

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation d'une nouvelle activité glycosidique de  
l'acétyl-xylane estérase A de *Streptomyces lividans*.**

Par  
Guillaume Brault

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

Jury d'évaluation :

Président du jury et examineur interne	François Shareck, INRS-Institut Armand- Frappier
Examineur externe	Ryszard Brzezinski, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke
Examineur interne	François Shareck, INRS-Institut Armand- Frappier
Directeur de recherche	Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier



## Résumé

L'acétyl-xylane estérase A de *Streptomyces lividans* (AxeA) est une enzyme qui hydrolyse les liens esters du xylane acétylé, le principal composant des hémicelluloses de bois durs. L'AxeA est une enzyme versatile et plusieurs études ont démontré sa capacité à déacétyler d'autres substrats tels que la cellulose acétate ainsi que des substrats chitineux solubles. Elle est capable de produire des chitosanes, la version déacétylée de la chitine. Les chitosanes ont un fort potentiel d'application dans une multitude de domaines, mais leurs propriétés dépendent directement de leur degré d'acétylation et de leur degré de polymérisation. Or, les techniques actuelles de production industrielle ne permettent de contrôler ni l'une, ni l'autre de ces caractéristiques. Cette enzyme offre donc un fort potentiel d'utilisation comme biocatalyseur pour produire des chitosanes. Néanmoins, la spécificité de l'AxeA envers la chitine n'est pas assez élevée pour envisager des applications industrielles.

L'objectif principal de cette étude était donc d'augmenter la spécificité de l'enzyme envers les oligomères de chitine. À partir d'études comparatives des structures tridimensionnelles d'estérases de la même famille, une région du site catalytique ayant un fort potentiel pour l'affinité de l'enzyme envers divers substrats a été identifiée pour un criblage fonctionnel par mutation. Les clones produits ont ensuite été purifiés et analysés par HPLC pour déterminer leur pouvoir de déacétylation envers divers oligomères de chitine.

Les essais préliminaires ont prouvé que l'AxeA possédait non seulement la capacité à déacétyler, mais qu'elle pouvait aussi hydrolyser les oligomères de chitine. Dès lors, l'objectif principal de cette étude a été de caractériser plus en profondeur cette activité inusitée en analysant la spécificité des clones produits, mais aussi celle de mutants provenant d'études antérieures. Les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible d'augmenter l'activité de déacétylation de l'AxeA par de simples mutations de certains résidus clés et que l'activité glycosidique observée est bel et bien une activité chitinolytique. L'étude de mutants n'a pas permis d'identifier concrètement les résidus catalytiques impliqués, néanmoins, certains clones ont présenté une forte

augmentation de l'activité glycosidique. Outre le fait d'être le premier rapport, selon notre connaissance, d'une carbohydrolase possédant une activité glycosidique, ces résultats prouvent que l'AxeA a un fort potentiel d'application pour la production spécifique d'oligomères de chitosan.

---

Directeur de recherche

---

Étudiant

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Claude Dupont, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour l'encadrement et pour l'aide financière apportée. Je désire également à remercier François Shareck pour ses conseils, ainsi que Roger Dubuc et Raymonde Jetté pour leur support au quotidien. Enfin, j'aimerais remercier le Fond Québécois sur la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) pour le soutien financier.

Merci à toi, Catherine, pour ta patience et ta compréhension, pour ton écoute et ton indéfectible support dans mes nombreux projets sans fin.

## Table des matières

Résumé .....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	x
Introduction.....	12
1. Revue bibliographique.....	14
1.1 La chitine et le chitosane.....	15
1.1.1 Description et propriétés physico-chimiques .....	15
1.1.2 Intérêts et applications .....	18
1.1.3 Méthodes de production.....	20
1.2 La famille 4 des carbohydrates estérases .....	21
1.2.1 Description .....	21
1.2.2 Structures tridimensionnelles .....	23
1.3 L'acétyl-xylane estérase A de <i>S. lividans</i> .....	29
1.3.1 Caractéristiques et fonctions.....	29
1.3.2 Spécificité de l'AxeA.....	30
1.3.3 Structure tridimensionnelle du domaine catalytique et mécanisme d'action .....	31
1.4 Les enzymes chitinolytiques .....	33
1.4.1 Description et fonctions .....	33
1.4.2 Les chitinases- description et fonctions .....	36
1.4.2.1 La famille GH-18 .....	36
1.4.2.2 La famille GH-19.....	39
1.4.3 Les chitosanases.....	40
1.4.4 Les lysozymes.....	43

2. Manuscrit scientifique .....	46
2.1 Manuscrit scientifique.....	47
2.1.1 Implication de l'étudiant .....	47
2.1.2 Attestation des co-auteurs.....	47
2.1.3 Notes sur la présentation du manuscrit .....	49
2.1.4 Résumé en français .....	50
2.1.5 Title page .....	51
2.1.6 Abstract .....	52
2.1.7 Introduction .....	53
2.1.8 Results .....	56
2.1.9 Discussion.....	64
2.1.10 Conclusion .....	67
2.1.11 Materials and methods.....	68
2.1.12 Acknowledgments.....	72
3. Méthodologie et résultats supplémentaires .....	73
3.1 Méthodologie supplémentaire .....	74
3.1.1 Manipulations génétiques du gène de l' <i>axeA<sub>tr</sub></i> .....	74
3.1.2 Caractérisation de l'activité de déacétylation de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> et des enzymes mutées .....	75
3.1.3 Analyse du degré d'acétylation des produits réactionnels .....	75
3.1.4 Tests d'inhibition à l'allosamidine.....	76
3.1.5 Alignements de séquences protéiques.....	76
3.2 Résultats supplémentaires .....	77
3.2.1 Analyse de l'activité de déacétylation d'oligomères de chitine .....	77
3.2.2 Activité de déacétylation de mutants rationnels du gène de l' <i>axeA<sub>tr</sub></i> .....	79
3.2.3 Alignement de séquences de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> avec des CDA de la famille des CE-4 .....	83
3.2.4 Analyse du degré d'acétylation des produits réactionnels .....	86
3.2.5 Analyse de l'activité enzymatique durant la phase initiale de la réaction.....	87
3.2.6 Les tests d'inhibition par l'allosamidine .....	89

3.2.7 L'analyse de mutants de l' <i>axeA<sub>tr</sub></i> provenant d'études antérieures.....	92
3.2.8 Alignement de séquences protéiques de GH avec l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	93
3.2.9 Modélisation de positionnement de substrat .....	98
4. Discussion.....	100
4.1 Activité de déacétylation de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	101
4.1.1 Déacétylation de chitooligosaccharides par l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	101
4.1.2 Activité de déacétylation de mutants rationnels de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	103
4.2 Activité glycosidique de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	106
4.2.1 Activité glycosidique de l'enzyme sauvage et de l'enzyme <i>AxeA<sub>tr</sub>-D130A</i> durant la phase initiale de la réaction .....	107
4.2.2 Activité glycosidique d'enzymes mutées de l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	109
4.3 L'identification de résidus catalytiques potentiels .....	111
4.3.1 Alignements de séquences partielles de GH avec l' <i>AxeA<sub>tr</sub></i> .....	111
4.3.2 Modélisation du positionnement du chitotriose.....	113
5. Conclusion .....	115
5. Conclusion .....	116
Annexe A: Communications publiques.....	119
Publications :.....	119
Manuscrit soumis au journal Protein Science- avril 2009:.....	119
Preuve de réception du manuscrit: .....	119
Avis de décision de l'éditeur:.....	120
Communications par affiche:.....	121
Participation au 5 <sup>e</sup> WCIBB- avril 2008:.....	121
Annexe B: Liste des amorces employés pour la mutagenèse dirigée .....	122
Références.....	124

