peptides chargés une fois (M+H), deux fois (M+2H) et trois fois (M+3H) ont été calculées. Les nombres en bleu sont associés aux ions obtenus seulement en *nanospray*. Les nombres en rouge sont associés aux ions obtenus seulement en *electrospray*, alors que ceux en rose correspondent aux ions obtenus en *nanospray* et *electrospray*. La digestion théorique a été effectuée avec le logiciel BioLynx.

No. des résidus	Séquences peptidiques	Masses théoriques	M+H	M+2H	M+3H
307-307	H	155,07	156,08	78,54	52,70
162-164	IYR	450,26	451,27	226,14	151,09
219-221	YFR	484,24	485,25	243,13	162,42
27-33	SGWVALK	759,43	760,44	380,72	254,15
34-43	DFTTVTHNGR	1146,54	1147,55	574,28	383,19
16-26	WSSSTGVLAQPK	1172,62	1173,63	587,32	391,88
189-199	ANLFEGVQVYK	1266,66	1267,67	634,34	423,23
1-15	GAHDDGTALPSTYR	1619,70	1620,71	810,86	540,91
27-43	SGWVALKDFTTVTHNGR	1887,96	1888,97	944,99	630,33
247-264	ANSGATWTNDISHGDLVR	1912,90	1913,91	957,46	638,64
16-33	WSSSTGVLAQPKSGWVALK	1914,04	1915,04	958,03	639,02
200-218	VQQNQYLMIVEAMGANGR	2078,00	2079,01	1040,01	693,68
94-110	NIWVLAYQWGSWPFYR	2198,11	2199,12	1100,06	733,71
286-306	SPNAGGDYNSLPWRPGVLTLR	2269,16	2270,17	1135,59	757,39
286-307	SPNAGGDYNSLPWRPGVLTLRH	2406,22	2407,23	1204,12	803,08
265-285	DNPDQMTVDPNQLFLYQGK	2483,11	2484,12	1242,56	828,71
222-246	SFTASSLSGSWTPQAASEGNPFAGK	2484,16	2485,16	1243,09	829,06

165-188	ASMPIGNPFGSSYTTIMSDTK	2522,15	2523,15	1262,08	841,72
200-221	VQQNQYLMIVEAMGANGRYFR	2544,24	2545,24	1273,13	849,09
1-26	GAHDDGTBALPSTYRWSSTGVLQPK	2774,31	2775,32	1388,16	925,78
219-246	YFRSFTASSLSGSWTPQAASEGNPFAGK	2950,39	2951,40	1476,20	984,47
162-188	IYRASMPIGNNFPNGSSYTTIMSDTK	2954,39	2955,40	1478,20	985,81
189-218	ANLFEGVQYK VQQNQYLMIVEAMGANGR	3326,65	3327,66	1664,33	1109,89
165-199	ASMPIGNPFGSSYTTIMSDTK ANLFEGVQYK	3773,26	3774,27	1887,64	1258,76
247-285	ANSGATWTNDISHGDLVRDNPDQTMTPDPCNLQF LYQGK	4380,76	4381,77	2191,39	1461,26
222-264	SFTASSLSGSWTPQAASEGNPFAGKANSGATWTND ISHGDLVR	4381,66	4382,67	2191,84	1461,56
265-306	DNPDQTMTPDPCNLQFLYQKKSAPNAGGHYNSLP WRPGVLTLR	4737,27	4738,28	2369,64	1580,10
44-93	HLVYGSTSSGSSYGSMVFSPTNWSDMASAGQNA MNQAAVAPTLFYFAPK	5282,88	5283,89	2642,45	1761,97
111-161	TSSDPTDPNGWSAPQPLFTGSISGSDTGPIDQTLIAD GQNMVYLFAGDNGK	5290,68	5291,69	2646,35	1764,57
111-164	TSSDPTDPNGWSAPQPLFTGSISGSDTGPIDQTLIAD GQNMVYLFAGDNGK IYR	5723,20	5724,21	2862,61	1908,74
34-93	DFTTVTTHNGRHLVYGSTSSGSSYGSMVFSPTNWS DMASAGQNA MNQAAVAPTLFYFAPK	6412,08	6413,09	3207,05	2138,37
44-110	HLVYGSTSSGSSYGSMVFSPTNWSDMASAGQNA MNQAAVAPTLFYFAPK NIWVLAYQWGSWPFYR	7464,41	7465,42	3733,21	2489,14

94-161	NIWVLAYQWGSWPFYIRTSDDPTDPNGWSAPQPLF TGSISGSDTGPIDQTLIADGQNMYLEFFAGDNGK	7472,21	7473,21	3737,11	2491,74
--------	---	---------	---------	---------	---------

Figure 29 : Spectre de masse des valeurs de m/z des peptides de l'AbfB₂ digérée par la trypsine. La digestion a été effectuée à 37°C pendant 18 heures avec un ratio protéase/AbfB₂ de 1/20 (p/p). L'analyse a été effectuée en mode *nanospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 0,82 kV est attribué au capillaire, un voltage de 20 V au cône, une température de 80°C au bloc source, une température de 200°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation et une énergie de 34,5 V à la cellule de collision. Les nombres en bleu ont été associés à des valeurs de m/z qui correspondent à des peptides d'AbfB₂ digérée. Certains de ces peptides ont été séquencés (ANNEXE XIV).

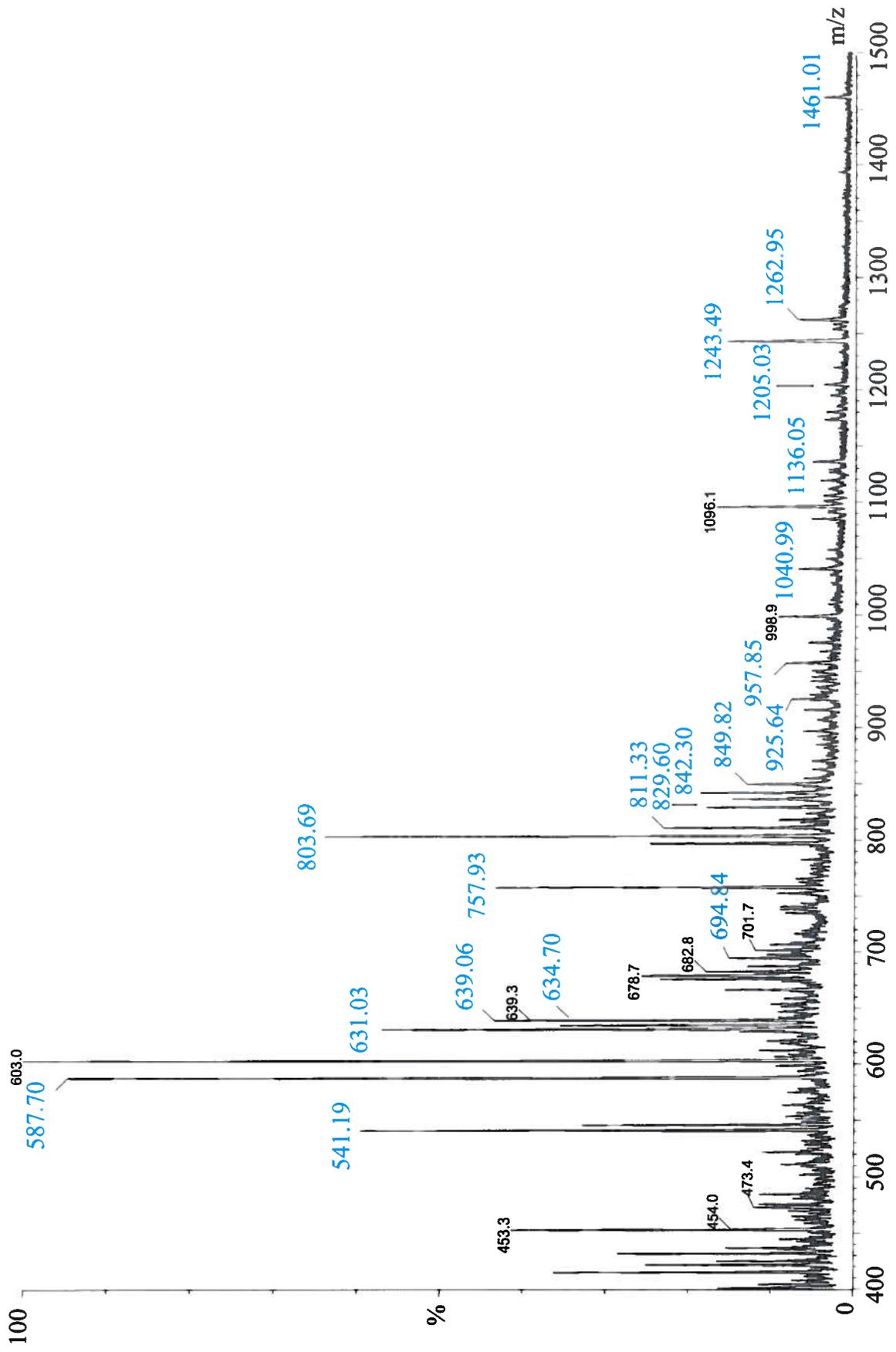
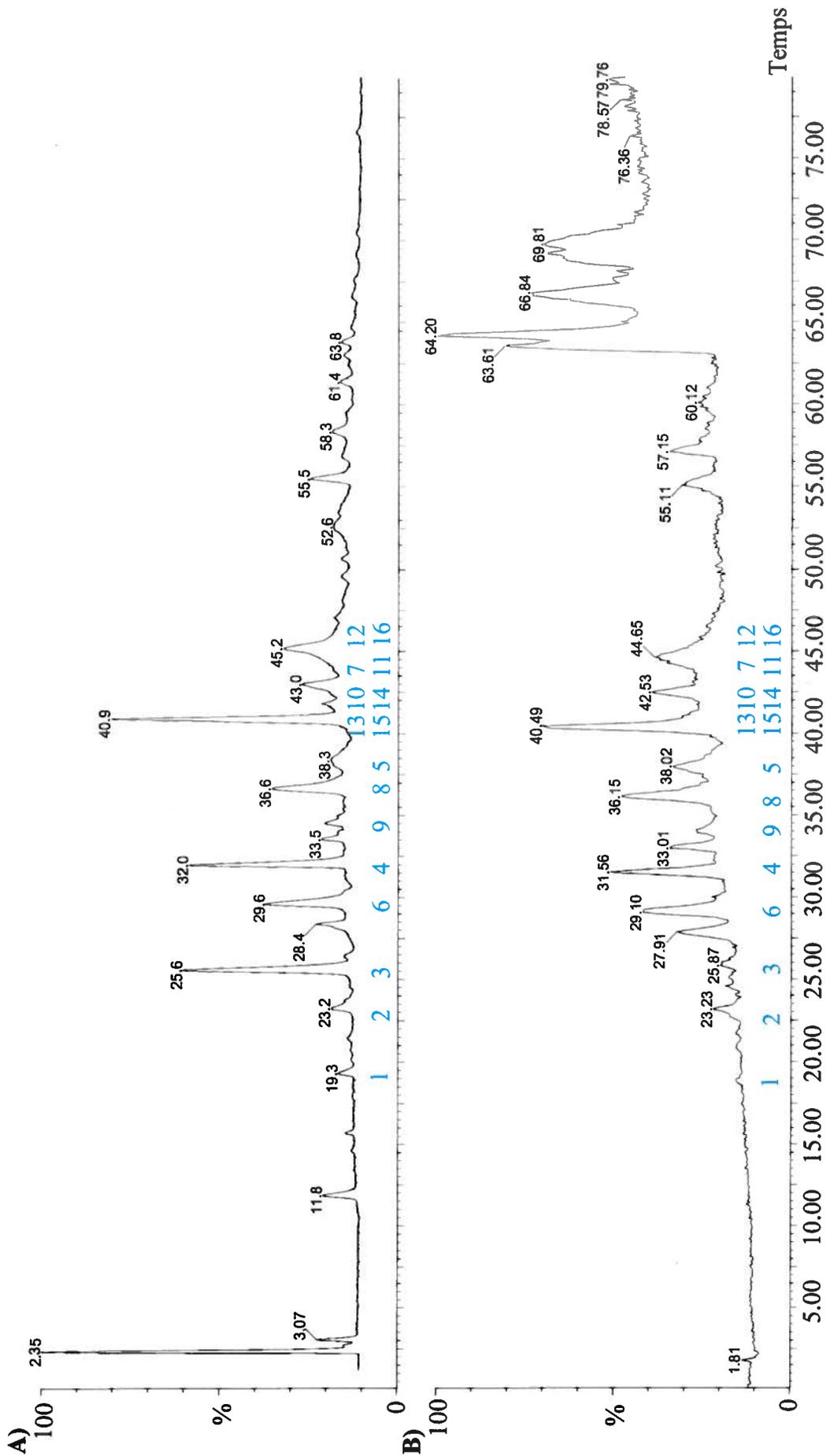


Figure 30 : A) Chromatogramme et B) spectres de masse obtenus suite à la digestion de l'AbfB₂ par la trypsine et à une chromatographie en phase liquide avec une colonne C₁₈. La digestion a été effectuée à 37°C pendant 18 heures avec un ratio protéase/AbfB₂ de 1/20 (p/p). L'analyse des peptides a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,5 kV est attribué au capillaire, un voltage de 31 V au cône, une température de 100°C au bloc source et une température de 180°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation. Les pics numérotés en a) correspondent à des peptides d'AbfB₂, alors que les pics numérotés en b) correspondent à des spectres de masse associés à des valeurs de m/z des peptides d'AbfB₂ digérée (ANNEXE XV).



9. MARQUAGE RADIOACTIF DE L'ENZYME

9.1 Utilisation du [^{14}C] EAC

Les marquages radioactifs des résidus carboxyliques ainsi que des résidus catalytiques de l'AbfB₂ par le [^{14}C] EAC ont été réalisés. L'analyse de la stœchiométrie de la réaction d'inactivation indique le marquage de 6,6 résidus carboxyliques ;ou de 9,4 sur 20 lorsqu'on considère l'efficacité du carbodiimide lors de l'inactivation complète et de 1,6 ou 2,2 résidus lors de l'inactivation des résidus catalytiques (Tableau XIII). Le marquage des résidus carboxyliques a été confirmé à l'aide d'un autoradiogramme (Figure 31). De plus, un contrôle positif a été effectué avec la XlnA₂ de *S. lividans*. Suite à la digestion tryptique (section 14.1 de l'approche expérimentale) de l'enzyme marquée et à la séparation des peptides par HPLC (14.2 de l'approche expérimentale), des fractions radioactives ont pu être détectées à 20 minutes (Figure 32). Cependant, la radioactivité détectée à ce temps de rétention correspond au temps de rétention du carbodiimide radioactif (Figure 33).

9.2 Utilisation de la [^{14}C] glycine éthyle ester

Le marquage radioactif des résidus carboxyliques a également été effectué par une amidation avec la [^{14}C] glycine éthyle ester de l'intermédiaire *O*-acylurée formé à l'aide du carbodiimide EDC. L'analyse de la stœchiométrie de la réaction indique, dans ce cas-ci, le marquage de 20 résidus carboxyliques (Tableau XIV). Il y a eu confirmation du marquage des résidus carboxyliques en effectuant un autoradiogramme des protéines marquées (Figure 34). Aucune fraction radioactive n'a pu être identifiée suite à la séparation, à l'aide d'une colonne C₁₈, des peptides générés lors de la digestion de l'enzyme radiomarquée (Figure 35).

Tableau XIII : Stœchiométrie de la réaction d'inactivation de l'AbfB₂ (5 μM) lors du marquage radioactif avec le [¹⁴C] EAC.

	Marquage radioactif des résidus carboxyliques*	Marquage radioactif des résidus catalytiques**
1	100	10
2	100 000	200 000
3	47 950 625	74 793 293
4	47 950	3 740
5	15 931	2 909
6	(9,4) 6,6	(2,2) 1,6

* marquage de tous les résidus carboxyliques accessibles au [¹⁴C]EAC

** marquage des résidus catalytiques avec le [¹⁴C]EAC préalablement protégés par un oligosaccharide lors du marquage avec le EDC des résidus carboxyliques accessibles

Légende :

1 : qté théorique en nmoles de résidus carboxyliques à inactiver

2 : qté en nmoles de [¹⁴C]EAC ajouté

3 : qté en DPM de [¹⁴C]EAC ajouté

4 : qté théorique en DPM de [¹⁴C]EAC fixé aux résidus carboxyliques

5 : qté expérimentale en DPM de [¹⁴C]EAC fixé aux résidus carboxyliques

6 : qté de résidus carboxyliques inactivés (l'efficacité du EAC a été considérée pour les valeurs entre parenthèse)

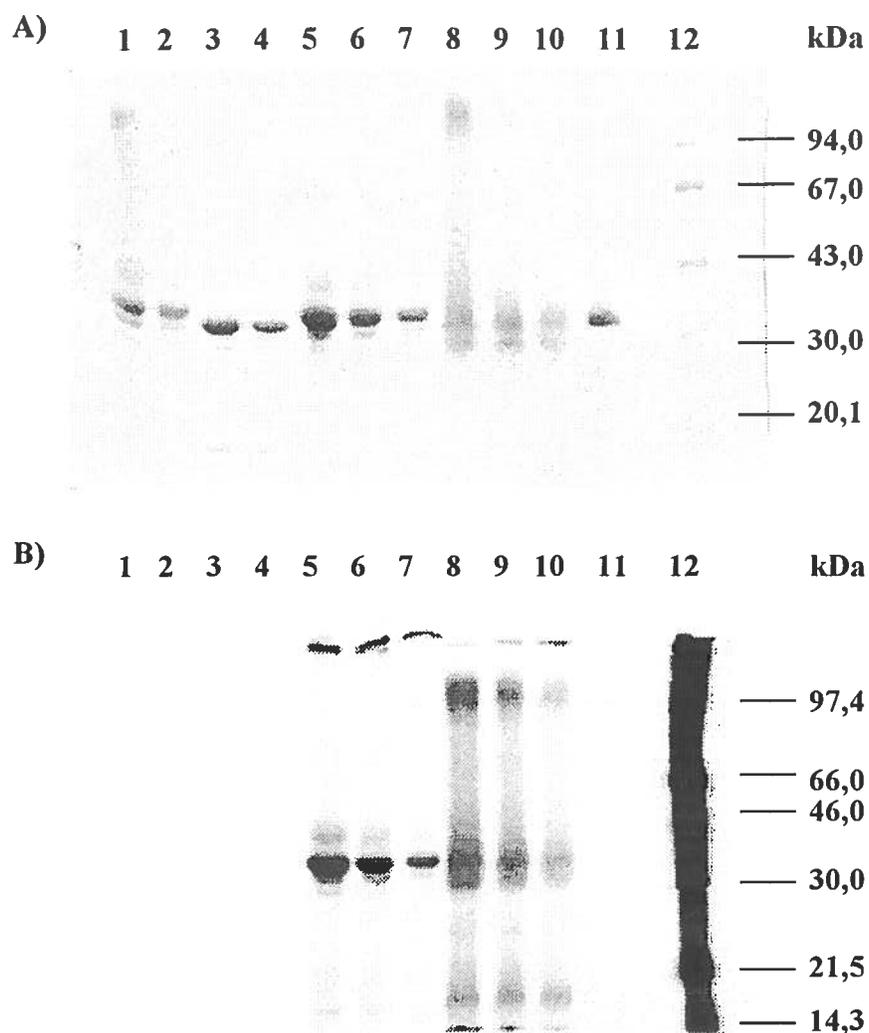


Figure 31 : A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) autoradiogramme de l'AbfB₂ et de la XlnA₂ marquées radioactivement par le [¹⁴C] EAC. L'exposition a été effectuée pendant 27 jours sur un film X-OMATTM de Kodak.

Légende :

1 et 2 : XlnA₂ marquée au EAC

3 et 4 : XlnA₂

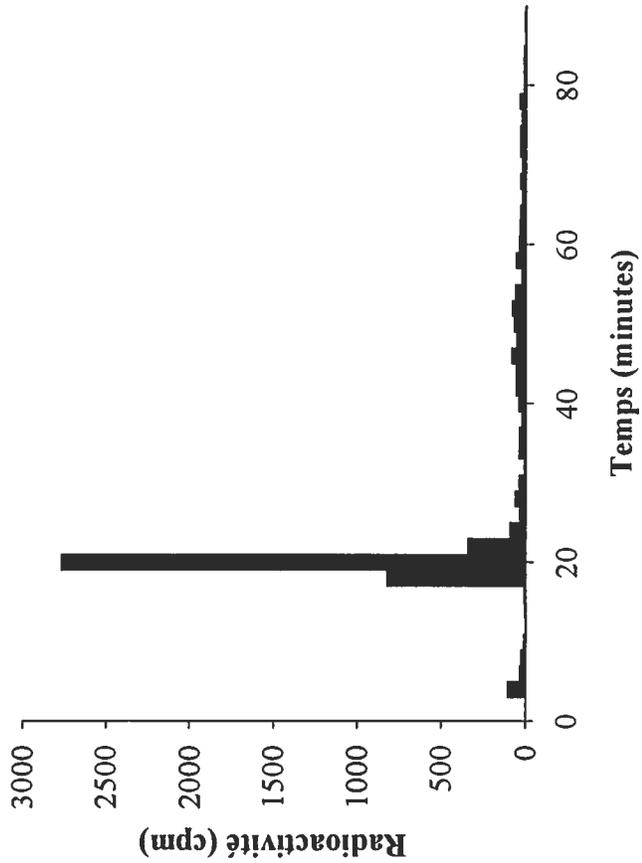
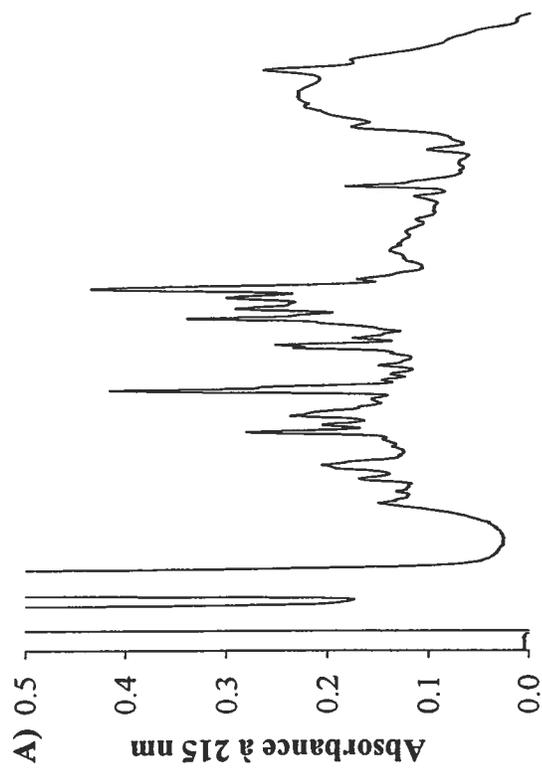
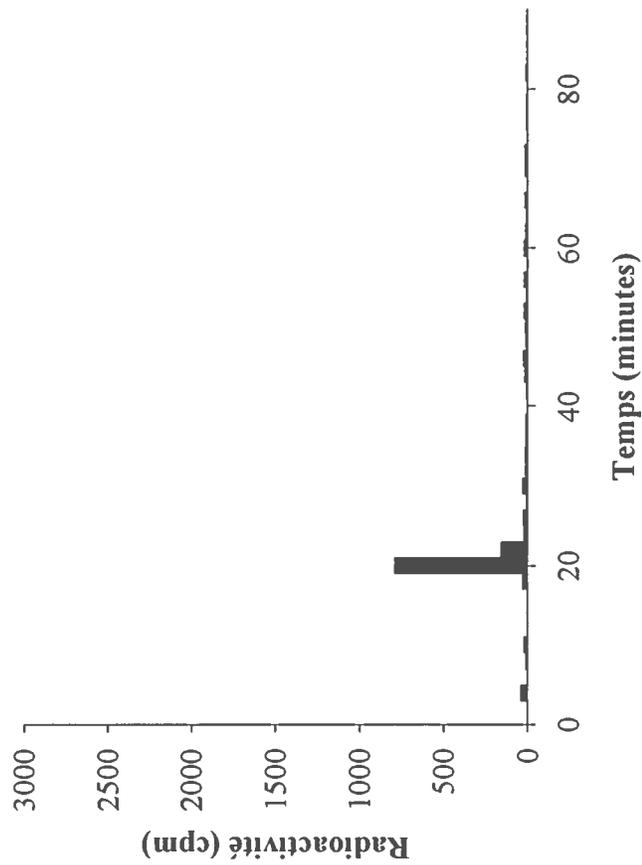
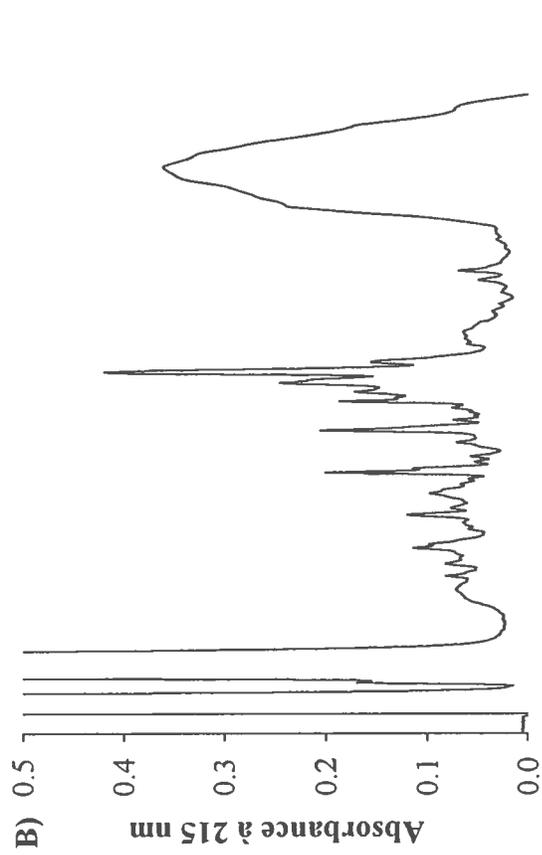
5, 6 et 7 : XlnA₂ marquée au [¹⁴C] EAC

8, 9 et 10 : AbfB₂ marquée au [¹⁴C] EAC

11 : AbfB₂

12 : A) Standards de poids moléculaire et B) RainbowTM de protéines [¹⁴C] méthylées

Figure 32 : Chromatographies en phase inverse des peptides générés lors d'une digestion par la trypsine suite A) au marquage des résidus carboxyliques et B) au marquage des résidus catalytiques de l'AbfB₂ (5 μM) avec le [¹⁴C] EAC (2 mCi). Les peptides ont été injectés dans une colonne C₁₈ (Nova-Pak) et séparés avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 68%. Les peptides ont été détectés à 215 nm et des fractions de 2 minutes ont été collectées manuellement pour pouvoir compter la radioactivité.