## Liste des figures

Figure 1. Structure de la chitine et du chitosane. ....	16
Figure 2. Structure cristalline de la chitine $\alpha$ et de la chitine $\beta$ . ....	17
Figure 3. Structures tridimensionnelles en ruban et représentations topographiques de CE-4. ....	24
Figure 4. Topologie de surface de CE-4 et mécanisme de coordination des cofacteurs métalliques. ....	26
Figure 5. Alignement de séquences de CE-4 représentatives de la famille montrant les motifs conservés. ....	28
Figure 6. Mécanisme enzymatique des hydrolases zinc-dépendantes. ....	29
Figure 7. Schéma de la réaction de déacétylation effectuée par les acétyl-xylane estérases. ....	30
Figure 8. Superposition de la structure tridimensionnelle de l'AxeA <sub>tr</sub> avec celles d'autres CE-4. ....	33
Figure 9. Homologie de structure entre des enzymes chitinolytiques de différentes familles. ....	35
Figure 10. Inhibiteur et mécanisme d'hydrolyse des GH-18. ....	38
Figure 11. Mécanisme d'hydrolyse par simple inversion des GH-19. ....	40
Figure 12. Mécanisme d'hydrolyse du lysozyme de blanc d'œuf de volaille (HEWL). ....	45
Figure 13. Purity of <i>S. lividans</i> AxeA <sub>tr</sub> and the AxeA <sub>tr</sub> -D130A mutated enzyme. ....	57
Figure 14. HPLC analysis of the deacetylation and hydrolysis products of (GlcNAc) <sub>6</sub> by the AxeA <sub>tr</sub> . ....	58
Figure 15. Time-course hydrolysis of various chitin oligomers by the AxeA <sub>tr</sub> and the AxeA <sub>tr</sub> -D130A. ....	60
Figure 16. Time-course analysis of anomeric species of chitinase activity of AxeA <sub>tr</sub> -D130A. with chitohexaose. ....	64
Figure 17. Rendements de déacétylation de l'AxeA <sub>tr</sub> envers divers chitooligosaccharides en fonction du temps. ....	78
Figure 18. Superposition de la structure tridimensionnelle de l'AxeA <sub>tr</sub> avec certaines CE-4 de spécificités différentes. ....	80

Figure 19. Représentation tridimensionnelle de la région ciblée pour la mutagenèse par rapport à la structure de l'AxeA <sub>tr</sub> .	81
Figure 20. Alignement de séquences protéiques partielles de CDA de la famille des CE-4 avec la région mutée de l'AxeA <sub>tr</sub> .	85
Figure 21. Analyse HPLC-MS/MS des produits d'hydrolyse du (GlcNAc) <sub>6</sub> par l'AxeA <sub>tr</sub> en fonction du temps.	87
Figure 22. Produits libérés du (GlcNAc) <sub>6</sub> en fonction du temps par l'AxeA <sub>tr</sub> et l'enzyme mutée AxeA <sub>tr</sub> -D130A sur une période de 24 h d'incubation.	89
Figure 23. Hydrolyse du (GlcNAc) <sub>6</sub> sur période d'incubation de 24 h par l'enzyme sauvage et l'enzyme mutée.	91
Figure 24. Alignement de séquences protéiques partielles de chitinases de la famille GH-18 de streptomycètes avec l'AxeA <sub>tr</sub> .	95
Figure 25. Alignement de séquences protéiques partielles de chitinases de la famille GH-19 de streptomycètes avec l'AxeA <sub>tr</sub> .	96
Figure 26. Alignement de séquences protéiques partielles de chitosanases de la famille GH-46 de streptomycètes avec l'AxeA <sub>tr</sub> .	97
Figure 27. Positionnement du chitotriose au sein du site catalytique de l'AxeA <sub>tr</sub> .	99

## Liste des tableaux

Tableau 1. Applications de la chitine et du chitosane. ....	19
Tableau 2. Liste des CE-4 dont les structures tridimensionnelles ont été résolues.....	23
Table 3. $AxeA_{tr}$ specific activities toward chitooligosaccharides.....	61
Table 4. Specific activities of the $AxeA_{tr}$ and the mutated $AxeA_{tr}$ -D130A in presence or absence of metal cofactor. ....	62
Table 5. Specific activities of the $AxeA_{tr}$ and the $AxeA_{tr}$ -D130A mutant toward various polymeric substrates.....	63
Tableau 6. Activités spécifiques de l' $AxeA_{tr}$ envers différents chitooligosaccharides.....	79
Tableau 7. Rendements relatifs de déacétylation du chitohexaose par des mutants rationnels de l' $AxeA_{tr}$ par rapport à l'enzyme sauvage.....	83
Tableau 8. Activités estérases et glycosidiques spécifiques <sup>a</sup> de l' $AxeA_{tr}$ et d'enzymes mutées envers le chitohexaose.....	92

## Liste des abréviations

ASC	Aire sous la courbe
Axe	Acétyle-xylane estérase
AxeA	Acétyle-xylane estérase A
AxeA <sub>tr</sub>	Acétyle-xylane estérase A tronquée
BSA	Albumine sérique bovine
CA	Cellulose acétate
CBD-II	Domaine de liaison aux carbohydrates de type II
CDA	Chitine déacétylase
CE-4	Famille 4 des carbohydrates estérases
ChBD <sub>Cys</sub>	Domaine de liaison à la chitine riche en résidus cystéines
DA	Degré d'acétylation
DP	Degré de polymérisation
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
ESI	Ionisation par électronébulisation
GEWL	Lysozyme de blanc d'œuf d'oie
GH	Glycosidases
GlcNAc	<i>N</i> -acétyle glucosamine
GlcNH <sub>2</sub>	Glucosamine
HEWL	Lysozyme de blanc d'œuf de volaille
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
kDa	Kilo Dalton
MES	Acide 2-( <i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique
MT	Motif conservé des CE-4
NaOH	Hydroxyde de sodium
Pda	Peptidoglycane acide <i>N</i> -acétyle muramique déacétylase
Pgd	Peptidoglycane <i>N</i> -acétyle glucosamine déacétylase
p/v	Poids/volume
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne

<i>p</i> NP	<i>para</i> -nitrophénol
rpm	Rotation par minute
SDS	Dodécyle sulphate de sodium
IU/mg	Unités enzymatiques internationales/milligramme d'enzyme
v/v	Volume/volume

## Introduction

La chitine est le biopolymère naturel le plus abondant après la cellulose et l'hémicellulose. Composé de sous-unités de *N*-acétyl D-glucosamine, la chitine sert principalement comme constituant d'éléments de structure au sein de nombreux organismes tels que les crustacés, les insectes, les champignons et les levures. La chitine est un polymère fortement insoluble, ce qui en limite grandement les applications industrielles. Néanmoins, les oligomères de chitine et le chitosane, la forme déacétylée de la chitine, offrent un vaste champ d'applications dans des domaines aussi variés que le traitement des eaux, les traitements antifongiques ou même la culture de peau artificielle pour les grands brûlés. Plusieurs études récentes portent sur les propriétés pharmacologiques très variées des chitosanes. Or, ces propriétés dépendent directement de la nature des sucres employés, à savoir leur degré de polymérisation et de déacétylation. Les techniques industrielles actuelles de production emploient des procédés thermo-chimiques qui provoquent une production hétérogène de dérivés de la chitine. De plus, ces procédés sont très énergivores et libèrent beaucoup de sous-produits polluants. Enfin, le chitosane est un élément très rare dans la nature, ce qui exclut son exploitation à partir de sources renouvelables. Pour pallier à ces problèmes, plusieurs chercheurs ont opté pour l'approche de la «chimie verte» qui emploie des enzymes afin d'effectuer ces réactions de déacétylation. L'emploi de biocatalyseurs offre l'avantage d'être totalement contrôlable, reproductible et la grande spécificité des enzymes permet de s'assurer d'une production homogène tout en réduisant grandement les sous-produits polluants.