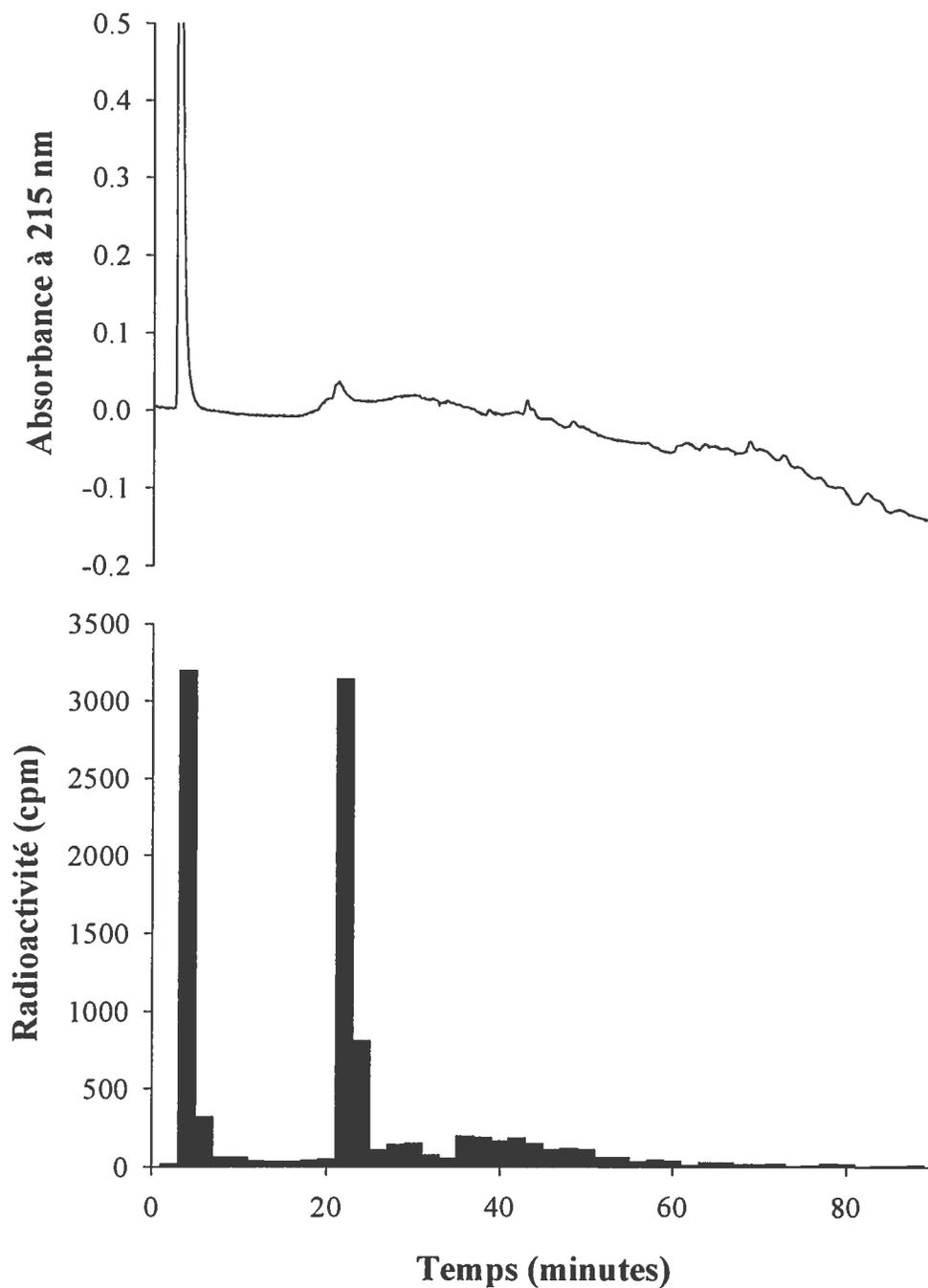


Figure 33 : Chromatographie en phase inverse du $[^{14}\text{C}]$ EAC. Le $[^{14}\text{C}]$ EAC a été injecté dans une colonne C_{18} (Nova-Pak) et élué avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 68%. Des fractions de 2 minutes ont été récoltées manuellement pour pouvoir compter la radioactivité.

Tableau XIV : Stœchiométrie de la réaction d'inactivation de l'AbfB₂ (5 μM) lors du marquage radioactif avec la [¹⁴C] glycine éthyle ester.

Marquage radioactif complet de l'enzyme *	
1	100
2	240 000
3	2 897 212
4	1 207
5	4 692
6	20

* marquage de tous les résidus carboxyliques accessibles à la [¹⁴C] glycine éthyle ester

Légende :

- 1 : qté théorique en nmoles de résidus carboxyliques à inactiver
- 2 : qté en nmoles de [¹⁴C] glycine éthyle ester ajoutée
- 3 : qté en DPM de [¹⁴C] glycine éthyle ester ajoutée
- 4 : qté théorique en DPM de [¹⁴C] glycine éthyle ester fixée aux résidus carboxyliques
- 5 : qté expérimentale en DPM de [¹⁴C] glycine éthyle ester fixée aux résidus carboxyliques
- 6 : qté de résidus carboxyliques inactivés

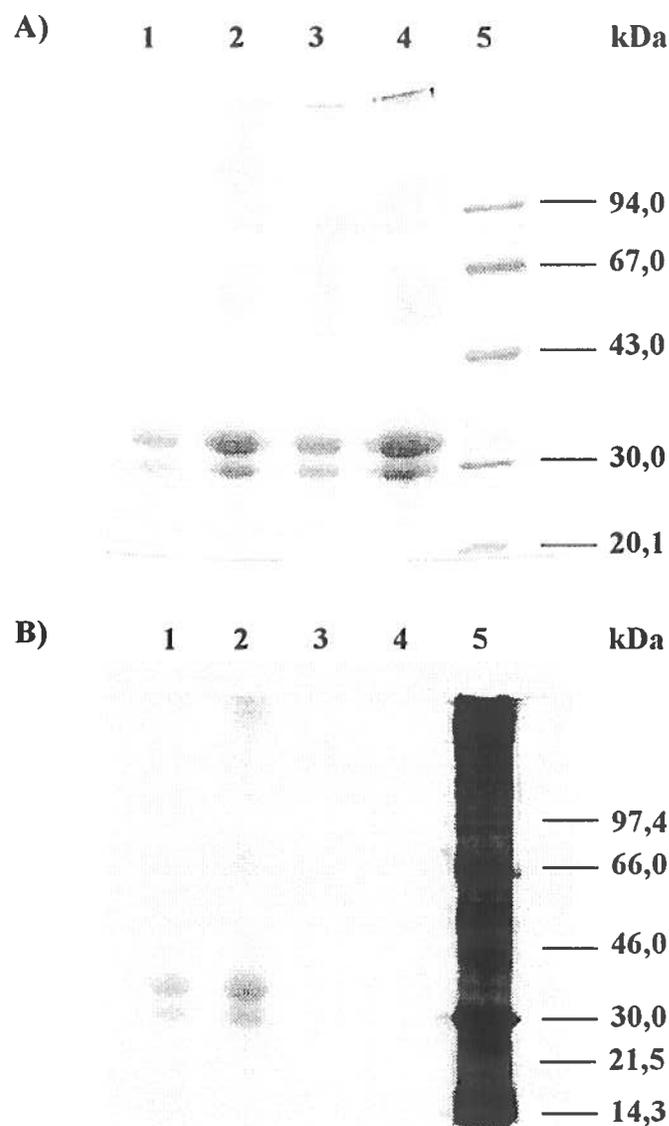
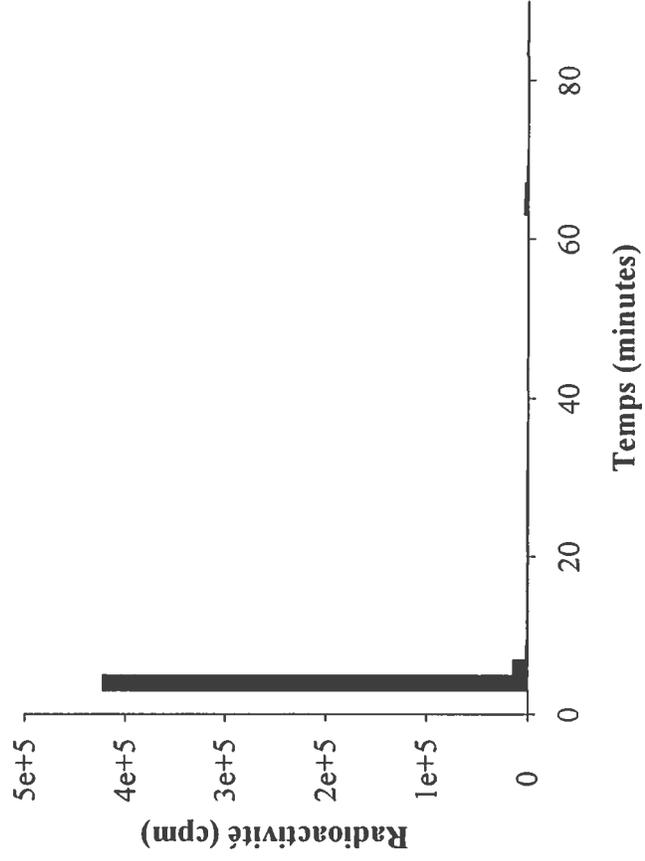
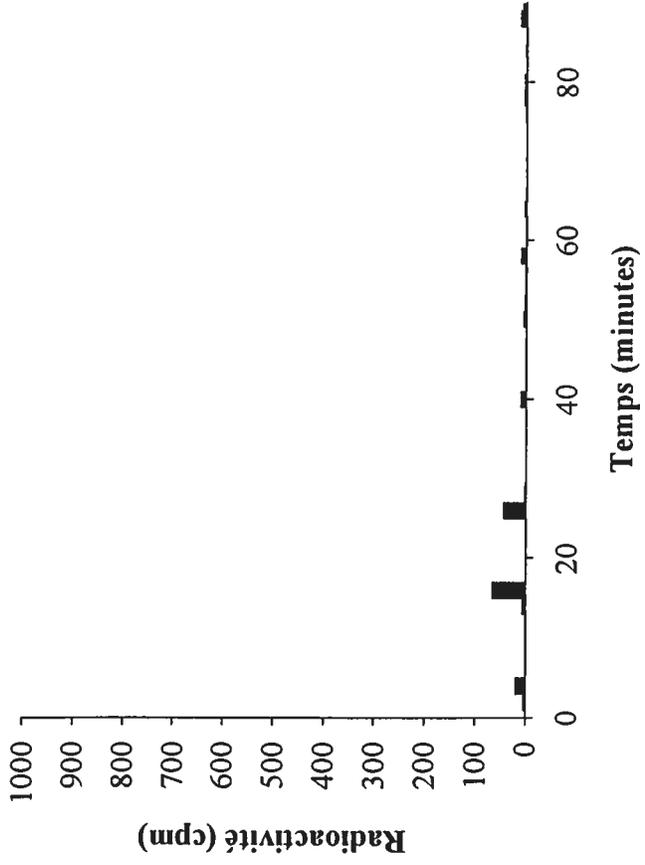
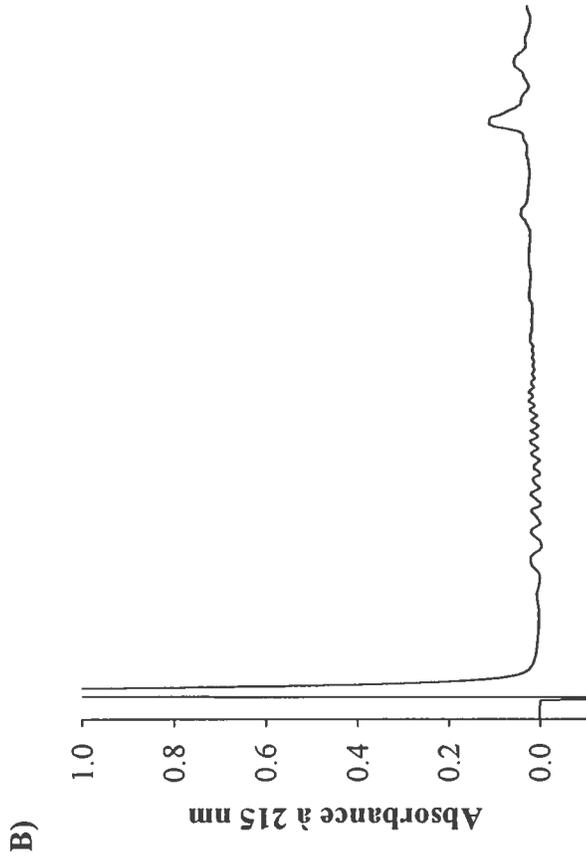
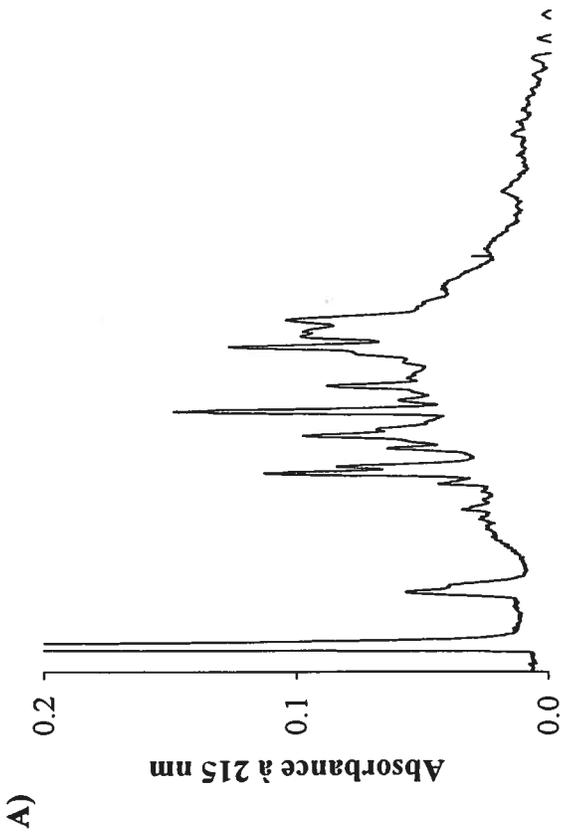


Figure 34 : A) Gel SDS-PAGE 12,5% et B) autoradiogramme de l'AbfB₂ marquée radioactivement par la [^{14}C] glycine éthyle ester. L'exposition a été effectuée pendant 27 jours sur un film X-OMATTM de Kodak.

Légende :

- 1 et 2 : AbfB₂ marquée par la [^{14}C] glycine éthyle ester
- 3 et 4 : AbfB₂ marquée par la glycine éthyle ester
- 5 : Standards RainbowTM de protéines [^{14}C] méthylées

Figure 35 : Chromatographies en phase inverse A) des peptides générés lors d'une digestion par la trypsine suite au marquage des résidus carboxyliques de l'AbfB₂ avec la [¹⁴C] glycine éthyle ester et B) de la [¹⁴C] glycine éthyle ester. Les échantillons ont été injectés dans une colonne C₁₈ (Nova-Pak) et séparés avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 68%. La détection a été effectuée à 215 nm et des fractions de 2 minutes ont été collectées manuellement pour pouvoir compter la radioactivité.



DISCUSSION

IV. DISCUSSION

1. CONSTRUCTION ET SOUS-CLONAGE DU FRAGMENT D'ADN ASSOCIÉ À LA PROTÉINE CHIMÈRE MUTÉE

L'utilisation d'un peptide signal était essentielle pour permettre la sécrétion du domaine catalytique à l'extérieur de la cellule. Comme le domaine de fixation au substrat est situé entre le peptide signal et le domaine catalytique de l'AbfB (Figure 4), il était impossible d'amplifier l'ADN de ces derniers en une seule étape. La technique du PCR recombinant a donc été utilisée pour créer une protéine chimère. Le gène codant pour le peptide signal de la xylanase A a servi à créer une protéine chimère avec le gène codant pour le domaine catalytique de l'AbfB. Ce peptide signal a été employé puisqu'il était déjà présent dans un plasmide, en occurrence le plasmide pIAF933, pouvant servir de matrice lors de l'amplification par PCR.

L'élimination du site de restriction *SphI* contenu dans le domaine catalytique de l'AbfB était nécessaire au clonage de ce dernier entre les sites de restriction *SphI* et *SacI* du plasmide pIAFC109. Cette opération impliquait le remplacement du codon AGC pour le codon TCG sans modifier l'acide aminé sérine associé au codon. Il a donc été possible de cloner le fragment d'ADN codant pour la protéine chimère mutée en aval du promoteur C109. Le clonage dans le vecteur à copies multiples pIAFC109, qui est un plasmide dérivé de pIJ702, a permis de produire de l'AbfB₂ en grande quantité.

2. PRODUCTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME

La production de protéines en fermenteur permet de diminuer la quantité de protéines non désirées, ce qui facilite et diminue par la suite les étapes de purification. En effet, la distribution des streptomycètes dans le fermenteur est beaucoup plus uniforme comparativement à la culture de ces dernières en flacons (Communications personnelles, François Shareck). Les bactéries ont moins tendance à s'agglomérer à la paroi de verre dans le cas d'une fermentation ce qui limite la production de mycélium

aérien et par le fait même la production de protéines supplémentaires et non désirées provenant du métabolisme secondaire tel que les pigments.

Lors de la concentration du surnageant de culture, 67,4% des protéines produites ce sont retrouvées dans le filtrat. La baisse de pH du milieu de culture à 5,45 (Tableau X) ou encore la présence de protéases ont peut-être contribué à la dégradation de protéines créant ainsi un grand nombre de débris protéiques qui sont passés à travers la membrane de 3,000 Da. Deux passages chromatographiques ont été nécessaires à la purification de l'enzyme. Donc, 243,4 mg d'AbfB₂ ont pu être récupérés à partir d'un surnageant contenant 2730 mg de protéines.

3. CARACTÉRISATION DE L'ENZYME

Des différences de masse ont été observées entre la masse théorique et la masse obtenue suite à l'analyse en spectrométrie de masse de l'enzyme purifiée (section 6.1 des résultats). Ces différences de masse sont dues à un mauvais clivage du peptide signal de la xylanase A suite à la substitution qui a eu lieu à l'extrémité 3' de l'ADN de ce dernier (Figure 10). En effet, le séquençage de l'extrémité N-terminale de l'AbfB₂ a permis de confirmer ce phénomène puisque la protéine possède 4 acides aminés supplémentaires. Habituellement, chez *S. lividans*, la signal peptidase clive le peptide signal après la séquence consensus AXA localisée à l'extrémité C-terminale de ce dernier (Tableau XV) (Gilbert *et al.*, 1995). La substitution a engendré la modification du deuxième acide aminé alanine pour l'acide aminé aspartate. La signal peptidase n'est donc plus en mesure de cliver à cet endroit puisque la séquence consensus a disparu. Le clivage a plutôt été effectué à l'avant de l'acide aminé situé en amont de la séquence consensus modifiée (Tableau XV). Le clivage par la signal peptidase à cet endroit est peut-être dû à la plus grande exposition des résidus situés à cet endroit. En effet, les deux prolines situées en amont ont pour rôle de briser l'hélice α (Gilbert *et al.*, 1995). Il semblerait donc que la séquence consensus ne soit pas essentielle au fonctionnement de la signal peptidase.

Tableau XV : Séquences en acides aminés de différents peptides signaux retrouvés chez *Streptomyces lividans* montrant la séquence consensus nécessaire au clivage par la signal peptidase.

Peptides signals	Séquences de différents peptides signaux	Références
Xylanase A	MGSYALPRSGVRRSIRVLLLALVVGVLGTA TALIAPPGAHA↑A	Shareck <i>et al.</i> , 1995
Xylanase B	MNLLVQPRRRRRGPVTLVRSWAVALAA LAALMLPGTAQA↑D	Shareck <i>et al.</i> , 1995
Xylanase C	MQQDGTQQDRIKQSPAPLNGMSRRGFLGG AGTLALATASGLLLPGTAHA↑A	Shareck <i>et al.</i> , 1995
Mannanase	MRNARSTLITTAGMAFQAVLGLLFALAGPS AGRAEA↑A	Arcand <i>et al.</i> , 1993
Cellulase A	LKRLALLATGVSIVGLTALAGPPAQA↑A	Théberge <i>et al.</i> , 1992
Cellulase B	MRTL RPQARAPRGLLAALGAVLAAFALVSS LVTAAAPAQA↑D	Wittmann <i>et al.</i> 1994
Acétylxylanestérase	MRTSTGPRASSRTLRTLASGVAVTALAAAG TVAAGAAPAQA↑A	Shareck <i>et al.</i> , 1991
Xylanase A modifié	MGSYALPRSGVRRSIRVLLLALVVGVLG TATALIAPP↑GAHD	

Le site de clivage est indiqué par une flèche

(Adapté de Pagé *et al.*, 1996)

Les deux espèces moléculaires obtenues lors de l'analyse en spectrométrie de masse (Figure 13) correspondent à l'enzyme possédant les 4 acides aminés du peptide signal de la xylanase A (33 183,4 Da) et à l'enzyme ayant perdu les acides aminés GAH (32 915,9 Da) puisque la perte de ces derniers correspond à 265 Da. Ces deux espèces moléculaires sont aussi retrouvées sur gel lors de la focalisation isoélectrique (Figure 14). Les protéines ayant un pI élevé possèdent beaucoup plus de charges positives que de charges négatives ce qui laisse croire que l'enzyme a une charge globale positive. L'enzyme ayant perdu 3 acides aminés devrait donc migrer un peu plus vers l'anode puisque cette dernière a perdu un acide aminé chargé positivement. Donc, l'espèce moléculaire qui a un poids de 32 915,9 Da serait celle ayant un pI de 8,18 alors que l'autre espèce serait celle ayant un pI de 8,40. Il est à noter que la différence de 4,3 Da entre la masse théorique et la masse obtenue en spectrométrie de masse provient de l'erreur sur le calcul de cette dernière. On pourrait croire à une erreur dans la séquence en acides aminés de la protéine, mais comme aucune autre erreur que celle dans la partie 3' de la séquence nucléotidique du peptide signal n'est survenue, cette hypothèse a été exclue.