L'acétyl-xylane estérase A de *Streptomyces lividans* (AxeA) est une enzyme qui a pour fonction de briser les liens esters du xylane acétylé. Le xylane acétylé constitue le principal composant des hémicelluloses de bois durs. L'action de l'AxeA rend le xylane accessible aux différentes xylanases impliquées dans sa dégradation. Selon sa structure primaire, l'AxeA a été classée dans la famille des carbohydrates estérases 4 (CE-4). Cette famille très vaste regroupe des enzymes ayant différentes spécificités telles que des chitines déacétylases, des chitoooligosaccharides

déacétylases et des peptidoglycanes déacétylases. Il n'est donc pas surprenant de constater que l'AxeA est capable de déacétyler des substrats *O*- et *N*-acétylés tels que la cellulose acétate ou la chitine. En fait, plusieurs études récentes ont prouvé que l'AxeA était capable de déacétyler certains substrats chitineux solubles ainsi que des chitosanes. Néanmoins, les études effectuées employaient des méthodes indirectes pour mesurer l'activité de déacétylation et ne permettaient pas une caractérisation complète de cette activité secondaire. De plus, l'activité spécifique mesurée était trop faible pour envisager des applications industrielles de production de chitosanes.

L'objectif du travail était de caractériser plus en profondeur l'activité de déacétylation de l'AxeA envers des oligomères de chitine, mais aussi de potentiellement augmenter cette activité afin d'envisager certaines applications industrielles. Pour ce faire, une approche rationnelle a été appliquée. Suite à une étude comparative des structures tridimensionnelles de CE-4 ayant différentes spécificités, une région non-conservée du site actif a été ciblée afin d'effectuer un criblage fonctionnel des acides aminés. Le but était de comprendre l'implication des résidus ciblés dans l'affinité avec le substrat et ainsi fournir des données permettant d'améliorer l'activité de déacétylation. Toutefois, les tests initiaux de criblage ont permis de découvrir une activité glycosidique inusitée. Étant donné l'importance d'une telle découverte, il a été décidé de caractériser plus en profondeur cette deuxième activité secondaire. Les principaux résultats de cette caractérisation sont présentés sous forme d'un manuscrit scientifique adjoint au mémoire. De plus, une section supplémentaire présente la caractérisation partielle de l'activité de déacétylation de l'AxeA et des données complémentaires de son activité glycosidique qui n'ont pas pu être inclus dans le manuscrit scientifique soumis pour publication.

## **1. Revue bibliographique**

## 1.1 La chitine et le chitosane

### 1.1.1 Description et propriétés physico-chimiques

La chitine est un polysaccharide linéaire composé de sous-unités de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) reliées par des liens glycosidiques  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figure 1A) (Tsigos *et al.*, 2000). Certains copolymères de sous-unités de GlcNAc et de sous-unités de glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) sont aussi considérés comme de la chitine (Khor *et al.*, 2003; Lamarque *et al.*, 2004). Elle peut donc varier dans son degré de polymérisation (DP) et d'acétylation (DA), mais aussi dans son degré de liaison avec divers glycanes et protéines (Kuhn *et al.*, 1990). On la retrouve généralement sous une forme cristalline agencée en microfibrilles ordonnées. L'agencement des microfibrilles se fait selon deux patrons; la chitine  $\alpha$  avec les chaînes de polymères agencées façon anti-parallèle et la chitine  $\beta$  dont les chaînes sont placées de façon parallèle (Gardner *et al.*, 1975; Minke *et al.*, 1978). C'est cet arrangement des microfibrilles qui procure à la chitine des propriétés de robustesse et d'insolubilité. Après la cellulose et les hémicelluloses, la chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature avec une production d'au moins 10 Gtonne ( $10^{13}$  kg) par année (Kumar *et al.*, 2004). Elle est présente chez un grand nombre d'organismes très diversifiés tels les arthropodes, les mollusques, les champignons, les levures et mêmes certaines algues diatomées (Schrempf, 2001). La nature fortement insoluble de la chitine en fait un matériau de structure idéal. On la retrouve d'ailleurs principalement comme composant des parois cellulaires chez les mycètes ou dans l'exosquelette des insectes ainsi que la carapace des crustacés.

Le chitosane est un terme générique qui désigne l'ensemble des hétéropolymères solubles dérivés de la déacétylation de la chitine (Figure 1B) (Horn *et al.*, 2006). Les polymères de chitosane ont des DA et des poids moléculaires très variés. On considère généralement que le terme chitosane s'applique lorsque le degré d'acétylation est inférieur à 50% (Khor *et al.*, 2003). Contrairement à la chitine, le chitosane est relativement peu répandu dans la nature et on le retrouve principalement au sein de la paroi cellulaire de certains mycètes comme élément de résistance pour

contrer l'attaque de certaines enzymes chitinolytiques de plantes (Karasuda *et al.*, 2003; Khor et Lim, 2003; Blair *et al.*, 2006).

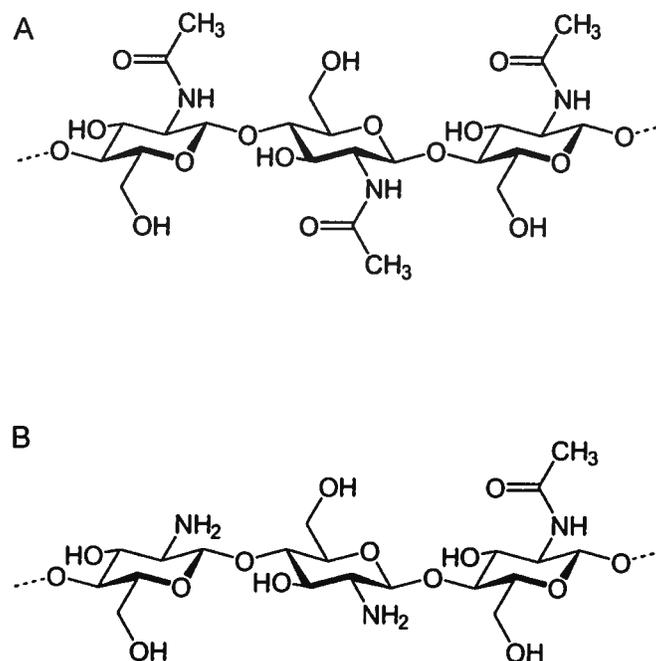


Figure 1. Structure de la chitine et du chitosane. A, structure de la chitine. B, structure du chitosane. Adapté de Hirano, (1996).

Sous sa forme cristalline, la chitine est un robuste biopolymère insoluble dans presque tous les solvants sauf quelques acides très concentrés et certains solvants organiques halogénés (Majeti *et al.*, 2000; Rinaudo, 2006). La forme  $\alpha$  est de loin la plus répandue dans la nature et constitue le principal composant de la paroi cellulaire des mycètes, de la carapace des crustacés et de la cuticule des insectes. La forme  $\beta$  se retrouve sous forme liée à des protéines pour former la plume des céphalopodes ou des tubes sécrétés par certains vers marins. Les propriétés d'insolubilité et de robustesse de la chitine cristalline sont dues à l'alignement des microfibrilles qui la composent et qui forment des feuillets reliés par des ponts hydrogènes provenant des groupements acétamides (Figure 2). Les feuillets de polymères qui composent les microfibrilles de la chitine  $\beta$  ne sont pas retenus entre eux par des ponts hydrogènes ce qui lui permet une certaine «perméabilité» à certains éléments sans toutefois la rendre soluble (Rinaudo, 2006). À l'inverse, la forme  $\alpha$  est stabilisée par des ponts

hydrogènes au sein des feuillets et entre les microfibrilles, ce qui la rend encore plus inerte que la forme  $\beta$ . Toutes ces propriétés font de la chitine un matériau difficile à traiter et à transformer malgré sa très grande abondance.