Le fait d'enlever le domaine de fixation au substrat ne devrait pas affecter le rôle du domaine catalytique. La fonction générale du domaine de fixation au substrat est de permettre un alignement convenable de l'enzyme avec les polysaccharides insolubles. Cette fonction permet d'augmenter la quantité de molécules attaquant le substrat (Tomme *et al.*, 1995). Lors de ces études, nous nous en sommes tenus à l'utilisation de substrats solubles. Il est beaucoup plus avantageux de travailler avec le domaine catalytique seul puisque ce dernier a ainsi la possibilité d'être cristallographié. La région charnière qui relie le domaine catalytique de l'enzyme à son domaine de fixation au substrat est mobile, ce qui empêche la formation de cristaux avec l'enzyme sauvage. De plus, l'utilisation du domaine catalytique seul permet d'éviter les interactions non pertinentes qu'il pourrait y avoir entre les différents substrats utilisés et le domaine de fixation au substrat. L'utilisation du domaine catalytique seul diminue le nombre de résidus carboxyliques facilitant ainsi l'analyse lors des expériences de marquage aux carbodiimides.

L'activité spécifique de l'AbfB₂ est 1,7 fois supérieure à l'activité de l'AbfB (Tableau XVI). L'élimination du domaine de fixation au substrat a diminué la masse de la molécule ce qui pourrait peut-être permettre au domaine catalytique d'avoir accès à des sites qui ne seraient pas accessibles à la molécule entière. Cette explication est valable dans le cas où il y a hydrolyse d'un substrat soluble puisque dans le cas d'un substrat insoluble, le domaine de fixation au substrat a un rôle à jouer. Quant à la température et au pH optimaux, les valeurs n'ont pas changé de façon significative (Tableau XVI). Donc, dans le cas qui nous concerne, l'élimination du domaine de fixation au substrat n'altère pas les fonctions du domaine catalytique de la protéine AbfB.

L'AbfB₂ possède sensiblement la même activité spécifique envers les substrats solubles arabinoxylane de blé et arabinoxylane de seigle. Cependant, une plus grande libération d'arabinose a été observée au cours du temps chez le substrat arabinoxylane de seigle (Figure 17). Ces deux substrats possèdent une chaîne principale de xyloses reliés par des liens β -1,4 (Figure 36). Des résidus arabinofuranoses sont associés à la chaîne principale de xylose en position α -L-1,2 et α -L-1,3 (Figure 36). L'arabinoxylane de seigle possède 49% de chaînes latérales d'arabinose alors que l'arabinoxylane de blé en possède 41%. C'est probablement pour cette raison qu'il y a 21% moins de résidus arabinoses libérés au cours du temps avec le substrat arabinoxylane de blé. L'activité spécifique de l'enzyme envers le substrat arabinane de betterave à sucre est de beaucoup inférieure à l'activité spécifique des autres substrats. De plus, l'enzyme libère 89% moins d'arabinoses à partir de ce substrat qu'à partir de l'arabinoxylane de seigle (Figure 17) bien que ce dernier possède 60% de résidus arabinofuranoses en position α -L-1,3 (Figure 36). Comme l'activité spécifique est moins élevée, l'hydrolyse des résidus se fait plus lentement. La quantité d'arabinoses libérée à partir du substrat arabinane après plusieurs heures d'incubation aurait peut-être été supérieure aux autres substrats; cependant, l'AbfB₂ se dénature à 50°C au cours du temps puisque l'enzyme est thermosensible. Son activité en est donc altérée. L'enzyme pourrait aussi avoir une préférence pour les arabinoses en position α -L-1,2 ce qui expliquerait le faible taux d'hydrolyse chez l'arabinane. Il a aussi été démontré que l'AbfB n'hydrolysait pas l'arabinane débranché (Vincent *et al.*, 1997),

Tableau XVI : Comparaison des différentes caractéristiques biochimiques de l'AbfB et de l'AbfB₂.

Enzymes	AbfB (Vincent et al., 1997)	AbfB ₂
Poids moléculaires (kDa)	46	33
pI	7,40	8,18
Activité spécifique (UI/μM)	407,69	698,93
pH optimal d'hydrolyse	6,0	6,0
Température optimale d'hydrolyse (°C)	55	49
K_M (mg/ml)	5,12	2,03
V_{max} (μM/min)	-	1,868
K_{cat} (sec ⁻¹)	-	15,5

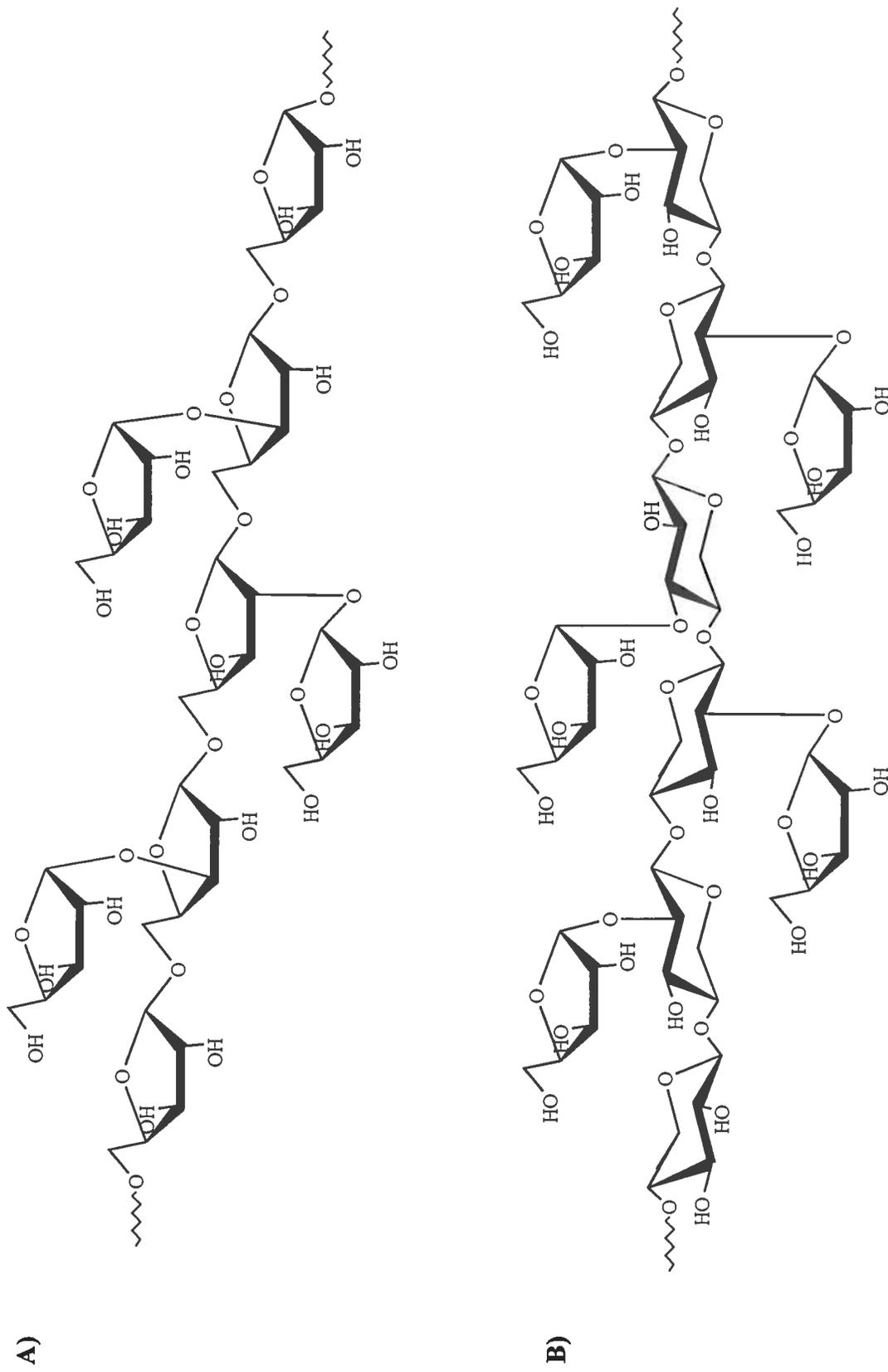


Figure 36 : Schémas montrant la composition des substrats A) arabinane de la betterave à sucre (88% arabinose, 3% galactose, 2% rhamnose et 7% acide galacturonique) B) arabinoxylanes de seigle (49% arabinose et 51% xylose) et de blé (41% arabinose et 59% xylose).

donc la chaîne principale de α -L-1,5 arabinose chez l'arabinane de la betterave à sucre nuit peut-être à l'hydrolyse des chaînes latérales d'arabinoses.

4. DÉTERMINATION DU MÉCANISME DE RÉACTION

Comme il a déjà été mentionné, le domaine catalytique de l'AbfB de *S.lividans* fait partie de la famille 62 des glycosyles hydrolases et compose, avec la famille 43, le clan GH-F. Le mécanisme de réaction a été déterminé chez trois des membres de la famille 43. En effet, l'enzyme β -D-xylopyranosidase/ α -L-arabinofuranosidase (β -xyl) de *Butyrivibrio fibrisolvens* hydrolyse les substrats comme le *O*-nitrophényle β -D-xylopyranoside en utilisant un mécanisme d'inversion (Braun *et al.*, 1993). Il a été possible de séparer les anomères β et α de xylopyranoses formés par la méthode HPLC à l'aide d'une colonne Dextropak. Cette technique a été utilisée à maintes reprises pour quantifier l'arabinose libéré lors des études de cinétique. Une colonne Carboapak, qui possède une meilleure résolution que la colonne Dextropak, a été utilisée et aucune discrimination n'a été possible entre les anomères α et β d'arabinoses libérés par l'AbfB₂. Des analyses par RMN ont donc été effectuées puisqu'il a été déterminé par cette méthode que les endo-(1→5)- α -L-arabinanases d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus aculeatus* hydrolysent l'arabinane linéaire avec un mécanisme d'inversion (Pitson *et al.*, 1996).

L'analyse par RMN du mécanisme d'hydrolyse des substrats par les arabinofuranosidases est impossible à cause de l'instabilité des résidus arabinofuranoses libérés. Lorsqu'il y a libération d'arabinofuranoses, il se produit en simultané une mutarotation entre la forme α - et β - du monosaccharide ainsi qu'une tautomérisation de ces derniers en arabinopyranoses (Figure 37). L'apparition de deux doublets associés aux positions α (5,3 ppm) et β (4,6 ppm) des protons dans le centre anomérique de l'arabinose confirme l'impossibilité de capturer la forme furanosidique libérée (Figure 18).

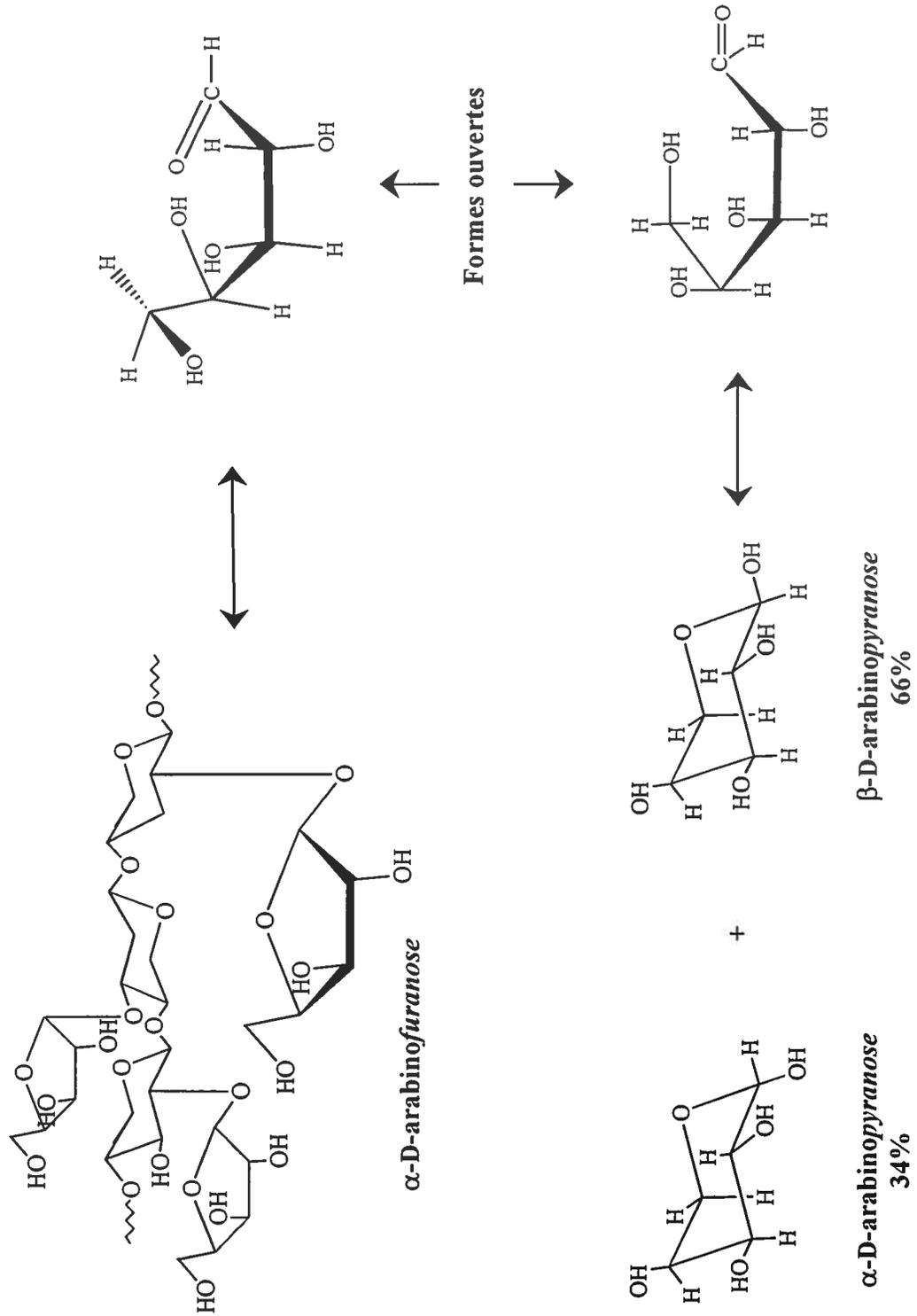


Figure 37 : Processus de tautomérisation et de mutarotation des résidus arabinofuranoses libérés lors de l'hydrolyse du substrat par une *α-L-arabinofuranosidase*.

Les études effectuées par Pitson et ses collaborateurs (1996) ont démontré que l'utilisation du méthanol lors de l'hydrolyse du substrat permettait de transférer les résidus α -L-arabinofuranoses libérés au méthanol. Ces études ont été effectuées avec des arabinofuranosidases de rétention faisant partie des familles 51 et 54. Comme le méthanol est un nucléophile beaucoup plus réactif que l'eau, il permet de stabiliser la forme furanosidique du sucre en empêchant la mutarotation au carbone anomérique et la tautomérisation dans l'étape de déglycosylation (Figure 38). Le produit libéré n'est cependant pas seulement sous forme méthylée. C'est donc dire que l'eau joue quand même son rôle de nucléophile lors de la réaction (Figure 19). Lorsque nous avons utilisé l'AbfB₂ de *S. lividans*, il n'y pas eu apparition de nouveaux produits (Figure 20). Nous pouvons donc supposer que l'enzyme à l'étude dans ce projet possède un mécanisme d'inversion puisqu'aucun méthyle α -L-arabinofuranose n'a été observé par HPAEC. Il semblerait que les glycosyles hydrolases qui agissent avec un mécanisme d'inversion sont incapables d'effectuer un transfert glycosidique au méthanol (Sinnott, 1990). L'absence d'un intermédiaire covalent lors de la substitution unimoléculaire est sûrement l'explication. En effet, dans le cas du mécanisme d'inversion, il y a coupure du lien glycosidique et formation du sucre réducteur de façon concomitante (Figure 1). Chez le mécanisme de rétention, la formation du sucre réducteur est effectuée suite à la formation de l'intermédiaire covalent (Figure 2) ce qui permet de stabiliser la forme furanosidique du monosaccharide.

5. EFFICACITÉ ET MÉCANISME D'ACTION DES CARBODIIMIDES

Il existe plusieurs agents chimiques qui permettent de modifier les acides aminés aspartate et glutamate. Dans le cadre de cette étude, ce sont les carbodiimides qui ont été utilisés. En effet, ces derniers ont fait grandement leurs preuves pour l'inactivation des glycosyles hydrolases. Ils ont été utilisés entre autre pour l'inactivation de l'endo-1,4- β -xylanase (Bray et Clarke, 1990) et l'endo- β -1,4-glucanase (Clarke et Yaguchi, 1985) de *Schizophyllum commune*, pour l'inactivation de l'énolase de la levure (George et Borders, 1979), et pour l'inactivation de la glucoamylase G2 d'*Aspergillus niger* (Svensson *et al.*, 1990). Lors de ces études, il a été démontré que le EAC était le carbodiimide soluble le

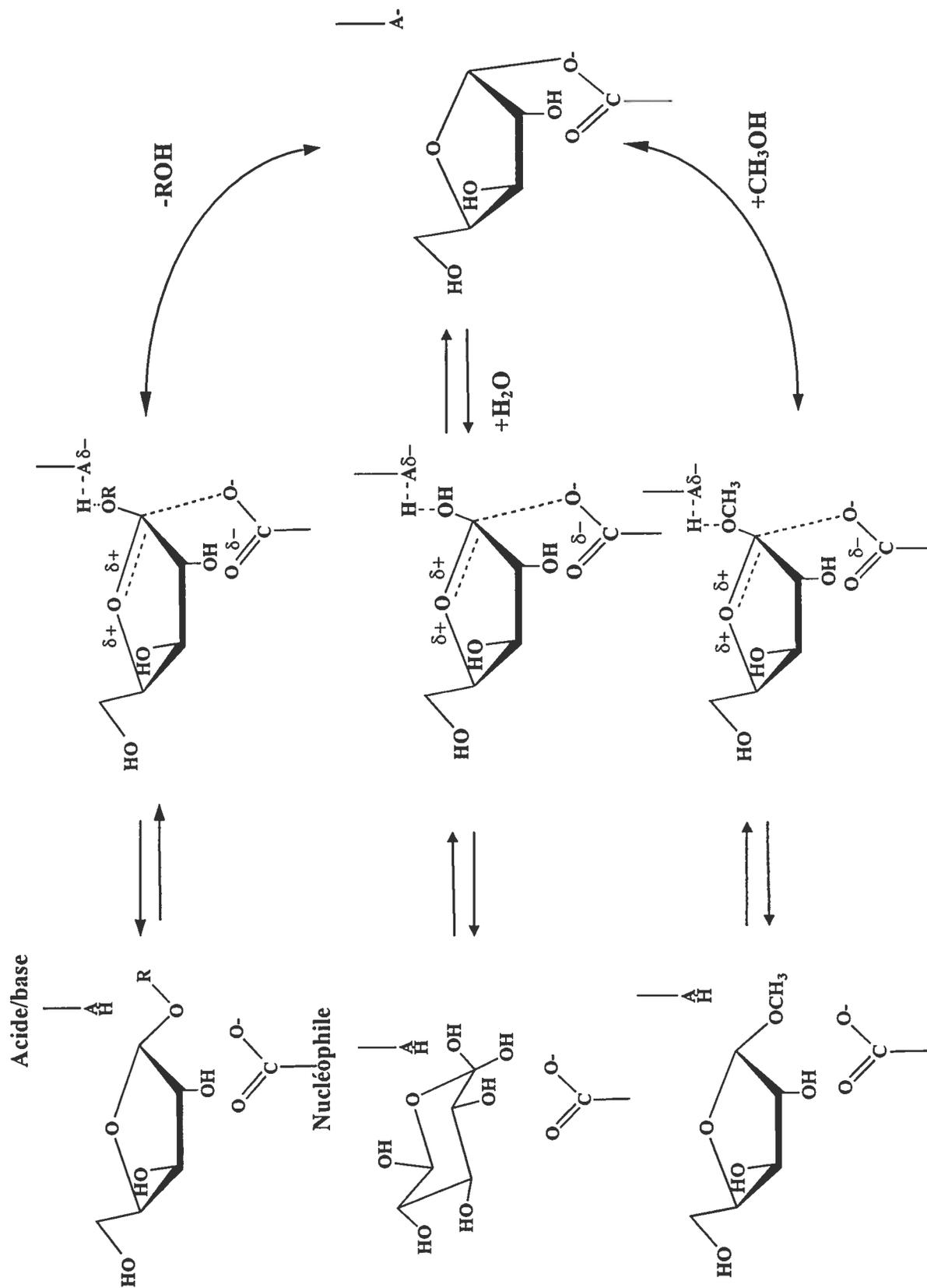


Figure 38 : Stabilisation de la forme furanosidique de l'arabinose lors de l'hydrolyse du substrat par une α -L-arabinofuranosidase de rétention.

plus efficace. Cette réactivité élevée est due à la grande stabilité du produit sous sa forme tautomérique linéaire (Tenforde *et al.*, 1972) et aussi à la grande vitesse de réarrangement du produit *O*-acylurée formé en *N,N'*-dialkylurée (Timkovich, 1977).

Selon Bray et Clarke (1990), le carbodiimide EAC permet l'inactivation des glycosyles hydrolases. Ces auteurs ont montré que cette inactivation était complétée en moins d'une heure. Par contre, nos résultats montrent que l'inactivation de l'AbfB₂ par le carbodiimide EAC n'est pas aussi efficace. Après 22 heures, seulement 70% de l'enzyme était inactivée (Figure 22). Dans le cas du carbodiimide EDC·HCl, l'inactivation complète de l'AbfB₂ a été observée après 20 heures (Figure 21). Bray et Clarke (1990) ont démontré que l'inactivation de la xylanase A de *S. commune* s'opérait en quelques heures. Enfin, le carbodiimide EDC (Fluka) a permis une inhibition après seulement 1 heure d'incubation (Figure 22).

L'inhibition est effectuée dans un milieu organique légèrement acide. Le résidu carboxylique donne son proton à l'atome d'azote du carbodiimide. Le résidu devenu nucléophile peut ainsi attaquer le carbodiimide pour former un intermédiaire *O*-acylurée. Cet intermédiaire peut acquérir un proton sous l'action du solvant et être réarrangé en plusieurs produits, par exemple le sel de *O*-acylurée (Chan *et al.*, 1988) (Figure 39). La vérification du marquage de l'enzyme par le EDC a été effectuée à l'aide d'un SDS-PAGE, d'un IEF (Figure 24) et par spectrométrie de masse (Figure 25). Une différence a été observée dans la distance de migration entre l'AbfB₂ marquée et l'AbfB₂ non marquée. Normalement, l'enzyme marquée devrait voir son poids moléculaire augmenté à cause des ajouts de carbodiimides. En conséquence, l'enzyme marquée devrait migrer moins loin que l'enzyme non marquée. Cependant, nos résultats montrent le contraire. Lors d'un SDS-PAGE, les molécules de SDS vont se fixer sur les protéines. Puisque le ratio molécules de SDS/longueur de la protéine devrait être le même d'une protéine à l'autre, elles devraient migrer à travers le gel de séparation non pas en fonction de leur charge mais selon leur masse. L'ajout de molécules de carbodiimide sur les acides aminés carboxyliques change peut-être le ratio normal molécules de SDS/longueur de la protéine, ce qui pourrait expliquer sa tendance à migrer plus rapidement. Comme la de

différence migration entre l'enzyme inactivée et l'enzyme non inactivée ne correspond pas à un dimère d'AbfB₂, on peut affirmer que l'inactivation n'est pas due à une liaison ou à une agrégation des molécules d'enzymes ensemble.