Contrairement à la chitine, le chitosane est soluble en solution acide grâce à la présence des groupements amines libres qui sont exposés et disponibles pour former des liens hydrogènes avec le solvant. Ceci confère au chitosane la propriété rarissime d'être un polymère basique contrairement à la plupart des autres biopolymères naturels comme la cellulose, le dextrane, l'agar ou la pectine qui sont plutôt de nature acide ou neutre (Kumar *et al.*, 2004). La protonation du groupement amine en milieu acide confère au chitosane une charge positive qui lui donne des propriétés uniques de chélateur d'ions métalliques ainsi que la possibilité de former des films ou même des gels. La nature aminée du chitosane permet diverses réactions de substitutions chimiques typiquement associées aux amines (Majeti *et al.*, 2000). De plus, il peut être transformé sous diverses formes physiques comme des poudres, des billes, des flocons, des films ou des gels (Tsigos *et al.*, 2000) Ces caractéristiques font du chitosane un matériau de choix pour de nombreuses applications.

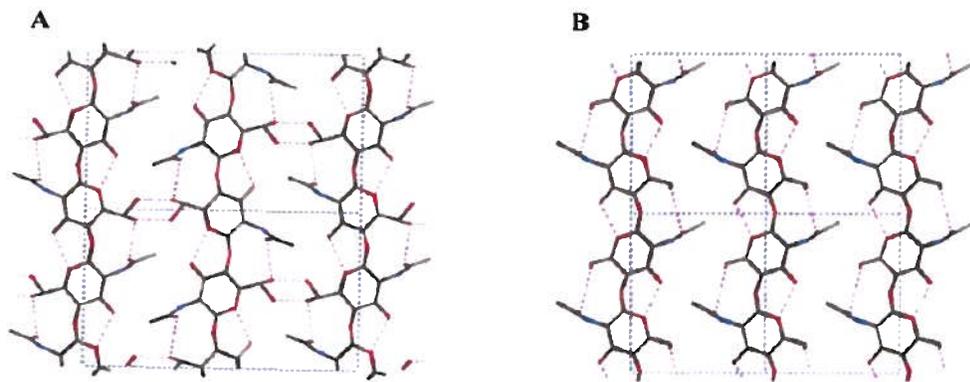


Figure 2. Structure cristalline de la chitine  $\alpha$  et de la chitine  $\beta$ . A, structure cristalline de la chitine  $\alpha$  avec des ponts hydrogènes entre les résidus des chaînes de polymères et les chaînes elles-mêmes. B, structure cristalline de la chitine  $\beta$  avec des ponts hydrogènes uniquement entre les résidus des chaînes de polymères. Adapté de (Rinaudo, 2006).

### 1.1.2 Intérêts et applications

La demande mondiale en chitine et chitosane connaît un essor grandissant depuis la dernière décennie avec une production actuelle provenant principalement du Japon, de l'Inde et de la Norvège. La chitine offre l'avantage d'être un polymère naturel, non toxique et inerte dans le système gastro-intestinal des mammifères (Jeon *et al.*, 2002; Guzey *et al.*, 2006). De plus, la chitine et ses dérivés sont biodégradables, si l'on tient compte de la profusion d'organismes qui possèdent des chitinases et chitosanases capables de les dégrader. Enfin, 95% de la chitine et du chitosane proviennent des déchets de l'industrie de la pêche et de la culture des mycètes, ce qui permet d'utiliser et de valoriser des sources qui seraient autrement des sous-produits polluants (Kurita, 2006). La chitine en elle-même a relativement peu d'applications industrielles, mais son hydrolyse en milieu acide ou alcalin permet d'obtenir des oligosaccharides de chitine et de chitosane qui sont reconnus pour leurs nombreuses propriétés biologiques. De nombreuses études ont souligné les propriétés antitumorales, antibactériennes, antifongiques et même d'agent «immunomodulateur» associées aux oligomères de chitine et de chitosane (Hirano, 1996; Cuero, 1999; Majeti *et al.*, 2000). Certains oligomères sont aussi reconnus comme éléments régulateurs de la photosynthèse et des systèmes de défense des plantes (Tharanathan *et al.*, 2003). Il n'est donc pas surprenant de retrouver des applications de ces biopolymères dans des domaines aussi diversifiés que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, des cosmétiques, de l'agriculture, dans le traitement des eaux usées et dans les domaines biotechnologiques. Le Tableau 1 résume les principales applications modernes des dérivés solubles de la chitine et du chitosane.

Tableau 1. Applications de la chitine et du chitosane.

Applications	Exemples	Références
Traitement des eaux	Récupération d'ions métalliques et de contaminants organiques comme les phénols, les protéines, les pesticides, les biphényles polychlorés, des radio-isotopes et des encres et colorants.	(Hirano, 1996; No et Meyers, 2000; Alves et Mano, 2008)
Agriculture	Enrobages de semences, de fruits et de légumes, fertilisant et fongicide.	(Hirano, 1996; Tharanathan et Kittur, 2003)
Alimentation	Éclaircissement et désacidification de jus, stabilisateur de couleur, réducteur d'adsorption de lipides, prolongement de la saveur, préservatif, antioxydant, émulsifiant, agent d'épaississement, additif alimentaire pour le bétail et les piscicultures.	(Jeon <i>et al.</i> , 2002; Tharanathan et Kittur, 2003; Guzey et McClements, 2006)
Biomédical et biopharmaceutique	Traitement des brûlures, sutures chirurgicales, lentilles de contact, membranes de dialyses pour le sang, matrice pour l'organogénèse <i>in vitro</i> : culture de peau artificielle, vaisseaux sanguins. Agent antitumeur, anticoagulant, hypocholestérolémique, antithrombogénique, immunomodulateur, antifongique, antibactérien. Vecteur pour médicaments, applications dentaires.	(Hirano, 1996; Felt <i>et al.</i> , 1998; Illum, 1998; Cuero, 1999; Thanou <i>et al.</i> , 2001; Guang Liu et De Yao, 2002; Alves et Mano, 2008; Jiang <i>et al.</i> , 2008; Vinsova et Vavrikova, 2008)
Produits cosmétiques	Produits de soins de la peau et des cheveux, hydratant.	(Hirano, 1996; Tharanathan et Kittur, 2003)
Réactifs analytiques	Immobilisation d'enzymes, matrice pour chromatographie, chélateur d'ions.	(Hirano, 1996; Tokuyasu <i>et al.</i> , 2000; Kumar <i>et al.</i> , 2004)
Autres	Fibres synthétiques, papier recouvert de chitosanes, coton, vêtements, films et éponges.	(Hirano, 1996)

Tableau inspiré de Tsigos *et al.* (2000).

### 1.1.3 Méthodes de production

La principale source de chitine employée pour la fabrication de chitosane est la carapace de crustacés provenant de l'industrie de la pêche. Par contre, ces résidus contiennent de la chitine qui est liée de façon covalente à différents composés. Pour la purifier, l'extraction se fait généralement en trois étapes, à savoir, la déprotéination, la déminéralisation et la décoloration. D'abord, les protéines sont éliminées par dégradation dans de la soude caustique ou bien en utilisant un mélange de plusieurs enzymes protéolytiques telles la papaïne, la trypsine, la pepsine ou la pronase (Tharanathan *et al.*, 2003). Ensuite, le carbonate de calcium et le phosphate de calcium sont enlevés avec de l'acide chlorhydrique afin de déminéraliser la chitine. Finalement, la chitine est débarrassée des caroténoïdes et des mélamines qui la compose par oxydation avec du permanganate de magnésium, du peroxyde d'hydrogène ou bien de l'hypochlorite de sodium. À ces étapes préliminaires qui permettent d'obtenir de la chitine purifiée, s'ajoutent ensuite de nombreuses étapes chimiques pour déloger les groupements labiles d'acétate du polymère. Le processus peut se dérouler à température ambiante (déacétylation homogène) ou bien à température élevée (déacétylation hétérogène) en présence d'un catalyseur chimique (le plus souvent de l'hydroxyde de sodium (NaOH)) plus ou moins concentré dépendamment du produit final désiré. La plupart des industries utilisent cependant la méthode hétérogène et doivent employer diverses astuces pour réduire l'inévitable dépolymérisation encourue par ces conditions «extrêmes». Le chitosane produit par ces méthodes thermochimiques est invariablement de degrés d'acétylation et de polymérisation hétérogènes, ce qui en limite son utilisation car ses propriétés sont directement liées à ces deux facteurs (Hirano, 1996; Tsigos *et al.*, 2000). De plus, l'utilisation de NaOH et de hautes températures est un processus polluant et très énergivore.

Face à ces difficultés de production, l'industrie a envisagé l'utilisation d'une approche simplifiée impliquant l'utilisation d'enzymes pour produire des chitosanes plus homogènes. L'utilisation de chitine déacétylases (CDA) provenant d'organismes différents a été évaluée dans de nombreuses études (révisées dans Tsigos *et al.*, 2000).

L'utilisation d'une déacétylase provenant du mycète *Mucor rouxii* a été testée avec différentes formes insolubles de chitine. L'efficacité s'est avérée relativement faible (de 0,5 à 9,5 %) fort probablement à cause de l'inaccessibilité des groupements acétyles de la chitine cristalline (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). D'autres études semblables impliquant des CDA de divers organismes ont montré l'inefficacité relative de ces enzymes envers la chitine insoluble. Par contre, le traitement de formes solubles de chitine a permis d'obtenir des résultats variant entre 17 et 100% de déacétylation et ce, à partir des mêmes enzymes (Tsigos *et al.*, 2000). L'utilisation d'un procédé enzymatique a, outre les bénéfices environnementaux évidents, l'avantage de permettre un contrôle sur le type de chitosane produit puisque la réaction n'est pas due au hasard comme dans le cas des techniques thermochimiques. Ainsi, différentes enzymes permettent la production de différents types de chitosane. La spécificité des enzymes permet un procédé hautement reproductible en plus d'éviter les «effets secondaires» de dépolymérisation des chitosane produits. Bien que prometteuse, l'inefficacité des enzymes envers les substrats insolubles et leurs coûts de production en prohibe encore l'utilisation à grande échelle. De plus, leur spécificité peut dans certains cas, en restreindre l'utilisation face à des sources de matière première souvent hétérogènes. Pour toutes ces raisons, beaucoup d'études d'optimisation des CDA sont en cours afin de pouvoir les employer éventuellement dans un cadre de «chimie verte».

## **1.2 La famille 4 des carbohydrates estérases**

### **1.2.1 Description**

La famille 4 des carbohydrates estérases (CE-4) est un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des groupements acétyles de poly/oligosaccharides *O*- ou *N*-substitués. Cette famille regroupe des enzymes ayant une grande diversité d'activités enzymatiques pour des structures primaires relativement similaires. La famille des CE-4 regroupe des acétyle-xylane estérases (Axe) (EC 3.1.1.72), des chitines déacétylases (CDA) (EC 3.5.1.41), des chitooligosaccharides déacétylases (EC 3.5.1.-), des peptidoglycane *N*-acétyle glucosamine déacétylases (Pdg) (EC 3.5.1.-) et des

peptidoglycane acide *N*-acétyl muramique déacétylases (Pda) (EC 3.5.1.-) (<http://www.cazy.org/fam/CE4.html>). La famille des CE-4 comprend 2284 entrées à ce jour dont 2149 CE provenant de procaryotes et 109 d'eucaryotes, ce qui en fait la plus grande famille des CE. Elles sont toutes caractérisées par la présence d'un domaine d'homologie au facteur de nodulation NodB qui ressemble aux chitines déacétylases impliquées dans la nodulation par le facteur bactérien NodB (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Plusieurs membres des CE-4 ont été exprimés et caractérisés au niveau de leur spécificité de substrats et de leurs caractéristiques cinétiques (Caufrier *et al.*, 2003). De plus, une dizaine de CE-4 ont été cristallisées dont neuf proviennent d'organismes procaryotes (tableau 2). Contrairement à la plupart des CE, les CE-4 ne sont pas des «sérine hydrolases», mais bien des «aspartate hydrolases» caractérisées par la présence d'une triade catalytique His-Asp-Asp. Elles sont considérées comme des métalloenzymes car leur site actif est aussi caractérisé par la présence d'une triade de coordination d'ions métalliques divalents His-His-Asp. Ce motif est conservé parmi toutes les CE-4 à l'exception de la PdaA de *Bacillus subtilis* et de l'Axe de *Clostridium thermocellum* qui ne possèdent que deux résidus de coordination de l'ion métallique (Blair *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006).

Tableau 2. Liste des CE-4 dont les structures tridimensionnelles ont été résolues.

Origine procaryote					
Protéine	numéro EC	Organisme source	numéro GenBank	PDB	Référence
BA0424	n/d	<i>Bacillus anthracis str. Ames</i>	AAP24453.1	2J13 1NY1	Oberbarnscheidt <i>et al.</i> (2007)
PdaA (BSU07980)	3.5.1.-	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	CAB12627.1	1W17 1W1A 1W1B	Fourouhar <i>et al.</i> (2003) (non-publié)
Acetyl xylane esterase/ Xylanase A ou U (Xyn11A)	3.1.1.72 3.2.1.8	<i>Clostridium thermocellum F11YS</i>	ACC04579.1	2C79 2C71	Taylor <i>et al.</i> (2006)
PA1517	n/d	<i>Pseudomonas aeruginosa PA01</i>	AAG04946.1	1Z7A 3CL6	Chang <i>et al.</i> (2005) (non-publié)
PuuE allantoïnase	3.5.2.5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ACA50280.1	3CL7 3CL8	Ramazina <i>et al.</i> (2008)
Polysaccharide deacetylase (SMU 623c)	3.1.1.-	<i>Streptococcus mutant UA159</i>	AAN58357.1	2W3Z	Deng <i>et al.</i> (2009)
PgdA	3.1.1.-	<i>Streptococcus pneumoniae R6</i>	AAL00137.1	2C1G 2C11	Blair <i>et al.</i> (2005)
Acetyl xylane esterase (AxeA)	3.1.1.72	<i>Streptomyces lividans</i>	AAC06115.1	2CC0	Taylor <i>et al.</i> (2006)
Origine eucaryote					
Protéine	numéro EC	Organisme source	numéro GenBank	PDB	Référence
EcCDA (FCU11_0510)	2.4.1.- 3.2.1.-	<i>Encephalitozoon cuniculi GIB-M1</i>	CAD25961.1	2VY0	Urch <i>et al.</i> (2008) (non-publié)
CDA	3.5.1.41	<i>Glomerella lindemuthiana UPS9</i>	AAT68493.1	2IW0	Blair <i>et al.</i> (2006)