Puisque certains des résidus carboxyliques sont marqués, la protéine perdra certaines charges négatives. Ainsi, lors d'une focalisation isoélectrique l'AbfB₂ marquée devrait migrer plus près de la cathode que la protéine non modifiée, c'est d'ailleurs ce qui a été observé (Figure 24). La spectrométrie de masse a finalement confirmé le marquage de l'enzyme. Toutes les molécules ont été marquées puisqu'aucune masse n'a été observée à 33 183,4 Da (Figure 25). Cependant, le large éventail de masses retrouvées indique que nous sommes en présence d'une population hétérogène. Théoriquement, le marquage complet par le carbodiimide aurait dû engendrer une molécule ayant des ajouts de 155,71 Da. Tout porte à croire que la population retrouvée possède des ajouts de 3 à 12 carbodiimides.

6. AMIDATION DES RÉSIDUS CARBOXYLIQUES

L'utilisation d'un amine lors de l'inactivation des résidus carboxyliques avec un carbodiimide permet la formation d'un seul produit final. Cette technique empêche la formation de différents produits secondaires comme lors de l'utilisation d'un carbodiimide seul. En effet, la présence d'un nucléophile puissant comme la glycine méthyle ester dans la solution empêche la protonation de l'intermédiaire *O*-acylurée par le solvant. L'amine attaquera le carbodiimide fixé aux résidus carboxyliques puisque ce dernier est protonné permettant ainsi la formation de *N,N'*-dialkylurée. (Figure 39) L'utilisation d'un amine affecte le poids moléculaire de la protéine, mais n'affecte pas la charge des résidus carboxyliques modifiés (Tawfik, 1996).

La vérification du marquage de l'enzyme a été effectuée par SDS-PAGE, IEF (Figure 26) et spectrométrie de masse (Figure 27). Le phénomène rapporté lors de l'exécution d'un SDS-PAGE suite à l'inactivation de l'enzyme par le EDC (section 5.0) se reproduit lors de l'amidation de l'enzyme. Le pI, quant à lui, est de beaucoup inférieur à celui de la protéine n'ayant pas été inactivée (6,90 au lieu de 8,18). Il a été mentionné

que la charge des résidus carboxyliques n'était pas modifiée par l'ajout d'un amide (Tawfik, 1996). La baisse de pI peut s'expliquer par une modification de l'état de transition des acides aminés près des résidus carboxyliques modifiés engendrant ainsi une modification de la charge globale de la protéine. La modification de l'enzyme a été confirmée par spectrométrie de masse. Comme dans le cas de l'inactivation avec le EDC (Figure 25), nous sommes en présence d'une population hétérogène puisque plusieurs masses sont retrouvées entre 33 693 et 34 200 Da (Figure 27). Certaines de ces masses correspondent à des ajouts de glycine méthyle ester de l'ordre de 71,6 Da. Il semble y avoir de 7 à 12 ajouts.

L'amidation de l'enzyme a aussi été effectué lorsque les résidus catalytiques de cette dernière étaient protégés par un sucre. L'analyse par spectrométrie de masse vient confirmer la présence d'une population de molécules hétérogènes (Figure 28). Cependant, cette population semble posséder des masses moléculaires quelques peu inférieures à celles de l'enzyme dont le site catalytique n'a pas été protégé (Figure 27). Les masses sont comprises entre 33 609 et 34 123 Da. De plus, la plupart des pics correspondent à des ajouts de 6 à 13. Ce résultat laisse croire qu'il y aurait un résidu carboxylique qui serait protégé lors de cette expérience.

7. IDENTIFICATION DES PEPTIDES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

L'analyse des peptides de l'AbfB₂ en mode *nanospray* (Figure 29) et en mode *electrospray* (Figure 30) a permis d'identifier la plupart des peptides. La méthode LC-MS a permis d'identifier seulement trois peptides de plus que la méthode MS/MS en mode *nanospray*. Les trois séquences peptidiques qui n'ont pu être identifiées sont celles comprises entre autres dans les séquences d'acides aminés 44 à 93, 94 à 110 et 111 à 161 (Tableau XII). Les peptides 44 à 93 et 111 à 161 n'ont pas été détectés à cause de leur grosseur. En effet, les valeurs de m/z supérieures à 1400 ne sont pratiquement pas détectables en spectrométrie de masse. Quant au peptide 94 à 110, il n'a peut-être pas été ionisé. Il aurait fallu effectuer une digestion avec une autre protéase afin d'obtenir d'autres peptides pour pouvoir compléter l'identification de la séquence peptidique. Les

trois peptides non identifiés comprennent 7 acides aspartiques. Ce nombre est élevé puisque la séquence peptidique entière comprend 20 acides aminés aspartate et glutamate. C'est donc dire qu'une analyse en spectrométrie de masse des peptides de l'enzyme modifiée par un carbodiimide ou par un amine n'aurait peut-être pas permis l'identification des résidus carboxyliques modifiés.

8. MARQUAGE RADIOACTIF DE L'ENZYME

8.1 [^{14}C] EAC

Afin d'identifier les résidus carboxyliques marqués par un carbodiimide ou par un amine, un marquage radioactif de l'enzyme a été effectué. En effet, il aurait été très laborieux d'essayer seulement par spectrométrie de masse d'identifier les peptides modifiés. En utilisant un agent chimique radio-marqué, il est possible d'identifier les pics chromatographiques radioactifs contenant les peptides modifiés. Cette expérience est effectuée en parallèle avec le même agent chimique non-radioactif. Les peptides marqués qui posséderont les mêmes temps d'élution que les peptides radioactifs seront identifiés par spectrométrie de masse. Le [^{14}C] EAC a été utilisé pour le marquage de l'enzyme puisque ce dernier était le seul carbodiimide radioactif disponible. Cependant, cet agent possède une efficacité d'inactivation de 30% inférieur à celle du EDC (section 5.0). L'incorporation du [^{14}C] EAC a été calculée et 0,33 moles de [^{14}C] EAC ont réagi avec 1 mole de résidus carboxyliques. C'est donc dire qu'en moyenne, 7 résidus carboxyliques ont été marqués (Tableau XIII). Ce résultat corrobore celui obtenu par spectrométrie de masse suite à l'inactivation de l'enzyme avec le EDC (section 5.0). Un SDS-PAGE suivi d'un autoradiogramme ont été effectués afin de confirmer la nature covalente de la liaison formée entre l'enzyme et l'inhibiteur (Figure 31). En effet, une liaison non-covalente n'aurait pas résisté à la dénaturation et à la réduction lors du SDS-PAGE. La molécule radioactive se serait détachée de la protéine dénaturée et il n'y aurait pas eu de bande radioactive à 30 kDa à la suite de l'autoradiogramme. Cependant, les bandes correspondant à l'AbfB₂ inactivée sont beaucoup plus diffuses que celles correspondant à la XlnA₂ inactivée servant de contrôle positif. Ce phénomène s'explique

par le fait que le carbodiimide EAC est moins efficace que le EDC pour l'inactivation de l'AbfB₂ (section 8.1 des résultats). Le EAC ne permettant pas d'inactiver à 100% le mélange protéique de l'AbfB₂, il en résulte une population encore plus hétérogène qui possède une multitude de masses différentes.

L'analyse HPLC de la protéine radioactive digérée n'a pas été concluante. Le profil chromatographique indique qu'un grand nombre de peptides ont été générés (Figure 32A), cependant le profil radioactif ne révèle qu'un pic radioactif à 20 minutes (Figure 32B). De plus, ce pic radioactif correspond au temps d'élution du [¹⁴C] EAC (Figure 33). Il aurait dû y avoir plusieurs peptides radioactifs puisqu'il y a eu en moyenne 7 résidus carboxyliques marqués selon la stœchiométrie d'inactivation si on ne considère pas l'efficacité du carbodiimide. Il est à noter aussi que la quantité de radioactivité retrouvée à la suite du passage des peptides au HPLC (Figure 32A) est de beaucoup inférieure à la quantité de radioactivité injectée dans le HPLC (Tableau XIII). Les peptides radioactifs semblent donc être retenus par la résine C₁₈.

Le marquage radioactif des résidus catalytiques a également été effectué avec le [¹⁴C] EAC. La stœchiométrie d'inactivation, dans ce cas-ci, indique qu'il y a eu 0.78 moles de [¹⁴C] EAC d'incorporé pour 1 mole de résidus carboxyliques catalytiques. Il y aurait donc eu près de 2 résidus catalytiques d'inactivés par molécule d'enzyme (Tableau XIII). Lors des calculs d'incorporation, il est important de considérer l'efficacité du EAC envers l'AbfB₂. En effet, ce dernier vient inactiver seulement 70% des résidus carboxyliques. Pour cette raison, les calculs d'incorporation ont également été effectués en considérant une efficacité d'inactivation de 70% pour le [¹⁴C] EAC. Par contre, il se pourrait que les résidus catalytiques soient plus facilement inactivés par le [¹⁴C] EAC.

8.2 [¹⁴C] glycine éthyle ester

Le marquage radioactif des résidus carboxyliques a également été effectué avec la [¹⁴C] glycine éthyle ester puisqu'aucun peptide marqué au [¹⁴C] EAC n'a pu être identifié. La stœchiométrie de la réaction ne concorde pas avec celle obtenue lors du

marquage avec le [^{14}C] EAC. En effet, il y aurait 3,9 moles de [^{14}C] glycine éthyle ester qui aurait réagi avec 1 mole de résidus carboxyliques marqués au EDC (Tableau XIV). La dialyse servant à l'élimination du marqueur résiduel n'a sûrement pas permis d'éliminer ce dernier complètement. Un SDS-PAGE et un autoradiogramme ont quand même été effectués afin de confirmer le marquage de l'enzyme (Figure 34). Les bandes radioactives représentant l'enzyme marquée ne sont pas diffuses comme lors du marquage de l'enzyme avec le [^{14}C] EAC (Figure 31) puisque l'amidation a été précédé de l'inactivation des résidus carboxyliques avec le EDC. Il semble que l'utilisation du EDC a permis une meilleure modification des résidus carboxyliques accessibles puisque ce dernier possède une efficacité de 100% envers l'AbfB₂.

L'analyse au HPLC des peptides marqués avec la [^{14}C] glycine éthyle ester n'a cependant pas été plus efficace que celle effectuée avec les peptides marqués au [^{14}C] EAC. En effet, aucune radioactivité n'a été détectée alors que l'intensité des peptides était bonne (Figure 35). De plus, la radioactivité injectée dans le HPLC n'a pas été retrouvée à la suite de la chromatographie. Un acide carboxylique semble être impliqué dans l'hydrolyse du substrat. Il n'a cependant pas été possible d'identifier ce résidu carboxylique.

CONCLUSION

Plusieurs études effectuées dans le passé ont permis d'élucider le mécanisme de réaction de différentes α -L-arabinofuranosidases. Cependant, aucune étude n'a permis, jusqu'à maintenant, d'identifier le mécanisme et les acides aminés responsables de l'hydrolyse du substrat chez une α -L-arabinofuranosidase de la famille 62. D'où l'intérêt de vouloir s'attarder à la stéréochimie de réaction de l' α -L-arabinofuranosidase B (AbfB) de *S. lividans*.

Comme les études portaient sur le domaine catalytique, ce dernier a été isolé de son domaine de fixation au substrat. Le domaine catalytique a donc été sous-cloné, séquencé, produit, purifié et caractérisé. Les analyses par résonance magnétique nucléaire se sont avérées inefficaces pour identifier l'anomère d'arabinose formé immédiatement après l'hydrolyse par l'enzyme. L'instabilité des résidus *arabinofuranoses* relâchés engendre une mutarotation des anomères et une tautomérisation de ces derniers en *arabinopyranoses*. Ce phénomène a été confirmé par d'autres études effectuées antérieurement par Pitson et ses collaborateurs (1996). Afin de stabiliser la forme furanosidique de l'arabinose, le méthanol qui est un nucléophile plus puissant que l'eau a été utilisé. Cette méthode s'était avérée très efficace pour des α -L-arabinofuranosidases de rétention. Cependant, il a été impossible de stabiliser l'*arabinofuranose* libéré par le domaine catalytique de l'AbfB de cette manière. Nous avons maintenant une preuve indirecte que l'anomère formé possède une conformation inverse au carbone anomérique par rapport au lien glycosidique qui a été coupé. L'utilisation d'un nucléophile encore plus puissant que le méthanol permettrait peut-être de capturer la forme furanosidique de l'arabinose réputée très instable afin d'identifier l'anomère principalement formé.

L'autre partie du projet consistait à identifier les acides aminés catalytiques. Chez les glycosyles hydrolases, deux résidus acides sont responsables de cette catalyse. La séquence en acides aminés de l'AbfB₂ comprend un total de 20 glutamates ou aspartates. Une approche de modification chimique de ces résidus a donc été préconisée puisque la mutagenèse dirigée aurait été trop laborieuse. Le carbodiimide EDC s'est avéré le plus efficace pour l'inactivation de l'enzyme. L'inactivation de l'enzyme a été effectuée en

présence d'un nucléophile tel que la glycine méthyle ester. Les expériences de marquage en présence d'un oligosaccharide ont empêché l'inhibition de l'activité enzymatique et ont semblé protéger un résidu carboxylique. L'inactivation de l'enzyme a également été effectuée avec des inhibiteurs radioactifs de façon à identifier, suite à une digestion tryptique, les peptides comprenant des résidus marqués. L'inactivation et le radiomarquage de l'enzyme par les carbodiimides supporte l'hypothèse selon laquelle l'AbfB hydrolyserait le substrat à l'aide de deux résidus acides. Cependant, il a été impossible d'identifier ces deux acides aminés.

D'autres techniques devraient être considérées pour l'identification des acides aminés catalytiques. Récemment, deux nouvelles enzymes se sont rajoutées dans la famille 62 des glycosyles hydrolases ce qui porte le nombre à 7 membres. Ces enzymes sont l' α -L-arabinofuranosidase d'*Aspergillus sojae* et la xylanase-arabinofuranosidase de *Streptomyces chattanoogensis*. Un alignement de séquences primaires a été réalisé avec tous les membres de la famille (Figure 40). Une grande homologie avec l'AbfB₂ a été retrouvée chez la plupart des membres de la famille. En effet, l'AbfB₂ de *S. lividans* possède une homologie de 99% avec l' α -L-arabinofuranosidase B de *Streptomyces coelicolor*, de 81% avec la xylanase-arabinofuranosidase de *Streptomyces chattanoogensis*, de 74% avec l'arabinofuranosidase d'*Aspergillus sojae*, de 70% avec l'arabinofuranosidase d'*Aspergillus niger*, de 69% avec l'arabinofuranosidase d'*Aspergillus tubingensis* et de seulement 32% avec l'arabinofuranosidase C de *Pseudomonas fluorescens*. L'alignement a permis d'identifier 13 résidus aspartate et glutamate susceptibles d'être responsables de l'hydrolyse du substrat. Il serait donc maintenant moins difficile d'utiliser la mutagenèse dirigée afin de vérifier si les résidus catalytiques font partie de ces 13 acides aminés. La séquence du domaine catalytique de l'AbfB contient 3 acides aminés glutamates qui s'alignent parfaitement bien avec ceux des autres membres de la famille 62 (Figure 40). Comme environ 60% des familles appartenant aux glycosyles hydrolases dont les résidus catalytiques sont connus possèdent au moins un acide glutamique, il serait intéressant d'effectuer la mutagenèse dirigée sur ceux-ci. L'élucidation de la structure en trois dimensions pourrait aussi permettre d'identifier les résidus carboxyliques les plus proches du site actif afin de

Figure 40 : Alignement de séquences primaires effectué avec les membres de la famille 62. Les acides aminés non polaires sont en vert, les polaires en bleu pâle, les basiques en bleu foncé et les acides en rouge. L'alignement a été effectué avec le logiciel MOE version 2000.02. Les résidus acides conservés sont indiqués par une flèche. ABFB_STRLI : α -L-arabinofuranosidase B de *S. lividans*, ABFB_STRCO : α -L-arabinofuranosidase B de *S. coelicolor*, AXHA_ASPNG : arabinofuranosidase d'*A. niger*, AXHA_ASPTU : arabinofuranosidase d'*A. tubingensis*, XYNC_PSEFL : arabinofuranosidase C de *P. fluorescens*, ARF_ASPSO : arabinofuranosidase d'*A. sojae*, ARF-XYL_STRCH : xylanase-arabinofuranosidase de *S. chattanoogensis*.

	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590
1	ABFB_STRLI
2	ABFB_STRCO
3	AXHA_ASPNG
4	AXHA_ASPTU
5	XYNC_PSEFL
6	ARF_ASPSO
7	ARF-XYL_STRCH

	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675
1	ABFB_STRLI
2	ABFB_STRCO
3	AXHA_ASPNG
4	AXHA_ASPTU
5	XYNC_PSEFL
6	ARF_ASPSO
7	ARF-XYL_STRCH



pouvoir effectuer une mutagenèse sur ces derniers.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Claude Dupont pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de me joindre à son équipe, pour l'aide financière qu'il m'a apportée et pour les corrections apportées à mon mémoire. Merci au Dr. François Shareck pour avoir toujours été une oreille attentive et pour les nombreux conseils qu'il m'a prodigués. Un merci tout spécial au Dr. François Lépine pour m'avoir permis d'apprendre les rudiments de la spectrométrie de masse. Je voudrais le remercier pour ses encouragements et pour la confiance qu'il a porté en moi puisque je lui dois mon premier emploi.

Je voudrais également remercier tous les techniciens de laboratoires du groupe des streptomycètes qui ont contribué de près ou de loin à l'évolution de mon projet. Sans leur grand savoir-faire, nous aurions été bien souvent mal en point. Je voudrais remercier la petite fleur du laboratoire, Lisette Duval, pour sa bonté et sa patience infinie. Lisette tu resteras toujours dans mon cœur. Je voudrais également remercier Nicolas Leberre pour son aide précieuse lors des analyses de résonance magnétique nucléaire.

Merci à mes amis : Marie-Claude, Stéphanie, Pascale, Patrick et Pascal pour tous les beaux moments vécu ensemble. Je voudrais également remercier tous mes autres amis de l'IAF pour les nombreuses activités auxquelles j'ai participé et celles que nous participerons à l'avenir.

Finalement, je voudrais remercier mon père, Jean-Lévy, d'avoir été pour moi un modèle de patience, de persévérance, d'intelligence et d'amour tout au long de ma jeune vie. Je t'aime. Je voudrais également remercier ma mère, Nicole, la personne que j'admire et que j'aime le plus au monde pour avoir toujours cru en moi. Pour m'avoir soutenu tout au long de mes études. Et surtout pour m'avoir inculqué de bonnes valeurs. Je te dois tout.

BIBLIOGRAPHIE

- ARCAND, N., D. Kluepfel et R. Morosoli, (1993), β -mannanase of *Streptomyces lividans* 66 : cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme, *Biochemical Journal*, 290 : 857-863.
- ASPINAL, G.O., (1980), Chemistry of cell wall polysaccharides, *The Biochemistry of Plants*, 3 : 473-500.
- AXAMAWATY, M.T.H., G.W.J. Fleet, K.A. Hamah, S.K. Namgoong et M.L. Sinnott, (1990), Inhibition of the alpha-L-arabinofuranosidase III of *Monilinia fructigena* by 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-threitol and 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol, *Biochemical Journal*, 266 : 245-249.
- BACHMANN, S.L. et A.J. McCarthy, (1991), Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 : 2121-2130.
- BRAUN, C., M. Andreas, L. Ziser et S.G. Withers, (1993), Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of both the cleavage pattern and the stereochemical outcome of the hydrolysis reactions catalyzed by various glycosidases, *Analytical Biochemistry*, 212 : 259-262.
- BRAY, M.R. et A. Clarke, (1990), Essential carboxy groups in xylanase A, *Biochemical Journal*, 270 : 91-96.
- BRILLOUET, J.M., J.C. Moulin et E. Agosin, (1985), Production, purification and properties of an arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*, *Carbohydrates Research*, 144 : 113-126.

- BUTSCHAK, G., B. Schulze, A. Kuster, T. Niederhausen, U. Niemeyer et A. Graffi, (1990), Distribution studies of alpha-L-arabinofuranosidase already unstable at pH 7,0 (37 degrees C) in tumor-bearing mice in connection with its possible use to enhance the selectivity of the chemotherapy of malignant tumors, *Archiv fur Geschwulstforschung*, 60 : 193-200.
- CHAN, V.W.F., A.M. Jorgensen et C.L. Borders, Jr., (1988), Inactivation of bovine thrombin by water-soluble carbodiimides : the essential carboxyl group has a pK_a of 5.51, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 : 709-716.
- CLARKE, A.J. et M. Yaguchi, (1985), The role of carboxy groups in the function of endo- β -1,4-glucanase from *Schizophyllum commune*, *European Journal of Biochemistry*, 149 : 233-238.
- COUGHLAND, M.P. et G.P. Hazlewood, (1993), β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems : biochemistry, molecular biology and applications (Review), *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17 : 259-289.
- CROUS, J.M., I.S. Pretorius et W.H. Vanzyl, (1996), Cloning and expression of the alpha-L-arabinofuranosidase gene (ABFB) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46 : 256-260.
- DAVIES, G. et B. Henrissat, (1995), Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, 3 : 853-859.
- FERNANDEZESPINAR, M.T., J.L. Pena, F. Pinaga et S. Valles, (1994), alpha-L-Arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*, *Federation of European Microbiological Societies*, 115 : 107-112.

- FILHO, E.X.F., J. Puls et M.P. Coughlan, (1996), Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 168-173.
- GABORIAUD, C., V. Bissery, T. Benchetrit et J.P. Mornon, (1987), Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences, *Federation of European Biochemical Societies*, 224 : 149-155.
- GASPARIC, A., R. Marinseklogar, J. Martin, R.J. Wallace, F.V. Nekrep et H.J. Flint, (1995), Isolation of genes encoding beta-D-xylanase, beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities from the rumen bacterium *Prevotella ruminicola* B(1)4, *Federation of European Microbiological Societies*, 125 : 135-141.
- GEORGE, A.L. et C.L. Borders, Jr., (1979), Essential carboxyl residues in yeast enolase, *Biochemical and Biophysical acta*, 87 : 59-65.
- GILEAD, S. et W. Shoham, (1995), Purification and characterization of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 : 170-174.
- GILBERT, M., R. Morosoli, F. Shareck et D. Kluepfel, (1995), Production and secretion of proteins by streptomycetes, *Critical Reviews in Biotechnology*, 15 : 13-39.
- GREVE, L.C., J.M. Labavitch et R.E. Hungate, (1984), alpha-L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8 : purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall, *Applied and Environmental Microbiology*, 47 : 1135-1140.
- GOBULEV, A.M., A.Y. Kilimnik, N.A. Rodionova, L.V. Kaprelyants et K.N. Neustroev, (1993), Isolation and Properties of Arabinofuranosidase from *Geotrichum-candidum*-3C, *Biochemistry-Russia*, 58 : 124-128.

- HATAKANA, H., H. Imaoka, S. Tajima et S. Kasai, (1991), Purification and properties of an alpha-L-arabinofuranosidase from cotyledons of soybean seedling, *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 : 2599-2605.
- HENRISSAT, B., (1991), A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, 280 : 309-316.
- HENRISSAT, B. et A. Bairoch, (1993), New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, 293 : 781-788.
- HENRISSAT, B., I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn et J.P. Mornon, (1995), Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 : 7090-7094.
- HENRISSAT, B. et A. Romeu, (1995), Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, 311 : 350-351.
- HENRISSAT, B. et A. Bairoch, (1996), Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, 316 : 695-696.
- HENRISSAT, B. et G. Davies, (1997), Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology*, 7 : 637-644.
- HESPELL, R.B. et P.J. O'Bryan, (1992), Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 : 3425-3428.