### 1.2.2 Structures tridimensionnelles

Les CE-4 sont caractérisées par une structure tridimensionnelle typique «TIM-barrel» ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> plus ou moins déformée au centre de laquelle se situe un sillon catalytique relativement large qui contient la majorité des résidus conservés au sein de la famille (Blair et van Aalten, 2004). En fait, toutes les CE-4 ont un degré d'échange de structures secondaires plus ou moins grand par rapport à la topologie canonique (Blair *et al.*, 2006). Par exemple, la PdaA de *B. subtilis* contient une boucle supplémentaire ( $\beta_1$ ) en portion N-terminale qui, avec une autre boucle ( $\beta_7$ ), forme un feuillet  $\beta$  supplémentaire par rapport à la forme canonique (figure 3A). De plus, le fond de la structure «TIM-barrel» est formé par une structure «extra-canonique» (boucle  $\beta_{11}$  et hélice  $\alpha_8$ ). Enfin, l'hélice ( $\alpha_1$ ) de la PdaA occupe la place de l'hélice ( $\alpha_5$ ) de la forme canonique, ce qui montre une certaine forme de décalage par rapport

à la structure de référence (Blair et van Aalten, 2004). Les déformations vont jusqu'à des inversions des domaines N- et C- terminaux comme dans le cas de la PgdA de *S. pneumoniae* dont la première boucle ( $\beta_2$ ) correspond à la dernière boucle ( $\beta_{17}$ ) de la PgdA (figure 4D) (Blair *et al.*, 2005). Cependant, la majorité des CE-4 ont une structure similaire à celle de la CDA de *C. lindemuthianum* qui possède les portions N- et C-terminales du même côté du «TIM-barrel» et qui seraient reliées par un pont disulfure relativement conservé au sein de la famille (figure 3B) (Blair *et al.*, 2006).

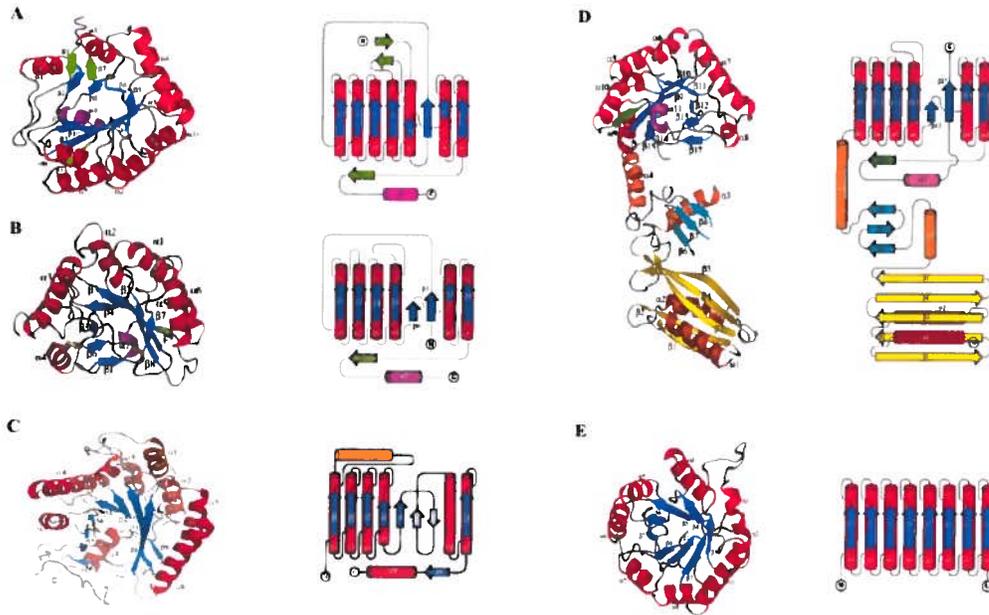


Figure 3. Structures tridimensionnelles en ruban et représentations topographiques de CE-4. A, PdaA de *B. subtilis* (PDB 1W17). B, CDA de *C. lindemuthianum* (PDB 2IW0). C, PuuE allantoinase de *P. fluorescens* (PDB 3CL7). D, PgdA de *S. pneumoniae* (PDB 2C1G). E, la structure canonique  $(\alpha/\beta)_8$  «TIM-barrel». Les hélices  $\alpha$  (rouge) et les feuilletts  $\beta$  (bleu) qui font partie intégrante de la structure canonique sont identifiés. Les autres éléments de structure secondaire sont de couleurs différentes. Adapté de Blair et van Aalten (2004); Blair *et al.* (2005); Blair *et al.* (2006); Ramazzina *et al.* (2008).

La structure du site actif des CE-4 est formée d'un long sillon relativement peu profond dont une extrémité est fermée par la portion N-terminale. Cette région est très variable en longueur d'une enzyme à l'autre. L'autre extrémité est généralement formée par l'extrémité C-terminale et contient les résidus catalytiques conservés chez toutes les CE-4 (figure 4A) (Blair et van Aalten, 2004). La portion variable contient

habituellement une majorité de résidus basiques alors que la portion conservée est formée à majorité de résidus acides (figure 4B). La présence ou l'absence de résidus spécifiques dans ces régions est ce qui conférerait à l'enzyme sa spécificité de substrat. Par exemple, la PdaA de *B. subtilis* possède dans sa région variable trois résidus basiques supplémentaires (K34, R35 et R166) chargés positivement et qui seraient capables de former des liens avec les groupements *O*-lactyles des résidus d'acide muramique des peptidoglycanes (figure 4A). Ces résidus ne sont pas conservés chez les autres CE-4 et donneraient à la PdaA sa spécificité (Blair et van Aalten, 2004). Le site catalytique des CE-4 est assez long pour accommoder des substrats polymériques avec des sites de liaison capables de lier des substrats d'au moins trois résidus (Tsigos *et al.*, 1999; Tokuyasu *et al.*, 2000; Hekmat *et al.*, 2003). En fait, la plupart des CE-4 ont démontré leur efficacité envers des oligomères de substrats ayant un DP-3 ou plus (Blair et van Aalten, 2004; Ramazzina *et al.*, 2008). Par exemple, des études biochimiques ont révélé que la CDA de *C. lindemuthianum* possède quatre sites de liaison au substrat et ne déacétyle que les substrats d'au moins trois résidus avec une forte efficacité pour les pentamères et les hexamères (Tokuyasu *et al.*, 2000; Blair *et al.*, 2005). La PgdA de *S. mutans* quant à elle ne lie que des oligomères de DP-3 ou plus et la structure de la PuuE allantoinase de *P. fluorescens* contiendrait aussi quatre sites de liaison au sein de son site catalytique, une structure typiquement conservée chez les CE-4 (Ramazzina *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009).

Les CE-4 sont considérées comme des enzymes métal-dépendantes et les alignements de séquences montrent la présence d'une triade conservée de coordination de cations divalents. Bien que certaines études aient montré que la présence de cations divalents n'est pas essentielle à l'activité de déacétylation, l'analyse de certaines structures tridimensionnelles laisse plutôt penser que la liaison de l'ion métallique serait dans certains cas suffisamment forte pour ne pas permettre une séquestration par l'EDTA (Blair *et al.*, 2006). En fait, la majorité des CE-4 analysées à ce jour présentent un site de coordination formé de deux résidus histidines et un résidu aspartate. La coordination de l'ion divalent se fait selon une géométrie octaédrique déformée entre la triade His-His-Asp, les oxygènes du groupement acétyle du substrat et une molécule d'eau proximale (figure 4C). Certaines enzymes, comme la CDA de

*C. thermocellum* ou la BA0424 de *B. anthracis*, ne possèdent pas la triade et peuvent avoir un résidu de coordination en moins, mais compensent par une plus grande quantité de molécules d'eau afin de garder la structure octaédrique de coordination (figure 4D). La substitution de l'aspartate par des résidus basiques comme l'arginine ou même des résidus hydrophobes comme l'alanine ou la valine pourrait jouer au niveau de la spécificité de ces enzymes en permettant par exemple le positionnement de groupements plus encombrants comme ceux retrouvés chez les peptidoglycanes (Oberbarnscheidt *et al.*, 2007).