- HEWICK, R.M., M.W. Hunkapiller, L.E. Hood, W.S. Dreyer, (1981), A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator, *Journal of biological chemistry*, 256 : 7990-7997.
- HIGUCHI, R., (1990), Recombinant PCR, *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*, Edited by : M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White, Academic Press, Inc., 177-183.
- HIRANO, Y., Y. Tsumuraya et Y. Hashimoto, (1994), Characterization of spinach leaf alpha-L-arabinofuranosidases and β -galactosidases and their synergistic action on an endogenous arabinogalactan-protein, *Physiologia Plantarum*, 92 : 286-296.
- HOPWOOD, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward et H. Schrepf, (1985), Genetic Manipulation of *Streptomyces*, *A Laboratory Manual*, Norwich : The John Innes Foundation, 356 pages.
- HUGHES, R.A. et Rudge A.J., (1994), Deoxynojirimycin : synthesis and biological activity, *Natural Product Reports*, 135-162.
- KAJI, A. et O. Yoshihara, (1970), Production and properties of alpha-L-arabinofuranosidase from various strains of *Corticium rolfsii*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 34 : 1249-1253.
- KAJI, A., M. Sato et Y. Tsutsui, (1981), An alpha-L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces sp.* No17-1, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 : 925-931.
- KAJI, A., (1984), L-arabinosidase, *Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 42 : 383-395.

- KANEKO, S. et I. Kusakabe, (1995), Substrate specificity of alpha-L-Arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6 toward arabino-oligosaccharides, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59 : 2132-2133.
- KARIMI, S. et O.P. Ward, (1989), Comparative study of some microbial arabinan-degrading enzymes, *Journal of Industrial Microbiology*, 4 : 173-80.
- KELLET, L.E., D.M. Poole, L.M.A. Ferraira, A.J. Durrant, G.P. Hazlewood et H.J. Gilbert, (1990), Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes, *Biochemal Journal*, 272 : 369-376.
- KIM, K.S., T.G. Lilburn, M.J. Renner et J.A. Breznak, (1998), *arfI* and *arfII*, two genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase in *Cytophaga xylanolytica*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 : 1919-1923.
- KIMURA, I., H. Sasahara et S. Tajima, (1995), Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 : 334-339.
- KOMAE, K., A. Kaji et M. Sato, (1982), An alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389, *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 : 1899-1905.
- LABORDA, F., A.H. Fielding et R.J.W. Byrde, (1973), Extra- and intra-cellular alpha-L-arabinofuranosidase of *Sclerotinia fructigena*, *Journal of General Microbiology*, 79 : 321-329.
- LAEMMLI, U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 : 680-685.

- LAWSON, S.L., W.W. Wakarchuk et S.G. Withers, (1996), Effects of both shortening and lengthening the active site nucleophile of *Bacillus circulans* xylanase on catalytic activity, *Biochemistry*, 35 : 10110-10118.
- LEE, S.F. et C.W. Forsberg, (1987), Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Canadian Journal of Microbiology*, 33 : 1011-1016.
- LEGLER, G., (1990), Glycoside hydrolases : Mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors, *Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 48 : 319-385.
- LEVER, M., T.A. Walmsley, R.S. Visser et S.J. Ryde, (1984), Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines, *Analytical Biochemistry*, 139 : 205-211.
- LIU, W., N.B. Madsen, C. Braun et S.G. Withers, (1991), Reassessment of the catalytic mechanism of glycogen debranching enzyme, *Biochemistry*, 30 : 1419-1424.
- LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall, (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193 : 265-275.
- MANIN, C., F. Shareck, R. Morosoli, et D. Kluepfel, (1994), Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*), *Biochemical Journal*, 302 : 443-449.
- MARGOLLES-CLARK, E., M. Tenkanen, T. Nakarisetala et M. Penttila, (1996), Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 3840-3846.

- MATHESON, N.K. et H.S. Saini, (1977), α -L-arabinofuranosidases and β -D-galactosidases in germinating-lupin cotyledons, *Carbohydrates Research*, 57 : 103-116.
- MONDOU, F., F. Shareck, R. Morosoli et D. Kluepfel, (1986), Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*, *Gene*, 49 : 323-329.
- MORALES, P., A. Madano, J.M. Sendra et J.A. Perezgonzalez, (1995), Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus Polymixa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 17 : 424-429.
- NAIDER, F., Z. Bohak et J. Yariv, (1972), Reversible alkylation of a methionyl residue near the active site of galactosidase, *Biochemistry*, 11 : 3202-3208.
- NELSON, T.E. et J. Larner, (1970), Studies on the action of amylo-1,6-glucosidase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 198 : 538-545.
- PAGÉ, N., D. Kluepfel, F. Shareck et R. Morosoli, (1996), Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 109-114.
- PITSON, S.M., A.G.J. Voragen et G. Beldman, (1996), Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases, *Federation of European Biochemical Societies*, 398 : 7-11.
- ROCHE, N., C. Desgranges et A. Durand, (1994), Study on the solid-state production of a thermostable α -L-arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp, *Journal of Biotechnology*, 38 : 43-50.

- SANGER, F., S. Nicklen et A.R. Coulson, (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 : 5463-5467.
- SAHA, B.C. et R.J. Bothast, (1998), Effect of carbon source on production of alpha-L-arabinofuranosidase by *Aureobasidium pullulans*, *Current Microbiology*, 37 : 337-340.
- SAMBROOK, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis, (1989), Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHWARZ, W.H., K. Bromanmeier, B. Krause, F. Lottspeich et W.L. Standenbauer, (1995), Debranching of arabinoxylan : Properties of the thermoactive recombinant alpha-L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 : 856-860.
- SCHYNS, P.J.Y.M.J., J. Defrankrijker, A.J.B. Zehnder et A.J.M. Stams, (1994), Production, purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1, *Microbiology and Biotechnology*, 42 : 548-554.
- SHARECK, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli et D. Kluepfel, (1991), Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*, *Gene*, 107 : 75-83.
- SHARECK, F., P. Biely, R. Morosoli et D. Kluepfel, (1995), Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals gene encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P, *Gene*, 153 : 105-109.
- SHULMAN, M.L., S.D. Shiyon et A.Y. Khorlin, (1976), Specific irreversible inhibition of sweet-almond beta-glucosidase by some beta-glycopyranosyl-epoxy-alkanes

and beta-D-glucopyranosyl isothiocyanate, *Biochemical and Biophysical Acta*, 445 : 169-181.

SINHA, N. et S. Sengupta, (1995), Simultaneous production of alpha-arabinofuranosidase and xylanase by *Termitomyces clypeatus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 : 359-360.

SINNOTT, M.L., (1990), Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer, *Chemistry*, 90 : 1171-1202.

SVENSSON, B., A.J. Clarke, I. Svendsen et H. Moller, (1990), Identification of carboxylic acid residues in glucoamylase G2 from *Aspergillus niger* that participate in catalysis and substrate binding, *European Journal of Biochemistry*, 188 : 29-38.

TAJANA, E., A. Fiechter et W. Zimmermann, (1992), Purification and characterization of two alpha-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 : 1447-50.

TANAKA, M. et T. Uchida, (1978), Purification and properties of alpha-L-arabinofuranosidase from plant *Scopolia japonica calluse*, *Biochemical and Biophysical Acta*, 522 : 531-40.

TAWFIK, S.D., (1996), Amidation of Carboxyl Groups, *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker Humana Press Inc., Totowa, NJ.

TENFORDE, T., R.A. Fawwaz et N.K. Freeman, (1972), Nuclear magnetic resonance and infrared studies on the tautomerisation of 1-ethyl-3-(3'dimethylaminopropyl)-carbodiimide, *Journal of Organic Chemistry*, 37 : 3372-3374.

- 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, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 : 815-820.
- TIMKOVICH, R., (1977), Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins, *Analytical Biochemistry*, 79 : 135-143.
- TOMME, P., R.A.J. Warren, Jr.R.C. Miller, D.G. Kilburn et N.R. Gilkes, (1995), in *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrate* (Saddler. J.N. and M.H. Penner, eds.), ACS Symposium Series No 618, American Chemical Society, Washington, 142-163.
- UESAKA, E., M. Sato, M. Raiju et A. Kaji, (1978), alpha-L-arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*, *Journal of Bacteriology*, 133 : 1073-1077.
- UTT, E.A., C.K. Eddy, K.F. Keshav et L.O. Ingram, (1991), Sequencing and expression of *Butyrivibrio fibrisolvens xylβ* gene encoding a novel bifunctional protein with β-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 : 1227-1234.
- VINCENT, P., F. Shareck, C. Dupont, R. Morosoli et D. Kluepfel, (1997), New α-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans* : cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme, *Biochemical Journal*, 322 : 845-852.
- WHITE, A. et D.R. Rose, (1997), Mechanism of catalysis by retaining β-glycosyl hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology*, 7 : 645-651.
- WITHERS, S.G., D. Dombroski, L.A. Berven, D.G. Kilburn, R.C.Jr. Miller, R.A.J. Warren et N.R. Gilkes, (1986), Direct ¹H N.M.R. determination of the stereochemical course of hydrolyses catalysed by glucanase components of the

- cellulase complex, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139 : 487-494.
- WITHERS, S.G., I.P. Street, P. Bird et D.H. Dolphin, (1987), 2-Deoxy-2-fluoroglucoside : A novel classe of mechanism-based glucosidase inhibitors, *Journal of American Chemical Society*, 109 : 7530-7531.
- WITHERS, S.G., K. Rupitz et I.P. Street, (1988), 2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides, *Journal of Biological Chemistry*, 263 : 7929-7932.
- WITHERS, S.G. et R. Aebersold, (1995), Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases, *Protein Science*, 4 : 361-372.
- WITTMANN, S., F. Shareck, D. Kluepfel et R. Morosoli, (1994), Purification and characterization of the CelD endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 : 1701-1703.
- WOOD, T.M. et S.I. McCrae, (1996), Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori* : Purification and properties of an alpha-L-arabinofuranosidase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 : 538-545.
- ZVERLOV, V.V., W. Liebl, M. Bachleitner et W.H. Schwarz, (1998), Nucleotide sequence *arfB* of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of alpha-L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases, *Federation of European Microbiological Societies*, 164 : 337-343.
- (1993), Le goût caché du vin, Des enzymes ajoutés au jus de raisin en libèrent les arômes, *Pour la science*, 183, p.12.

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>.

http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_table.html.

<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY>

ANNEXES

ANNEXE I

Liste des produits chimiques

Acétate de sodium (Fluka)
Acétone (BDH)
Acétonitrile (OmniSolv)
Acide acétique glaciale (Fisher)
Acide borique (Bio-Rad)
Acide citrique (OmniSolv)
Acide 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonique (Sigma)
Acide formique (J.T. Baker)
Acide hydrochlorique (Fisher)
Acide 4-Morpholineéthanesulfonique (Mes) (Fluka Chemika)
Acide succinique (Sigma)
Acide thioglycolique (Sigma)
Acide trifluoroacétique (TFA) (Fluka)
Acide N-Tris (Hydroxymethyl) methyl 2 aminoéthanesulfonique (Sigma)
Acrylamide (Bio-Rad)
Adénosine triphosphate (Pharmacia LKB)
Agar (Difco)
Agarose (Boehringer Mannheim)
Anhydride acide acétique (Sigma)
Anticorps anti-lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)
Arabinane de la betterave à sucre (Megazyme)
Arabinoxylane de blé (Megazyme)
Arabinoxylane de seigle (Megazyme)
Azodure de sodium (Fisher)
Bacto Simmons-Citrate Agar (Difco)
Bacto-Tryptone (Difco)
Bicarbonate d'ammonium (MCIB)
BCIP : phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (Boehringer Mannheim)
Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
Bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad)
Borate de sodium décahydrate (J.T.Baker)
Bromure d'éthidium (Bio-Rad)
Casamino acid (Difco)
Chloroforme (BDH)
Chlorure de calcium (BDH)
Chlorure de cobalt (J.T. Baker)
Chlorure de cuivre (Fisher)
Chlorure de fer (Anachemia)
Chlorure de magnésium (BDH)
Chlorure de manganèse (Fisher)
Chlorure de nitro bleu tétrazolium (NBT) (Boehringer Mannheim)

Chlorure de potassium (Mallinckrodt Chemical works)
Chlorure de sodium (BDH)
Chlorure de zinc (Fisher)
Citrates de sodium (BDH)
2'-Déoxyadénine-5'-triphosphate : dATP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxycytosine-5'-triphosphate : dCTP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxyguanine-5'-triphosphate : dGTP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxythymidine-5'-triphosphate : dTTP (Pharmacia LKB)
Deutérium (Sigma)
Diméthylformamide (BDH)
Dithioerythritol (Bio-Rad)
EcoLite™ (+) (ICN)
EDTA : éthylènediamine tétraacétate (BDH)
Ethanol (BDH)
Ether (OmniSolv)
1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide (EDC) (Fluka Chemika)
1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (Sigma)
1-éthyle-3-(3-diméthyleaminopropyle) carbodiimide méthiodide (EAC) (Aldrich)
Extrait de bœuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Formaldéhyde (BDH)
Gélatine (Bio-Rad)
Glucose (BDH)
Glycérol (ICN)
Glycine (ICN)
Glycine éthyle ester (Sigma)
[¹⁴C]Glycine éthyle ester (Moravék Biochemical)
Glycine méthyle ester (Sigma)
Guanidine-HCl (ICN)
Huile de paraffine (BDH)
Hydroxyde de sodium (Fisher)
Hydroxyquinoline (Sigma)
Iodoacétamide (Sigma)
Iodométhane (Sigma)
[¹⁴C]Iodométhane (Sigma)
Isopropanol (BDH)
Isopropyl-β-D-thiogalactoside (Gibco BRL)
Lait écrémé déshydraté (Difco)
Liquide à scintillation EcoLite (ICN)
Maltose (Difco)
β-Mercaptoéthanol (Pharmacia)
Méthanol (OmniSolv)
Méthionine (Sigma)
4-méthyleumbélliféryle-α-L-arabinofuranoside (Sigma)
4-méthyleumbélliféryle-α-L-arabinopyranoside (Sigma)
Molybdate d'ammonium heptahydrate (BDH)

Nitrate de sodium (BDH)
p-nitrophényle- α -L-arabinofuranoside (Sigma)
p-nitrophényle- α -L-arabinopyranoside (Sigma)
NZ-amine A (Sheffields Products)
Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)
Phosphate de sodium monobasique (Fluka)
Phosphate de sodium dibasique (Fluka)
Phosphate de potassium di-hydrogène (BDH)
Phosphate de di-potassium hydrogène (BDH)
Phénol (Boehringer Mannheim)
Polyéthylène glycol 1500 (Boehringer Mannheim)
Polyéthylène glycol 6000 (Sigma)
L-Proline (Gibco BRL)
Propionamide (Aldrich Chemical Co)
Sodium dodécyl sulfate (BDH)
Standard de masse moléculaire d'ADN (1 Kb Ladder) (Gibco BRL)
Standard de masse moléculaire d'ADN (1 Kb Plus Ladder) (Gibco BRL)
Standard de poids moléculaire de protéines Rainbow mix (Amersham)
Standard de poids moléculaire de protéines (Bio-Rad)
Standard de poids moléculaire de protéines [¹⁴C] méthylées (Amersham)
Sucrose (BDH)
Sulfate d'ammonium (Fisher)
Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
Sulfate de fer (J.T. Baker)
Sulfate de magnésium (Fisher)
Sulfate de manganèse (Fisher)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de zinc (J.T. Baker)
Tampon nucléase S1 (Pharmacia LKB)
Tampon One-Phor-All 10X (Pharmacia LKB)
Tampon polymérase *Pfu* (Stratagene)
TEMED : N,N,N',N'-tétra méthyl éthylène diamine (Bio-Rad)
Thiostreptone (Sigma)
Tris-Base (Boehringer Mannheim)
TSB : Tryptic Soy Broth (Difco)
Tween 20 (Bio-Rad)
Tween 80 (Fisher)
Tyrosine (Gibco BRL)
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Gibco BRL)
Xylane d'épeautres d'avoine (Sigma)
Xylène de cyanole (Bio-Rad)
Xylose (Sigma)

Enzymes

ADN polymérase *Pfu* (Stratagene)

Arabinofuranosidase A de *A. Niger* (Megazyme)

ARNase A (Pharmacia LKB)

Enzymes de restriction (Pharmacia LKB)

Lysosyme (Pharmacia LKB)

S1 nucléase (Pharmacia LKB)

T4 ADN ligase (Pharmacia LKB)

Trypsine (Sequencing Grade) (Promega)

Trousses

Trousse Sephaglas BandPrep (Pharmacia)

ANNEXE II

Milieu Bennett-Thio :

0,1% (p/v) d'extrait de levure

0,1% (p/v) d'extrait de bœuf

0,2% (p/v) de «N.Z. Amine A»

1,0% (p/v) de maltose

Ajustement du pH à 7,2 avec du NaOH

Ajout à 2% (p/v) d'agar fondu

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

Ajout de 0,005% (v/v) de thioestreptone lorsque la température est d'environ 55°C

Coulage des plaques de Pétri

ANNEXE III

Milieu R5 :

Ajouter à 3,7% (p/v) d'agar fondu une solution contenant :

10,3% (p/v) de sucrose

0,025% (p/v) de K_2SO_4

1,012% (p/v) de $MgCl_2$

1% (p/v) de glucose

0,01% (p/v) de «Casamino acid»

0,2% (v/v) de «Trace elements»

0,004% (p/v) de $ZnCl_2$

0,02% (p/v) de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

0,001% (p/v) de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

0,001% (p/v) de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

0,001% (p/v) de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

0,001% (p/v) de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 7H_2O$

0,5% (p/v) d'extrait de levure

0,573% (p/v) de tampon Tes

Une fois cette solution stérilisée à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min., on ajoute au milieu tiède les éléments suivant :

0,005 % (p/v) de KH_2PO_4

0,22% (p/v) de $CaCl_2$

0,0005% (p/v) de $CuSO_4$

0,3% (p/v) de L-proline

0,01% (p/v) de méthionine

0,04% (p/v) de tyrosine (diluée dans NaOH 1N)

Coulage des plaques de Pétri

ANNEXE IV

Milieu liquide 2xTY :

1,6% (p/v) de Bacto-Tryptone

1,0% (p/v) d'extrait de levure

0,5% (p/v) de NaCl

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

ANNEXE V

Milieu H plates :

1,2% (p/v) d'agar

1,0% (p/v) de Bacto-Tryptone

0,8% (p/v) de NaCl

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

ANNEXE VI

Milieu TSB (Tryptic Soy Broth) :

2,75% (p/v) de TSB

0,0005% (p/v) de thioestreptone

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

ANNEXE VII

Milieu M14 :

0,14% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,50% (p/v) de K_2HPO_4 (base)

0,10% (p/v) de KH_2PO_4 (acide)

0,10% (v/v) de sels de Mandels

0,014% (p/v) de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,016% (p/v) de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,050% (p/v) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,020% (p/v) de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,20% (v/v) de Tween 80

ajustement du pH à 7,4

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

0,03% (p/v) de MgSO_4

0,03% (p/v) de CaCl_2

1,00% (p/v) de xylose

0,0005% (p/v) de thiostreptone

ANNEXE VIII

Milieu M15 :

0,14% (p/v) de NaNO_3

0,50% (p/v) de K_2HPO_4 (base)

0,10% (p/v) de KH_2PO_4 (acide)

0,10% (v/v) de sels de Mandels (voir annexe VII pour composition)

0,20% (v/v) de Tween 80

ajustement du pH à 7,4

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

0,03% (p/v) de MgSO_4

0,03% (p/v) de CaCl_2

1,00% (p/v) de glucose

0,0005% (p/v) de thiostreptone

ANNEXE IX

Milieu minimal Stewart-4MUA :

0,10% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,14% (p/v) de KH_2PO_4

0,50% (p/v) de K_2HPO_4

0,05% (p/v) d'extrait de levure

0,05% (p/v) de KCl

0,10% (v/v) de sels de Mandels (voir annexe VII pour composition)

2% (p/v) d'agar fondu

Ajustement du pH à 7,2

Stérilisation du milieu à 121°C et à 104 kPa pendant 20 min.

0,5% (p/v) de glucose

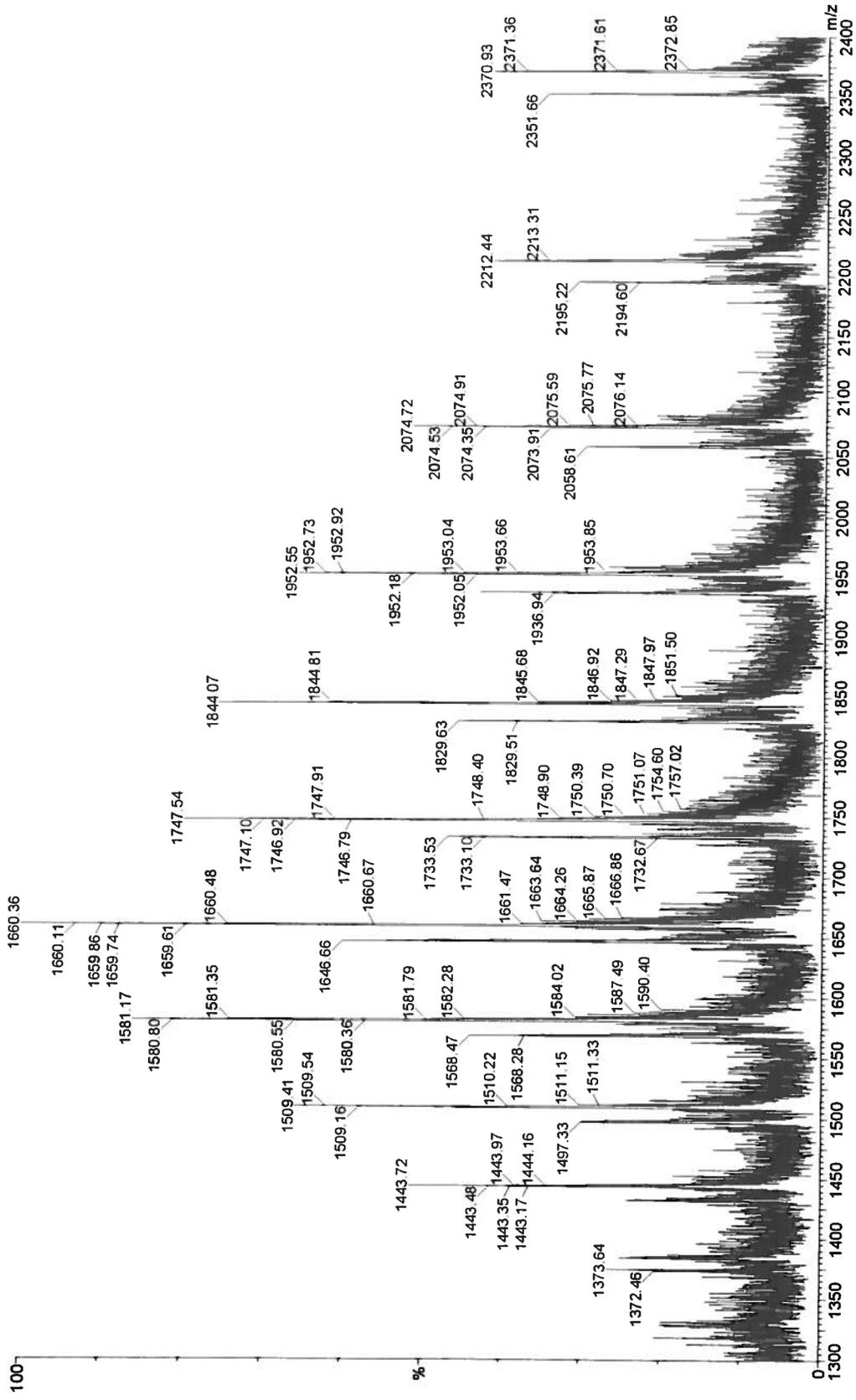
0,05% (p/v) de MgSO_4

0,005% (p/v) de thiostreptone

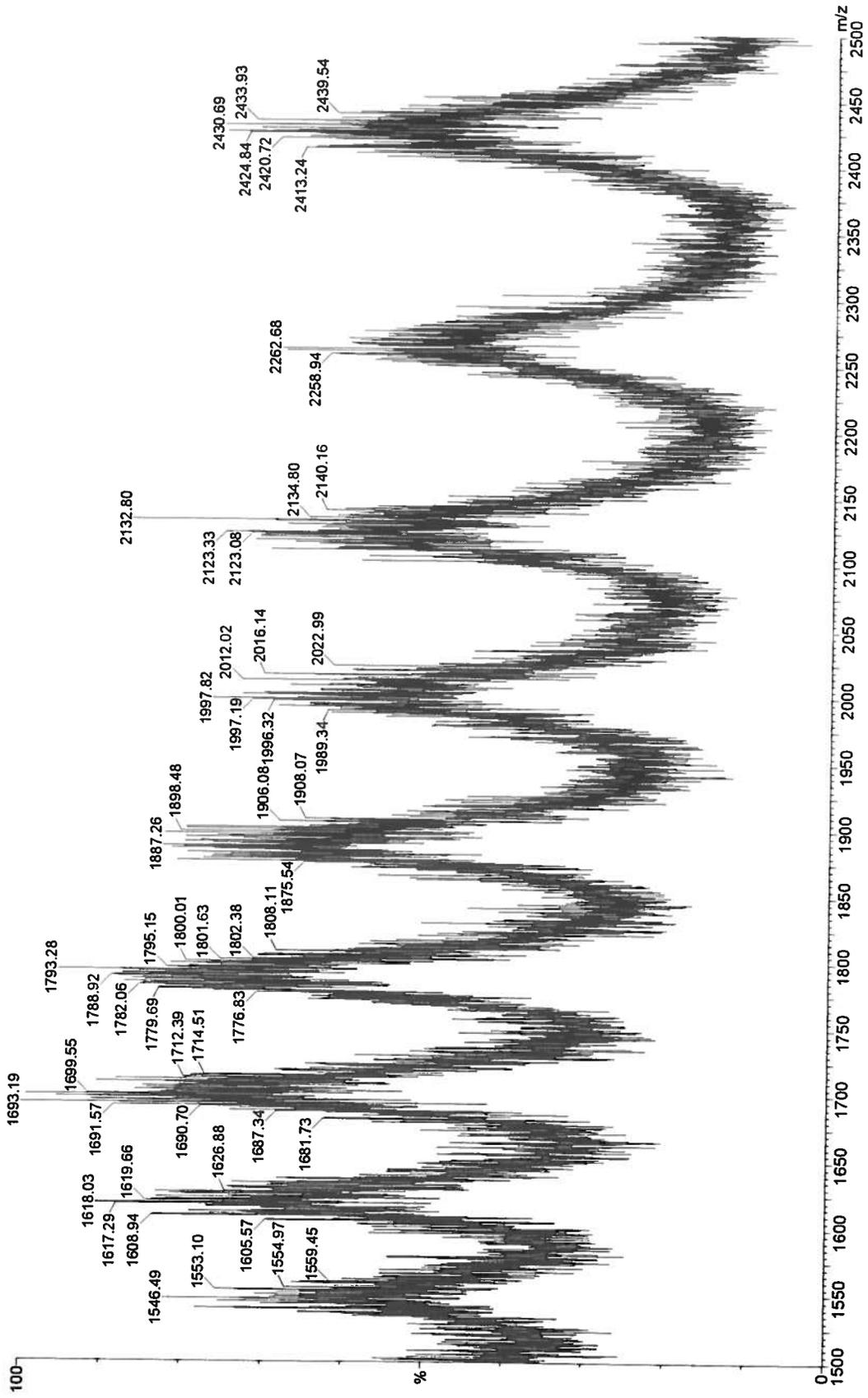
0,03% (p/v) du substrat synthétique 4-méthyleumbélliféryle-alpha-L-arabinopyranoside