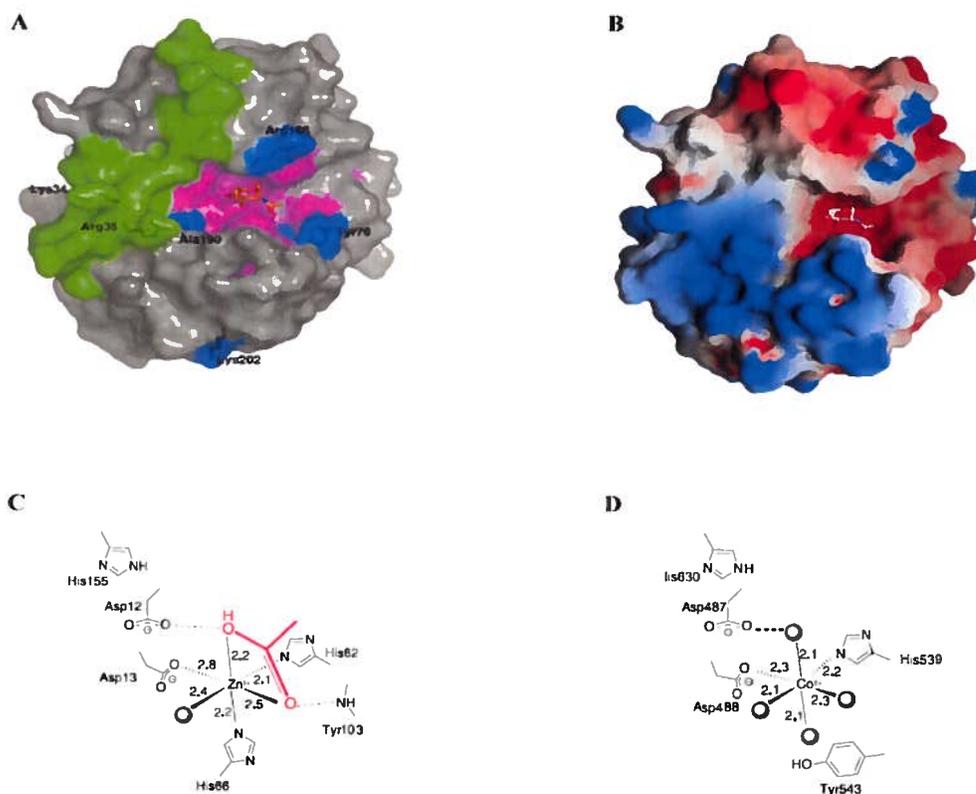


Figure 4. Topologie de surface de CE-4 et mécanisme de coordination des cofacteurs métalliques. A, image de surface de la PdaA de *B. subtilis*. Les régions N-terminale variable et C-terminale conservée sont représentées en vert et magenta respectivement. Les résidus en bleu représentent des acides aminés uniques à la PdaA par rapport aux autres CE-4. B, image de la polarité des résidus de surface de la PdaA. Les résidus basiques positifs (bleu) et les résidus acides négatifs (rouge). C, structure octaédrique de coordination du zinc retrouvée chez l'AxeA de *S. lividans* typiquement conservée parmi les CE-4. D, structure de coordination observée chez l'Axe de *C. thermocellum* avec un résidu tyrosine qui positionne une molécule d'eau (sphère) à la place d'un résidu histidine. Adapté de Blair *et al.* (2004) et de Taylor *et al.* (2006).

La plupart des études montrent que les CE-4 sont plus actives en présence de  $Zn^{2+}$  même si certaines enzymes comme l'AxeA de *S. lividans* ou la PdaA de *B. subtilis* ont une activité maximale en présence de  $Co^{2+}$  et de  $Cd^{2+}$  respectivement (Blair et van Aalten, 2004; Puchart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). Cependant, l'inaccessibilité biologique d'ions  $Cd^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  dans l'environnement naturel laisse plutôt penser que les CE-4 sont en fait des estérases zinc-dépendantes (Taylor *et al.*, 2006). De plus, l'agencement octaédrique de la coordination d'un atome de zinc est typique des hydrolases zinc-dépendantes (Hernick *et al.*, 2005).

Les alignements de séquences primaires de CE-4 montrent la présence d'au moins cinq motifs conservés (figure 5). Le premier motif (MT1; séquence TFDD) contribue à la liaison du métal et de l'acétate libérée. Le motif 2 (MT2; séquence H(S/T)xxHP) contient deux histidines impliquées dans la coordination de l'ion métallique alors que la sérine (ou la thréonine) accepte un lien hydrogène qui stabilise la boucle permettant la position des résidus histidines à distance de coordination. Le motif 3 (MT3) forme l'un des côtés du site catalytique et contient une tyrosine conservée impliquée dans le positionnement du substrat et dont le groupement amide du lien peptidique permet un lien hydrogène avec un oxygène de l'acétate. Un résidu arginine conservé au sein d'une poche hydrophobe forme un lien hydrogène avec un résidu aspartique du MT1 lui conférant un état de base générale catalytique. Le motif 4 (MT4) forme le côté opposé de la poche catalytique et contient un résidu tryptophane exposé qui forme des interactions hydrophobes avec les résidus glycosidiques. Il contient aussi un résidu aspartique qui forme un lien hydrogène avec une histidine lui permettant d'agir comme acide général catalytique. Enfin, le motif 5 (MT5) contient l'essentiel de la poche hydrophobe entourant l'arginine du MT3 permettant d'accepter le groupement méthyle de l'acétate ainsi que l'histidine déprotonée par l'aspartate du même motif (Blair *et al.*, 2005).

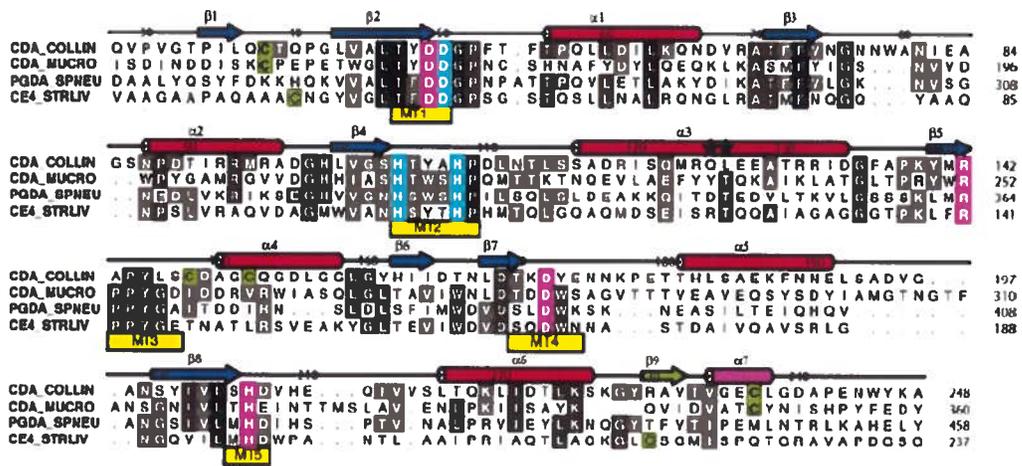


Figure 5. Alignement de séquences de CE-4 représentatives de la famille montrant les motifs conservés. CDA\_COLLIN, CDA de *C. lindemuthianum*; CDA\_MUCRO, CDA de *M. rouxii*; PGDA\_SPNEU, PgdA de *S. pneumoniae*; CE4STRLIV, AxeA de *S. lividans*. Les cinq motifs conservés des CE-4 (MT1-5, en jaune), les résidus de coordinations du ligand métallique (bleu), les résidus catalytiques (magenta) et les cystéines (vert) impliquées dans la formation de ponts disulfures sont indiqués. Adapté de Blair *et al.* (2006).