Coulage des plaques de Pétri

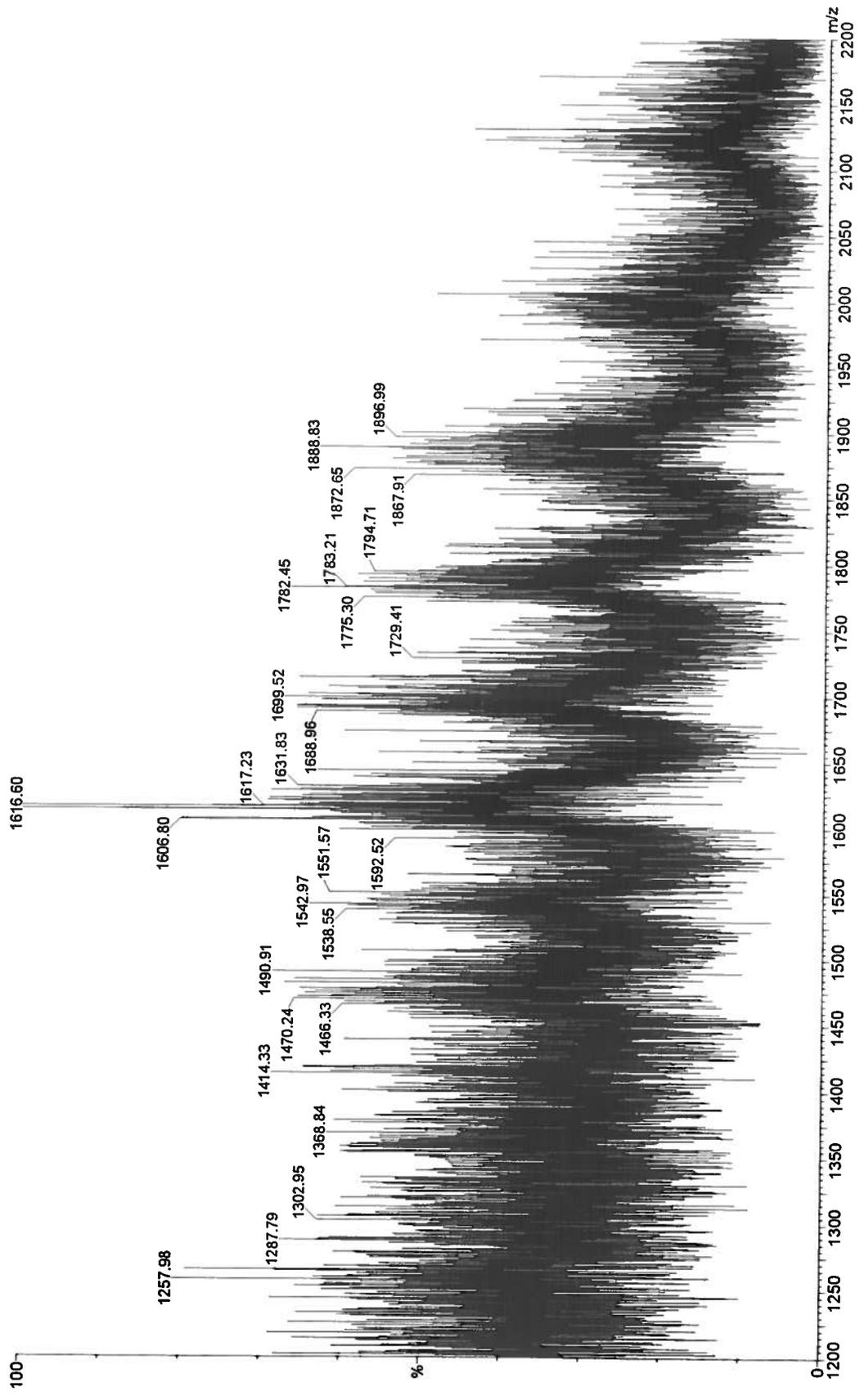
ANNEXE X : Spectre de masse des valeurs de m/z de l'AbfB₂. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,17 kV est attribué au capillaire, un voltage de 47 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.



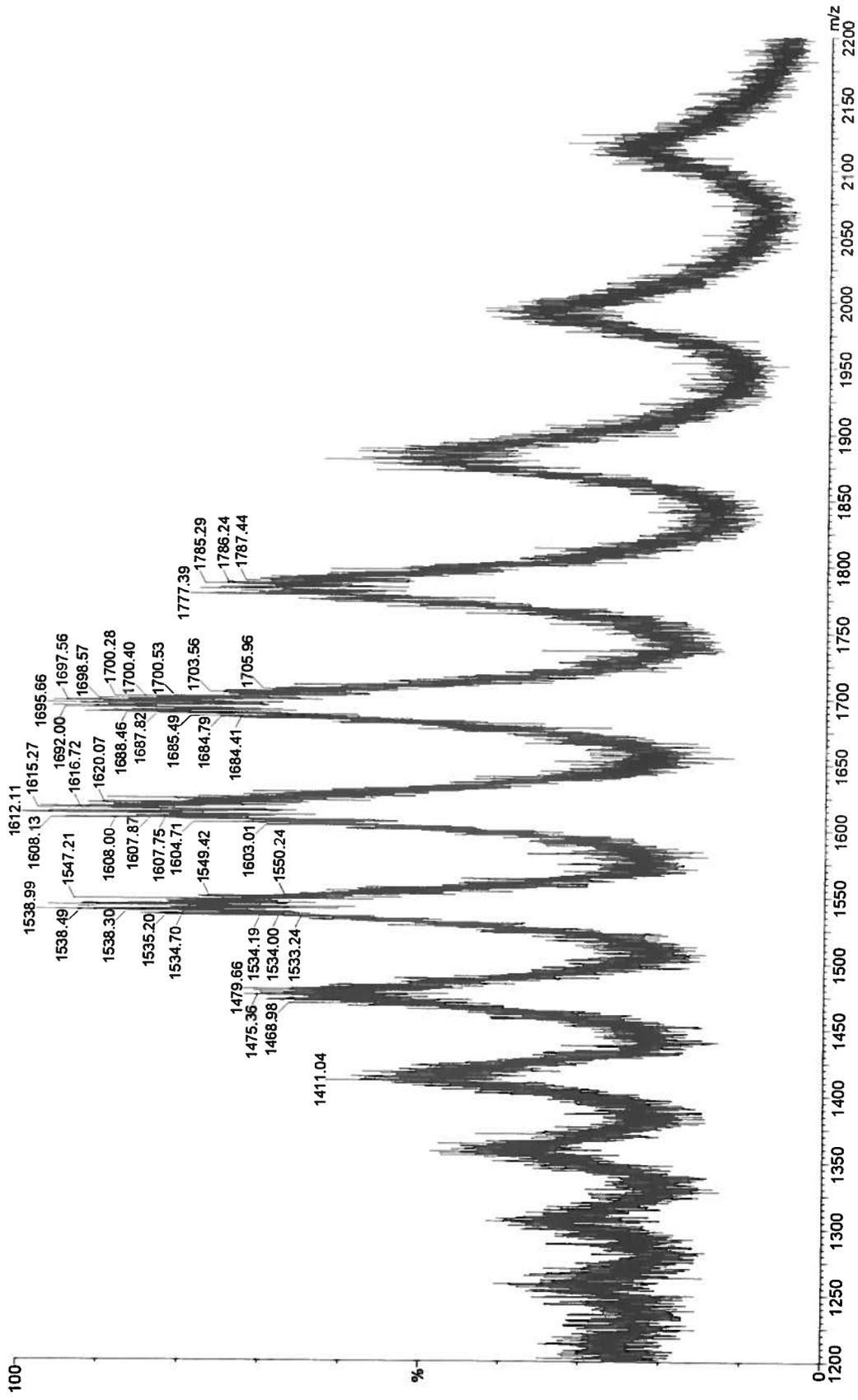
ANNEXE XI : Spectre de masse des valeurs de m/z de l'AbfB₂ ayant subi une inactivation par le carbodiimide EDC. L'analyse a été effectuée en mode *nanospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 1,29 kV est attribué au capillaire, un voltage de 41 V au cône, une température de 100°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.



ANNEXE XII : Spectre de masse des valeurs de m/z de l'AbfB₂ ayant subi une amidation des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,0 kV est attribué au capillaire, un voltage de 40 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.

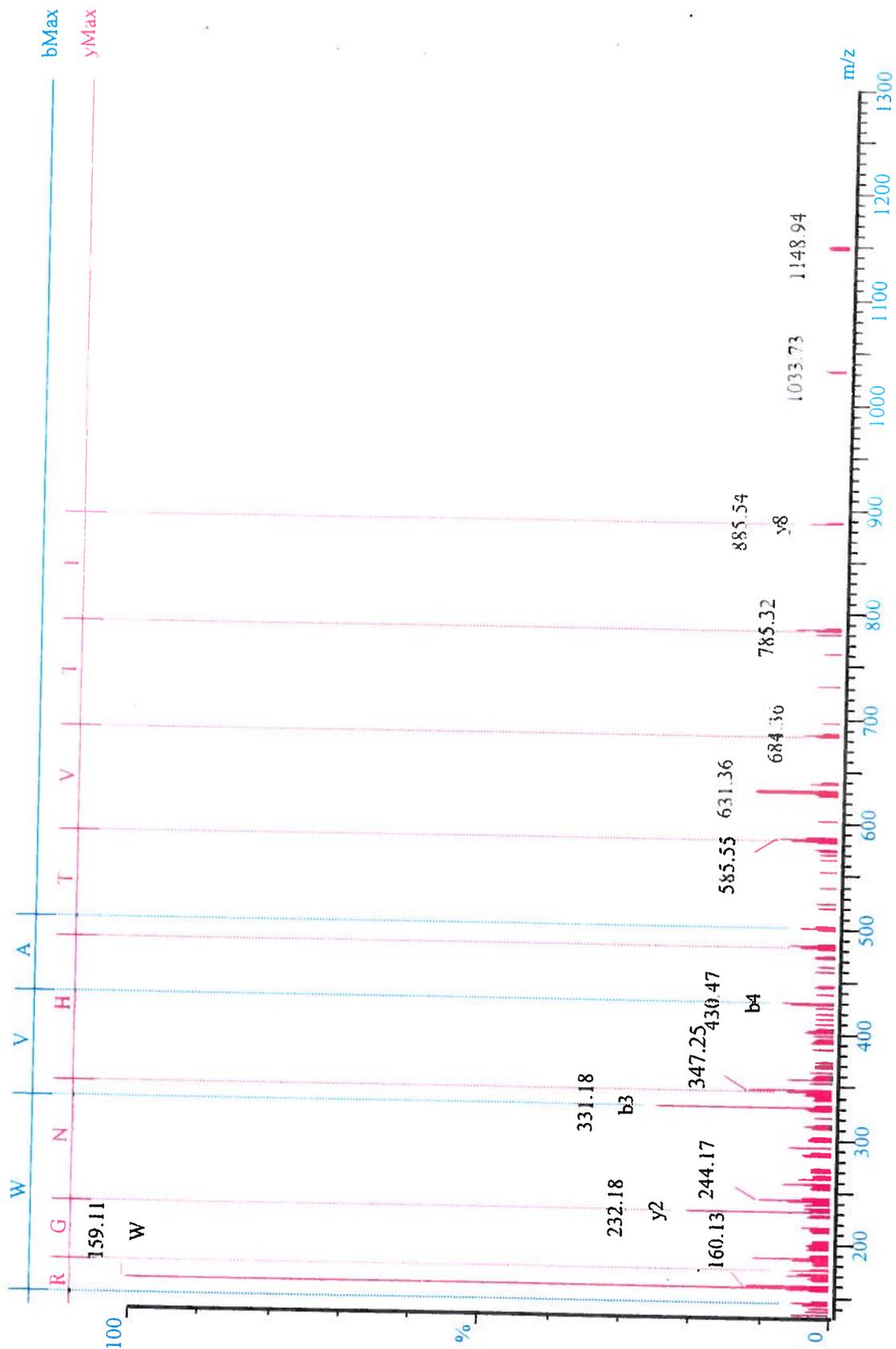


ANNEXE XIII : Spectre de masse des valeurs de m/z de l'AbfB₂ protégée par un oligosaccharide ayant subi une amidation des résidus carboxyliques suite à une inactivation par le carbodiimide EDC. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,0 kV est attribué au capillaire, un voltage de 40 V au cône, une température de 80°C au bloc source et une température de 150°C est attribuée à l'azote pour la désolvatation.

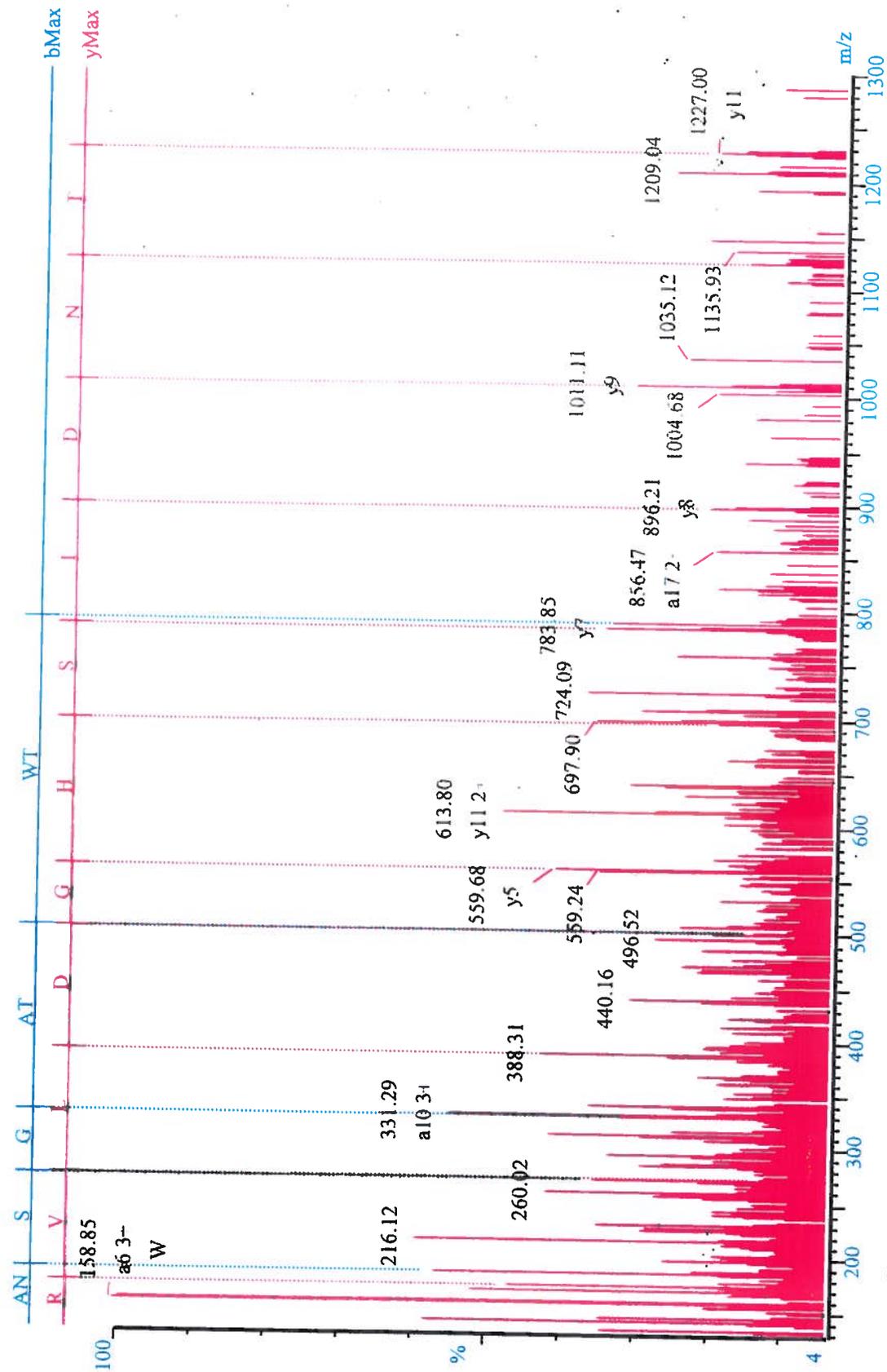


ANNEXE XIV : Spectres de masse des valeurs de m/z suite à la fragmentation des ions peptidiques générés lors de la digestion de l'AbfB₂ par la trypsine. L'analyse a été effectuée en mode *nanospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 0,82 kV est attribué au capillaire, un voltage de 20 V au cône, une température de 80°C au bloc source, une température de 200°C est attribuée à l'azote pour la désolvation et une énergie de 34,5 V à la cellule de collision. Les acides aminés indiqués en rouge et bleu proviennent d'une fragmentation de type y et b respectivement.

**Annexe XIV-1: Fragmentation de l'ion ayant comme valeur de m/z 631,36 représentant le peptide
SGWVALKDFTTITVTHNGR**

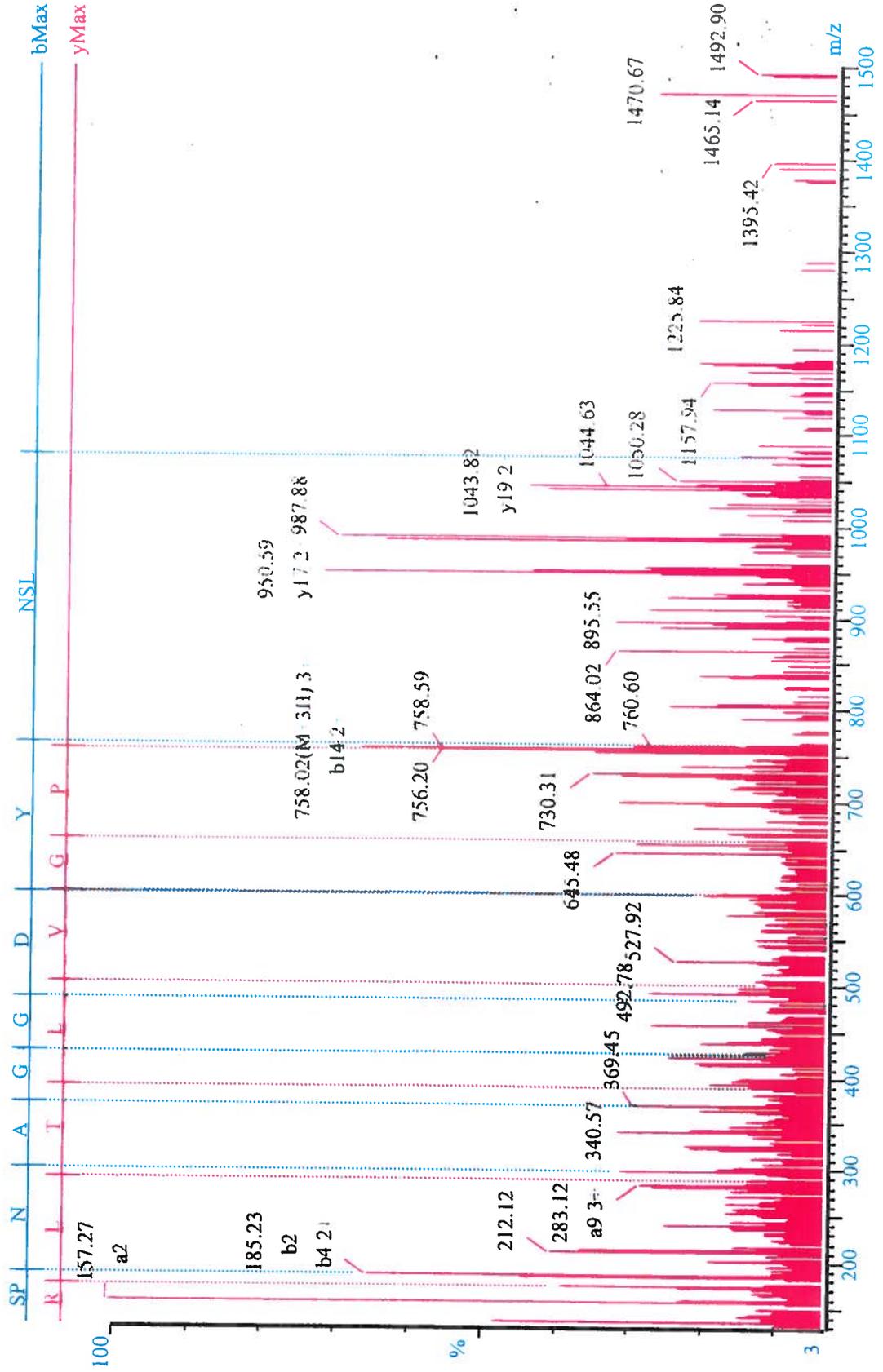


Annexe XIV-2: Fragmentation de l'ion ayant comme valeur de m/z 638,64 représentant le peptide ANSGATWTNDISHGDLVR



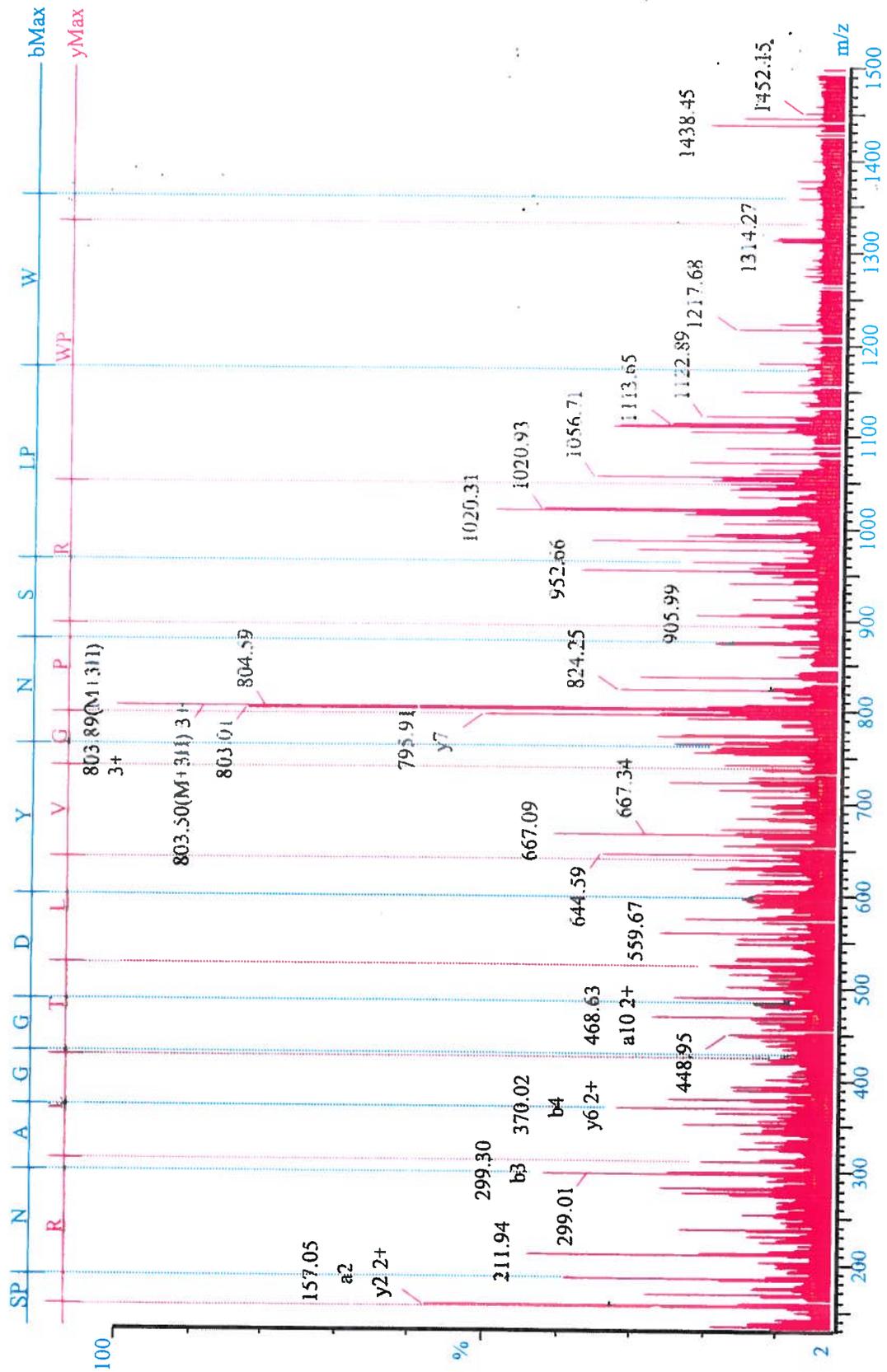
Annexe XIV-3: Fragmentation de l'ion ayant comme valeur de m/z 757,39 représentant le peptide

SPNAGGDYNSLPWRPGVLTLR



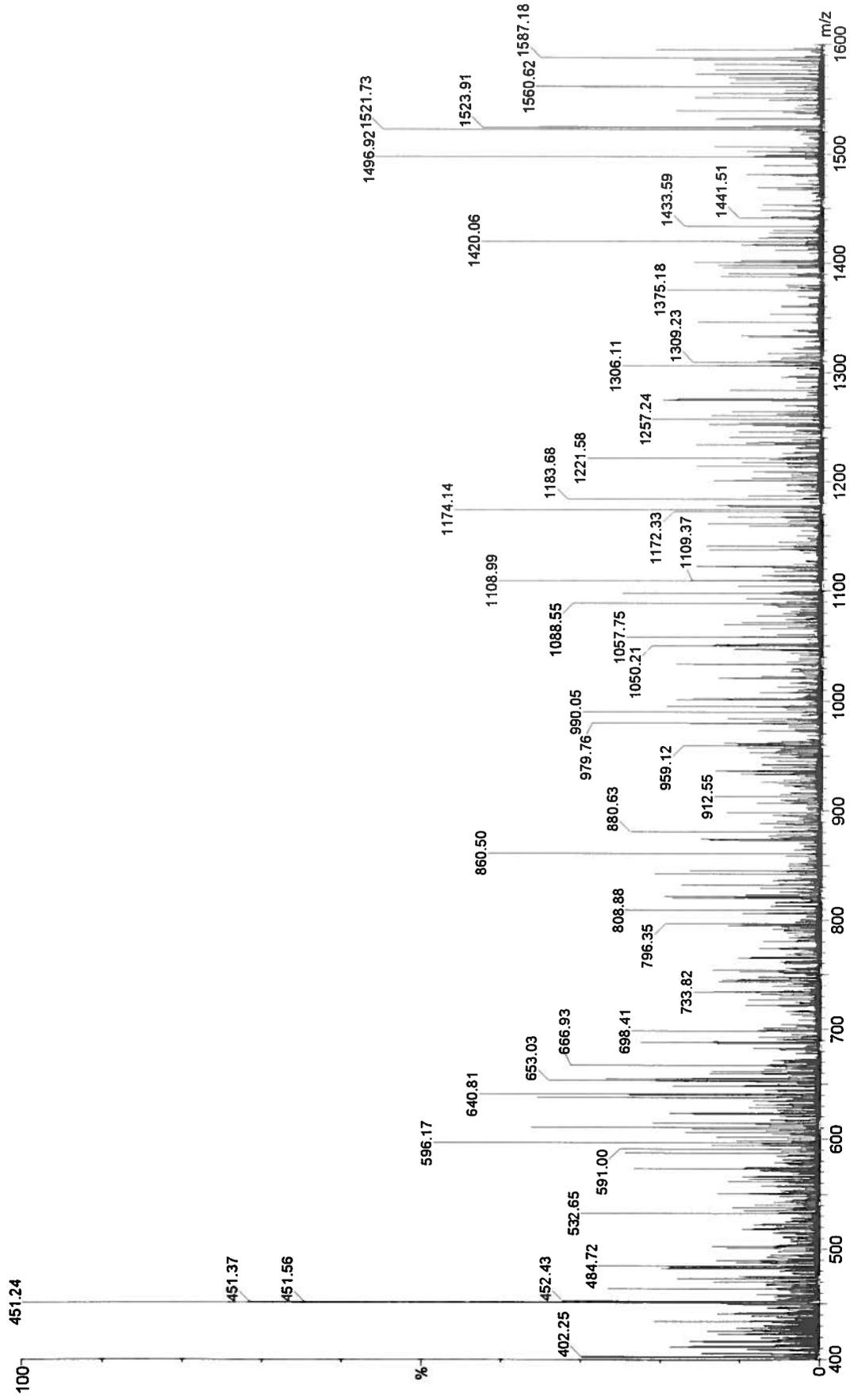
Annexe XIV-4: Fragmentation de l'ion ayant comme valeur de m/z 803,08 représentant le peptide

SPNAGGDYNSLPWRPGVLTLRH



ANNEXE XV : Spectres de masse des valeurs de m/z suite à la chromatographie en phase liquide des ions peptidiques générés lors de la digestion de l'AbfB₂ par la trypsine. L'analyse a été effectuée en mode *electrospray* à l'aide d'un spectromètre de masse de marque Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,5 kV est attribué au capillaire, un voltage de 31 V au cône, une température de 100°C au bloc source et une température de 180°C est attribuée à l'azote pour la désolvation.

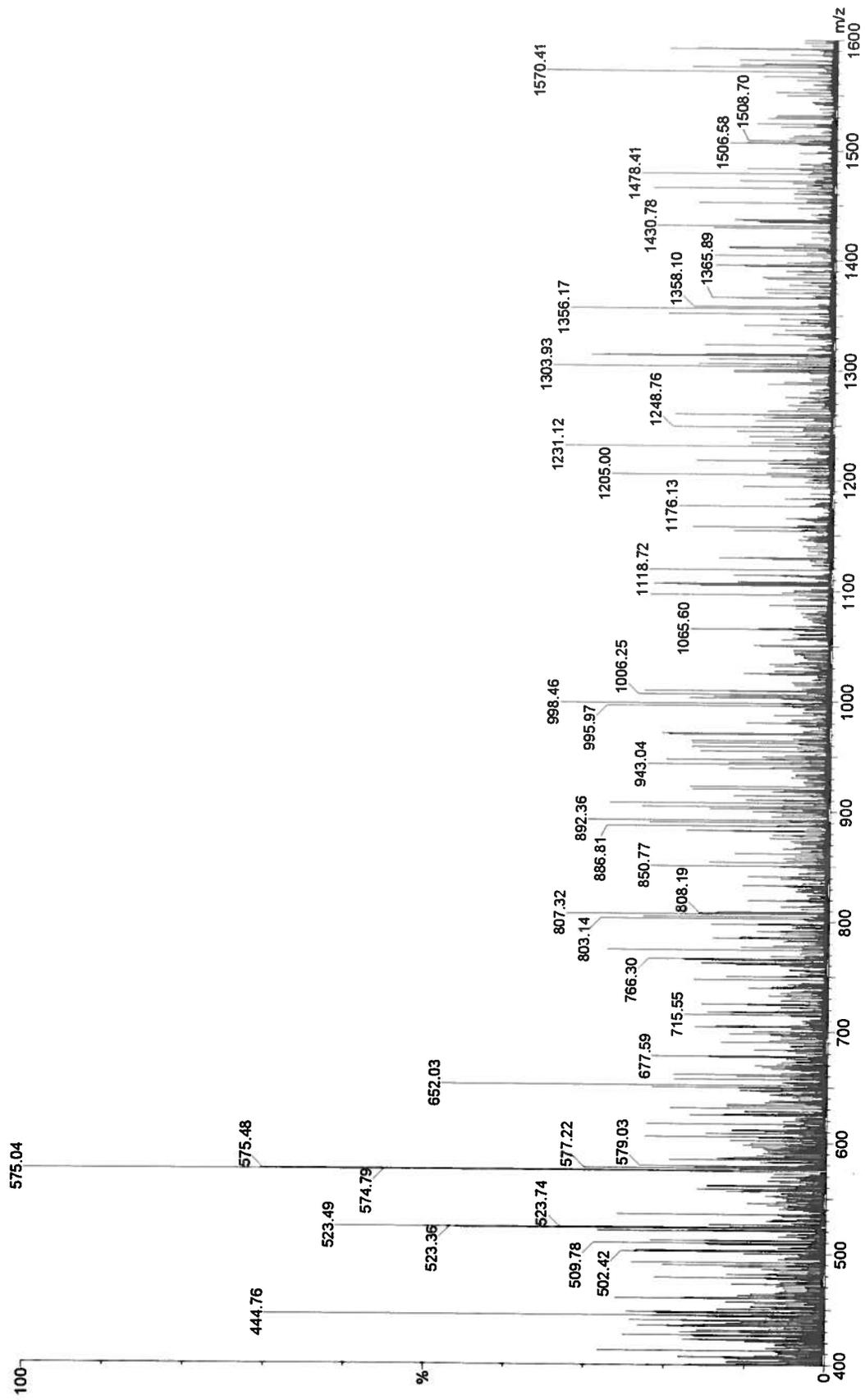
Annexe XV-1 : Ion ayant comme valeur de m/z 451,24 représentant le peptide IYR. Ce dernier est représenté par le no. 1
dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



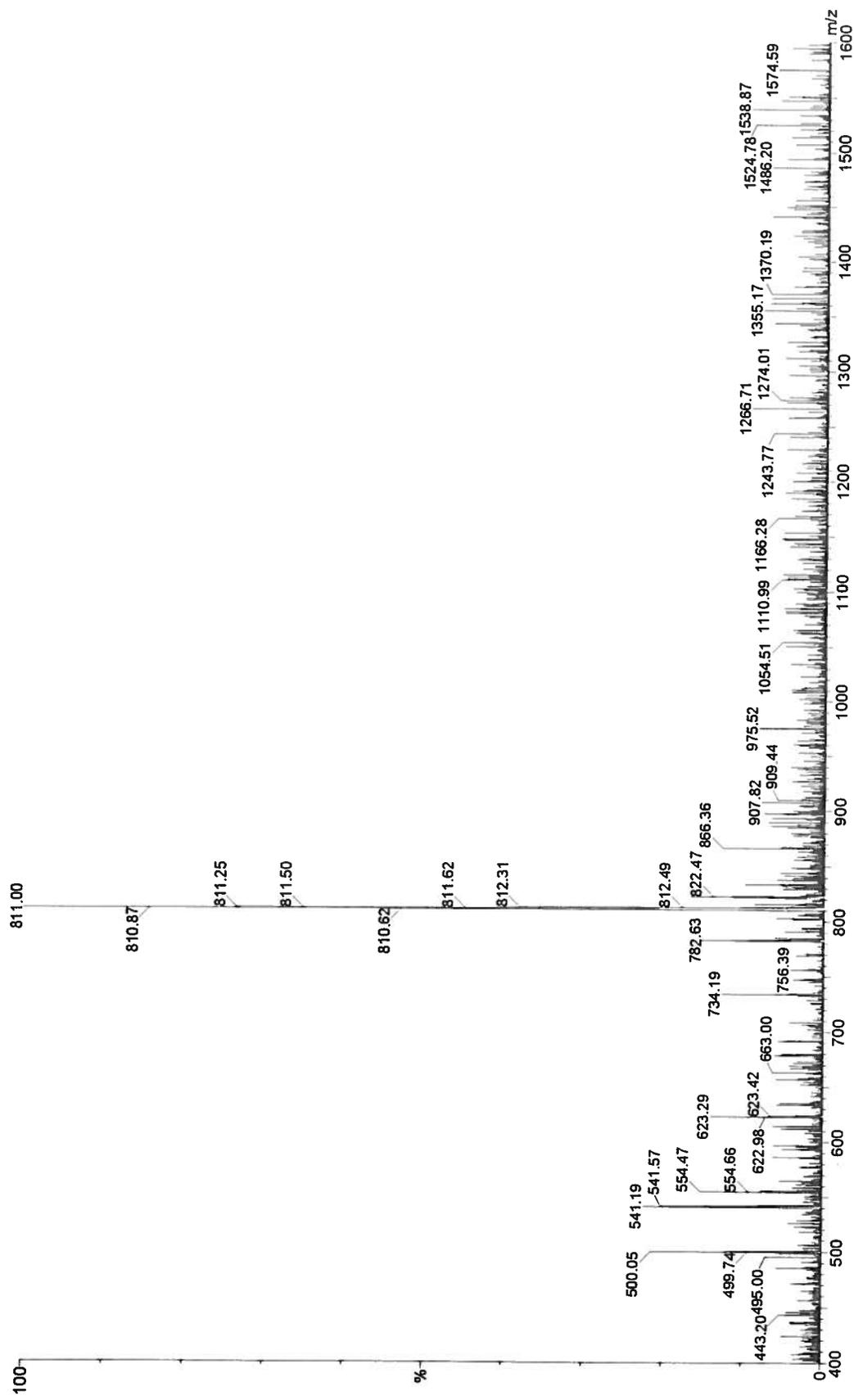
Annexe XV-2 : Ion ayant comme valeur de m/z 485,09 représentant le peptide YFR. Ce dernier est représenté par le no. 2 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



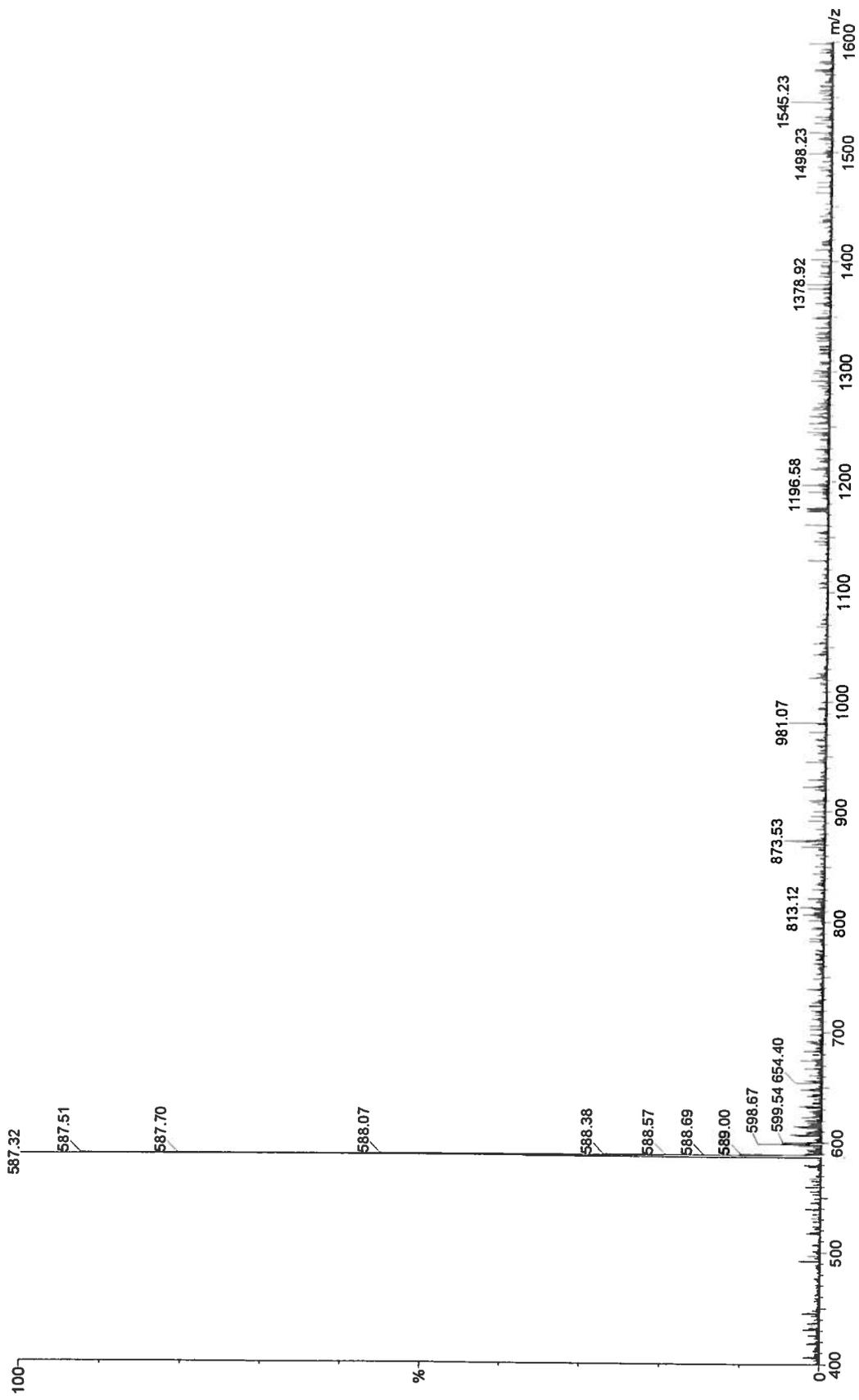
Annexe XV-3 : Ion ayant comme valeur de m/z 575,04 représentant le peptide DFTTVTHNGR. Ce dernier est représenté par le no. 3 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



Annexe XV-4 : Ion ayant comme valeur de m/z 811,00 représentant le peptide GAHDDGTBALPSTYR. Ce dernier est représenté par le no. 6 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.

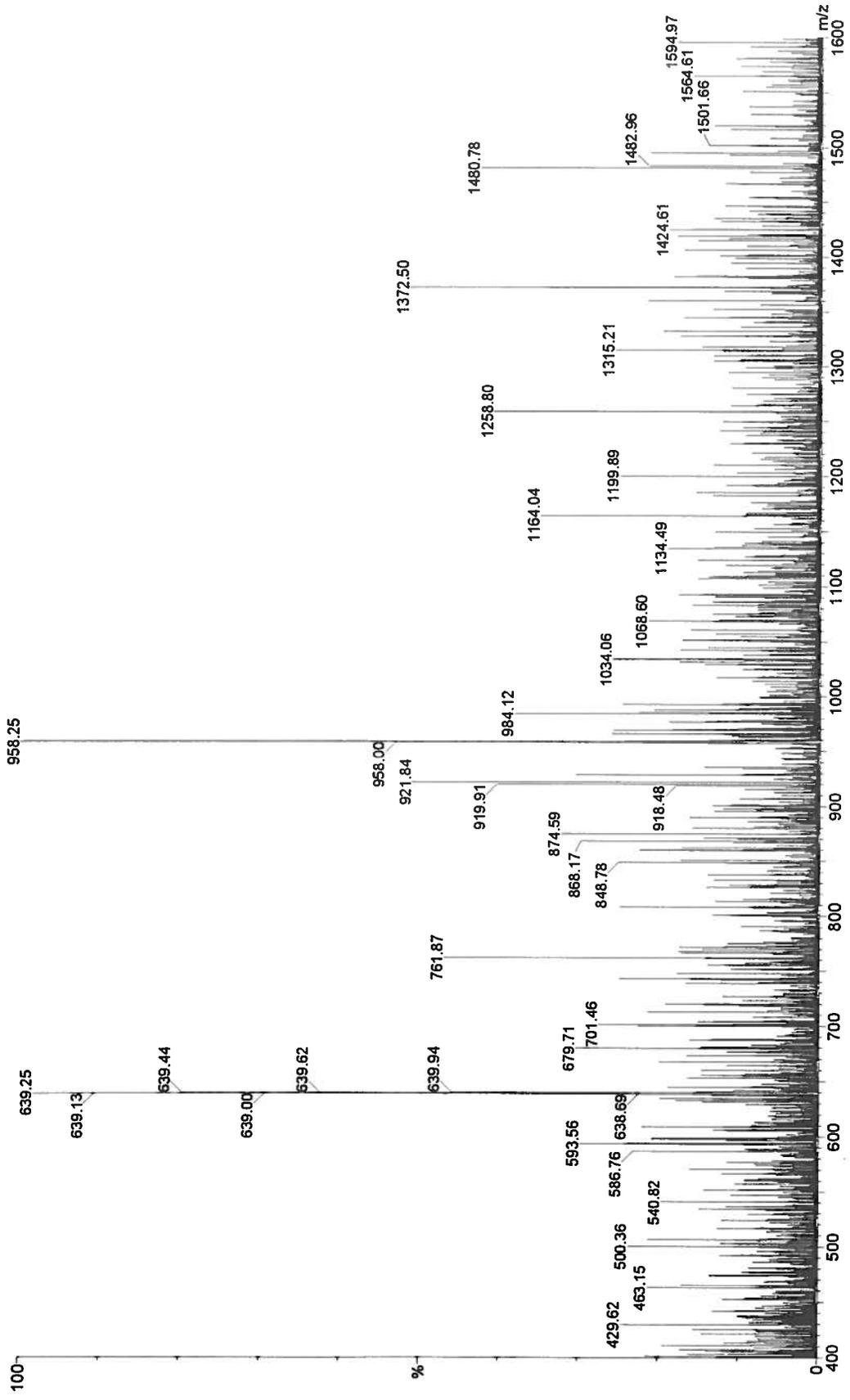


Annexe XV-5 : Ion ayant comme valeur de m/z 587,02 représentant le peptide WSSTGVLAQPK. Ce dernier est représenté par le no. 4 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



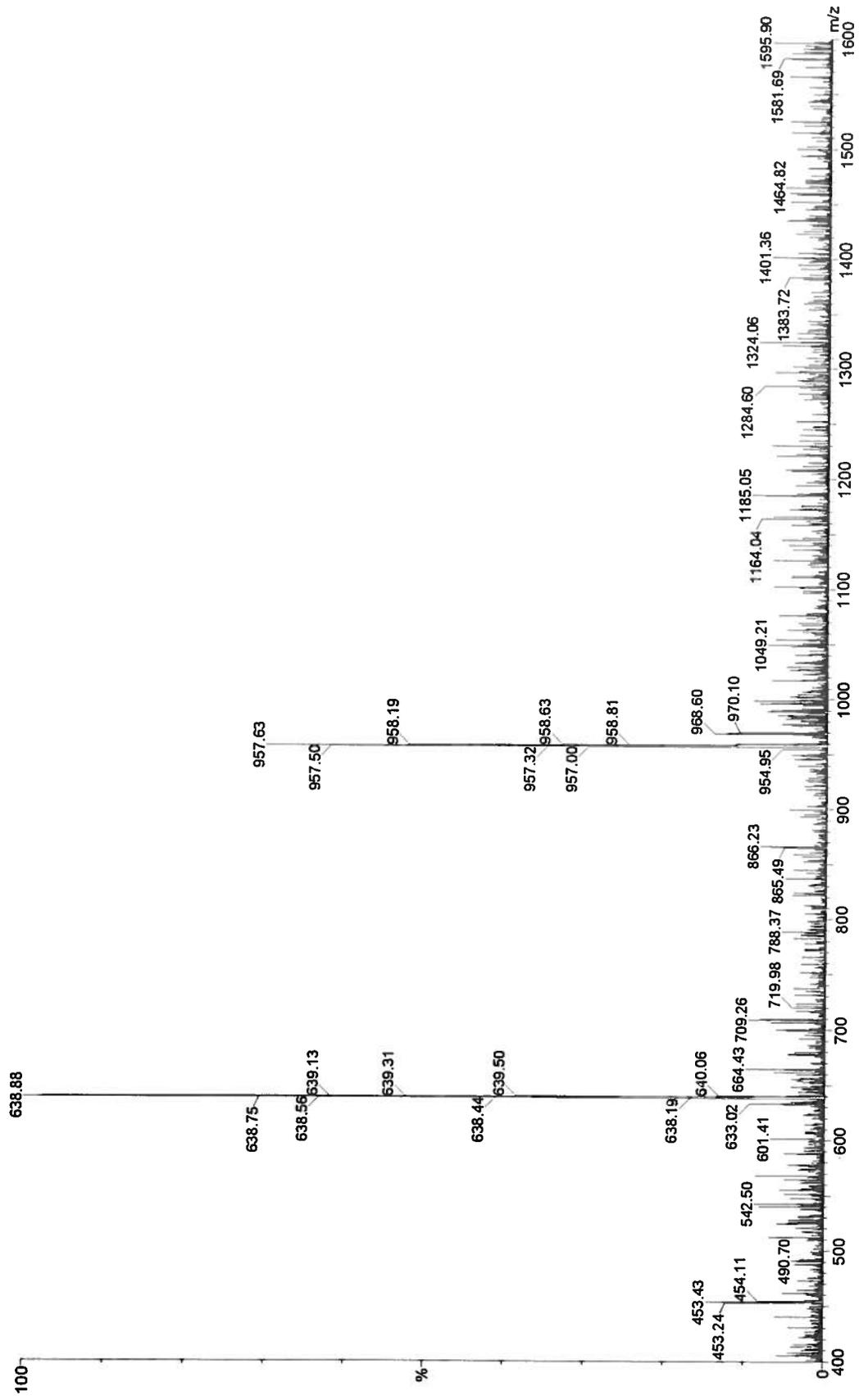
Annexe XV-6 : Ions ayant comme valeur de m/z 639,25 et 958,25 représentant le peptide WSSTGVLAQPKSGWVALK.

Ce dernier est représenté par le no. 9 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.

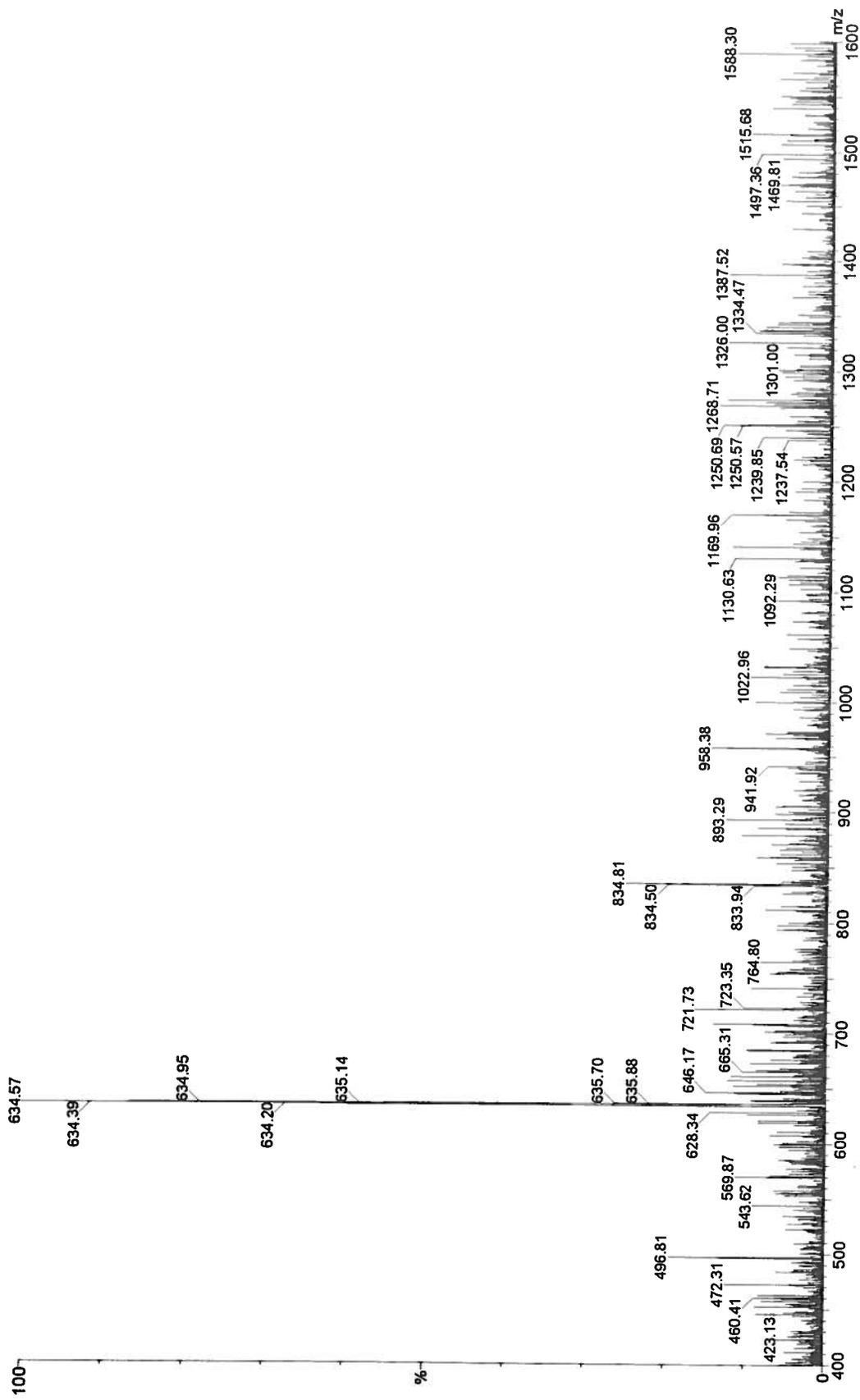


Annexe XV-7 : Ions ayant comme valeur de m/z 638,88 et 957,63 représentant le peptide ANSGATWTNDISHGDLVR.

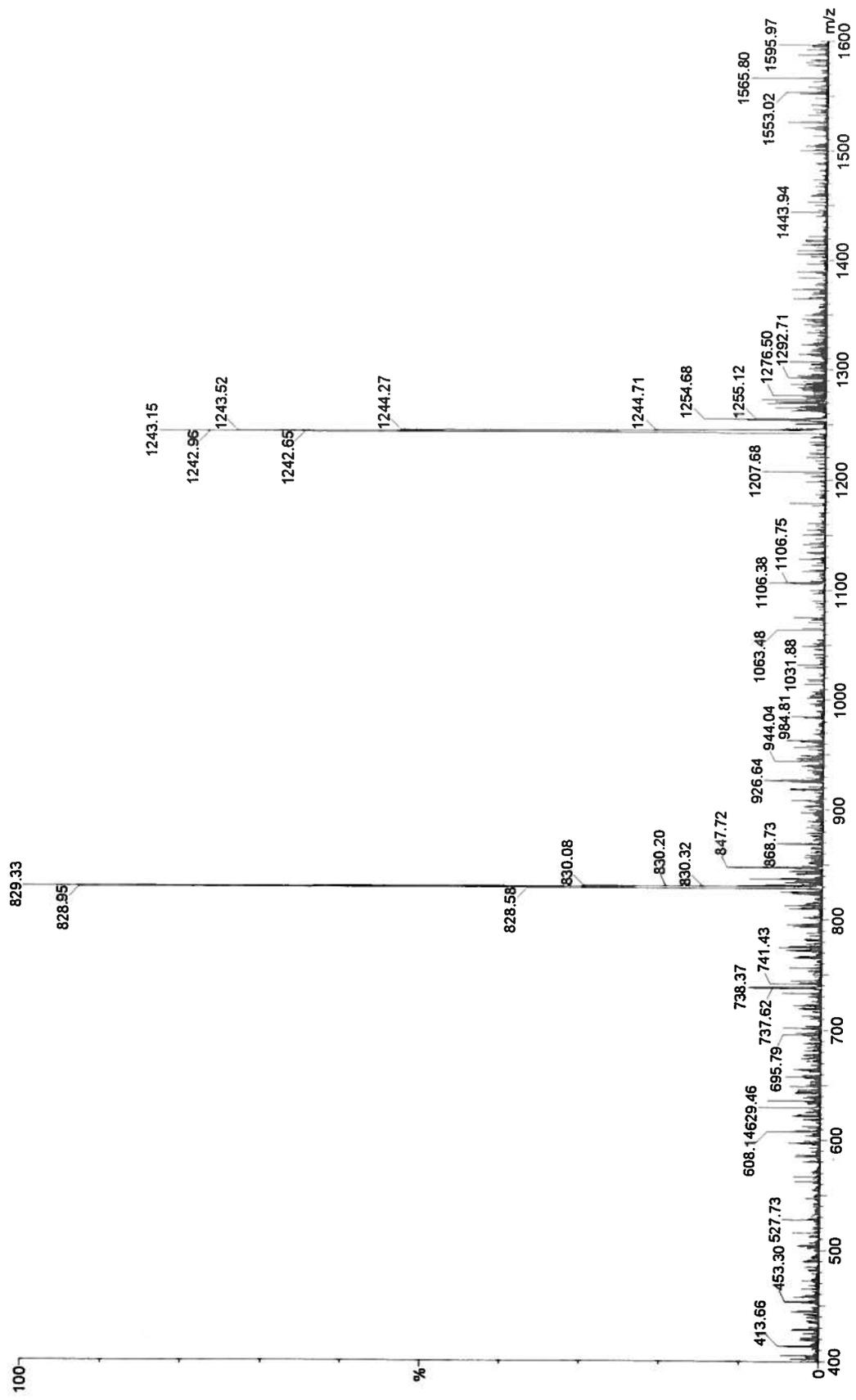
Ce dernier est représenté par le no. 8 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



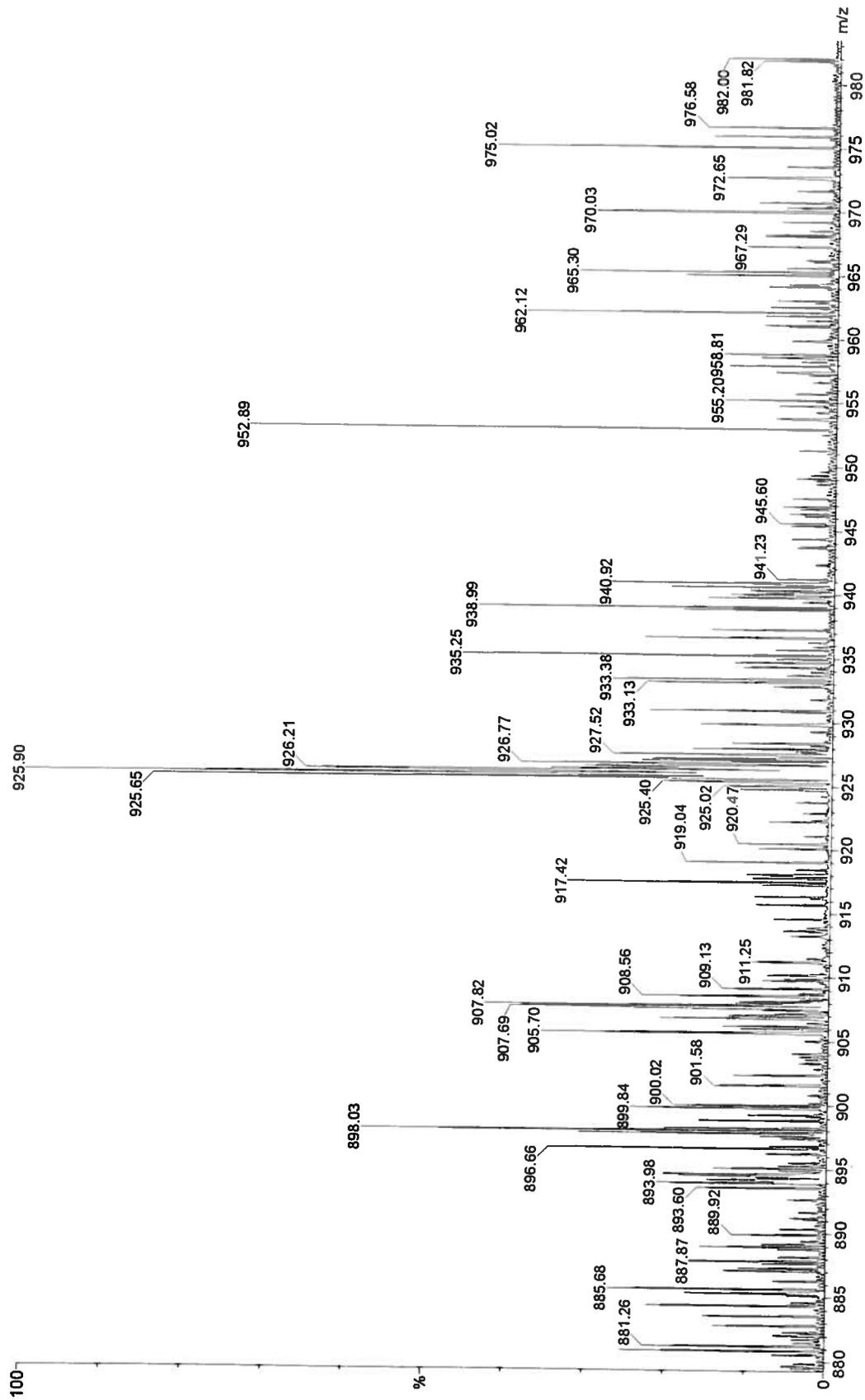
Annexe XV-8 : Ion ayant comme valeur de m/z 634,57 représentant le peptide ANLFEGVQVYK. Ce dernier est représenté par le no. 5 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



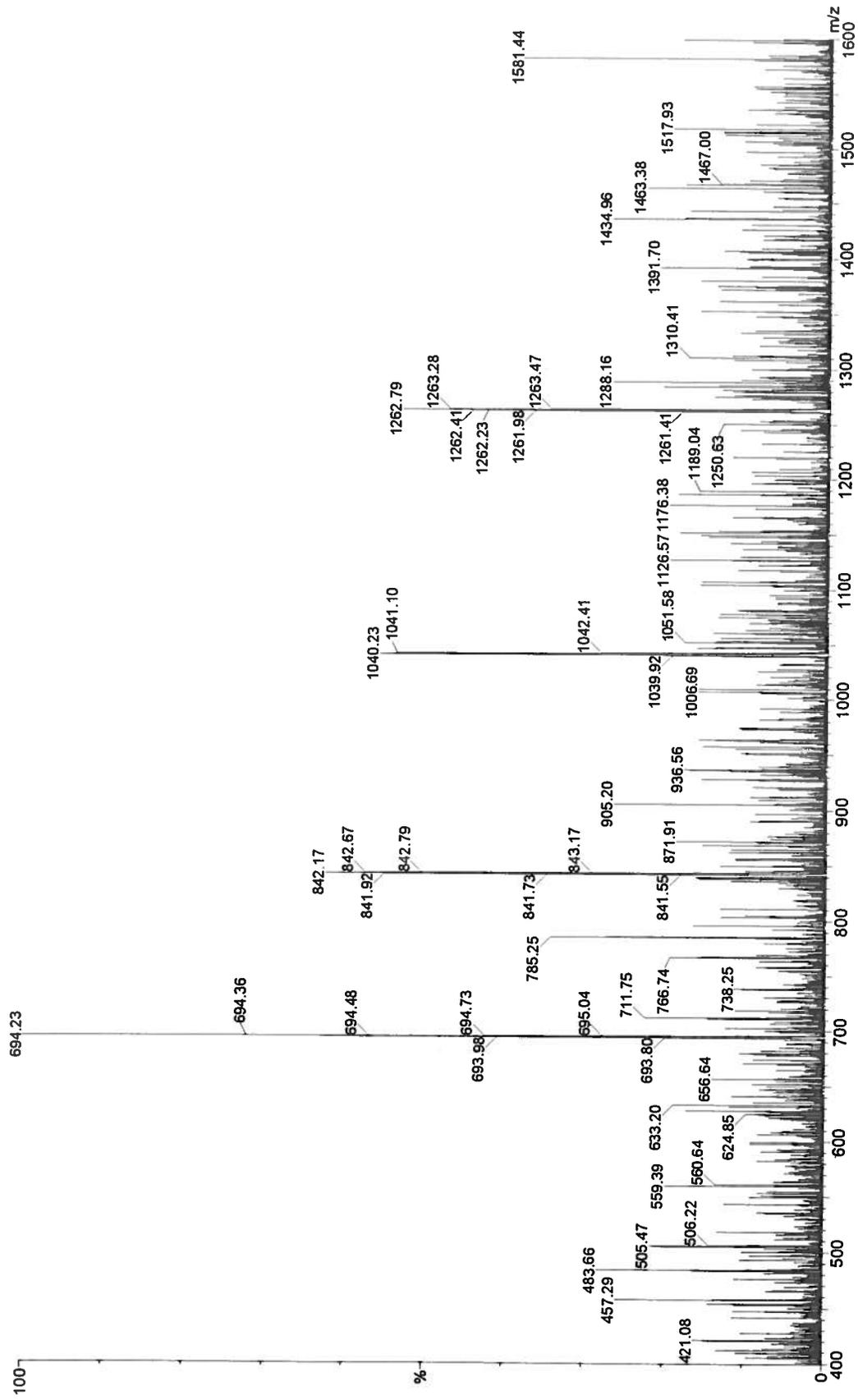
Annexe XV-9: Ions ayant comme valeur de m/z 829,33 et 1243,15 représentant le peptide SFTASSLSGSWTPQAASEGNPFAGK. Ce dernier est représenté par le no. 13 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



Annexe XV-10 : Ion ayant comme valeur de m/z 925,90 représentant le peptide GAHDDGTBALPSTYRWSSTGVLAQPK. Ce dernier est représenté par le no. 15 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.

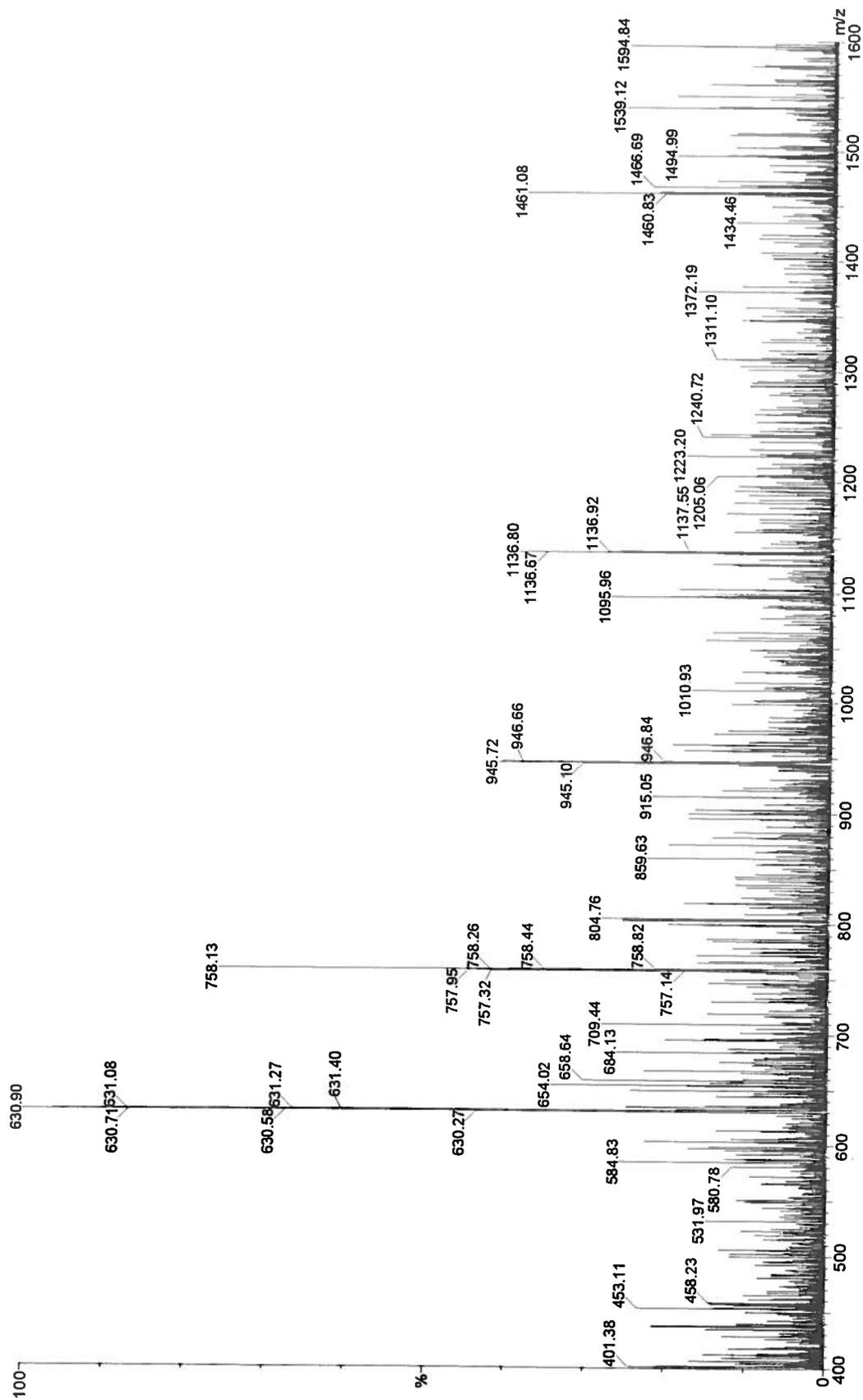


Annexe XV-11 : Ions ayant comme valeur de m/z 694,23, 1040,23, 842,17 et 1262,79 représentant les peptides VQQNQYLMIVEAMGANGR et ASMPIGNFPGNFGSSYTTIMSDTK. Ces derniers sont représentés par les nos. 10 et 14 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



Annexe XV-12 : Ions ayant comme valeur de m/z 630,90, 945,72, 758,13 et 1136,80 représentant les peptides

SGWVALKDFTTTHNGR et SPNAGGDYNSLPWRPGVLTLR. Ces derniers sont représentés par les nos. 7 et 11 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.



Annexe XV-13: Ions ayant comme valeur de m/z 803,95 et 1461,02 représentant les peptides SPNAGGDYNSLPWPGVLTLRH et ANSGATWTNDISHGDLVRDNPDQMTMTVDPBNI

QFLYQQGK. Ces derniers sont représentés par les nos. 12 et 16 dans les deux chromatogrammes de la figure 30.