Les CE-4 sont considérées comme étant des hydrolases zinc-dépendantes. Le mécanisme d'action de ces hydrolases fait appel à un mécanisme acido-basique classique (Hernick et Fierke, 2005). Typiquement, un acide aminé basique (glutamate ou aspartate du MT1) vient activer une molécule d'eau proximale à l'atome de zinc qui sert d'acide de Lewis pour stabiliser la molécule nucléophile créée. S'ensuit une attaque nucléophile par l'hydroxyle formé au carbone du groupement carbonyle qui devient dès lors anomérique. La proximité d'un groupement amide du lien peptidique d'une tyrosine conservée (du MT3) permet de stabiliser le groupe oxyanionique formé momentanément. Enfin, un résidu histidine (du MT5) agit comme acide général pour assister à la «libération» du sucre en protonant l'azote du groupement amine ce qui libère la molécule d'acétate (figure 6). Plusieurs études cristallographiques de CE-4 ont permis d'identifier des structures et des positionnements de substrats en accord avec ce mécanisme, confirmant ainsi le mécanisme employé au sein des CE-4 (Blair *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2009).

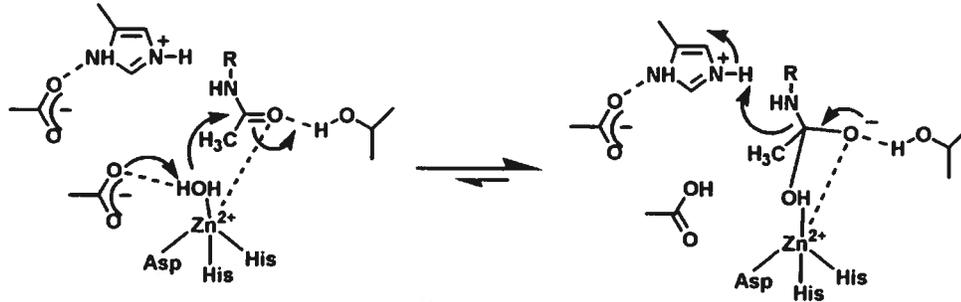


Figure 6. Mécanisme enzymatique des hydrolases zinc-dépendantes. Le résidu aspartique agit comme base générale et vient activer une molécule d'eau liée à l'atome de zinc. L'hydroxyle formé attaque l'atome de carbone du groupement carbonyle pour former un oxyanion stabilisé par un hydroxyle proximal. Un résidu histidine agit ensuite comme acide général pour libérer l'acétate. Adapté de Hernick et Fierke, (2005).

### 1.3 L'acétyl-xylane estérase A de *S. lividans*

#### 1.3.1 Caractéristiques et fonctions

L'acétyl xylane estérase A de *S. lividans* (AxeA) est une enzyme capable d'hydrolyser les liens esters des groupements *O*-acétyles du xylane, le principal composant des hémicelluloses des bois durs. Elle fait partie d'un système xylanolytique dans lequel son action rend le xylane accessible aux diverses xylanases de *S. lividans* (figure 7). Le gène de l'AxeA se situe d'ailleurs directement en aval du gène codant pour la xylanase Xyn10b. De plus, son expression est stimulée *in vivo* par l'apport de xylane de bouleau dans le milieu de culture (Shareck *et al.*, 1995). L'AxeA est formée de deux domaines reliés par une boucle riche en résidus de glycine. Le domaine N-terminal est un domaine catalytique homologue au domaine NodB retrouvé chez toutes les CE-4 alors que le domaine situé en C-terminal est un domaine de liaison au xylane homologue au domaine de liaison des carbohydrates II (CBD-II). Ce dernier a une grande homologie avec le domaine de fixation au xylane de la xylanase B de *S. lividans* et est spécifique au xylane. L'AxeA est une enzyme de 34 kDa ayant un point isoélectrique de 9,0 et sa caractérisation a démontré une activité maximale envers le xylane de bouleau. Sa température optimale est de 70 °C et elle est

relativement thermostable avec une activité résiduelle de 75 % à 95 °C. Elle est aussi active sur une large gamme de pH mais possède un pH optimal de 7,5 (Dupont *et al.*, 1996).

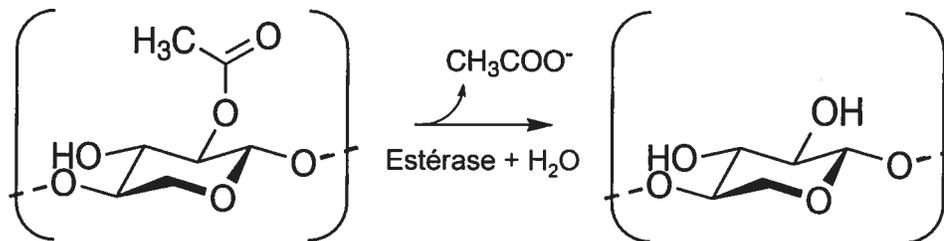


Figure 7. Schéma de la réaction de déacétylation effectuée par les acétyl-xylane estérases.

### 1.3.2 Spécificité de l'AxeA

L'AxeA est capable de déacétyler les résidus *O*- et *N*- acétyles de pentoses et d'hexoses. La caractérisation biochimique de l'AxeA a montré une spécificité pour des substrats polymériques tels que divers dérivés de xylane acétylé, de cellulose acétate et même certains substrats chitineux solubles (Biely *et al.*, 1996; Dupont *et al.*, 1996; Altaner *et al.*, 2003; Caufrier *et al.*, 2003; Morley *et al.*, 2006). Cependant, aucune activité n'a pu être observée envers les peptidoglycanes et les substrats insolubles (Caufrier *et al.*, 2003; Morley *et al.*, 2006). L'AxeA a aussi démontré de l'activité pour des substrats oligomériques tels que les chitooligosaccharides, le xylose tétra-acétate et le glucose penta-acétate. Néanmoins, l'enzyme est spécifique aux substrats naturels car elle n'a pas démontré d'affinité pour des analogues synthétiques de sucres tels que le 4-méthylumbelliféryle acétate et le *p*-nitrophényle acétate (Taylor *et al.*, 2006). L'AxeA a clairement démontré une préférence pour les groupements acétates situés en position 2- ou 3- sur les substrats. Elle est aussi la seule Axe qui nécessite la présence d'un groupement hydroxyle en position 3- pour permettre la déacétylation (Biely *et al.*, 2003). L'AxeA est une métalloenzyme dont l'activité maximale a été observée en présence de  $\text{Co}^{2+}$ . Cependant, la disponibilité de cet ion

dans le milieu naturel de *S. lividans* suggère plutôt que l'enzyme est zinc-dépendante. La cristallisation de l'enzyme sans apport d'ion a d'ailleurs révélé que 50% des cristaux contenaient un atome de zinc lié au sein de la protéine (Taylor *et al.*, 2006). L'AxeA a aussi montré une tolérance envers d'autres cations bivalents tels le  $Mn^{2+}$ , le  $Cd^{2+}$ , et le  $Ni^{2+}$  avec respectivement 45%, 46% et 10% de l'activité maximale observée avec le cobalt. En présence de zinc, l'enzyme avait 33% de l'activité maximale alors que le  $Mg^{2+}$  inhibait complètement l'enzyme (Taylor *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Structure tridimensionnelle du domaine catalytique et mécanisme d'action

La structure tridimensionnelle du domaine catalytique de l'AxeA a été résolue par Taylor et collaborateurs en 2006. Seule la forme tronquée (AxeA<sub>tr</sub>) de la protéine a pu être cristallisée. Des études d'affinité envers la chitine ont prouvé que la forme tronquée avait essentiellement les mêmes caractéristiques biochimiques envers les substrats chitineux que la forme complète, suggérant que le domaine N-terminal de liaison CBD-II n'affecte pas l'activité de l'enzyme envers d'autres substrats que le xylane (Morley *et al.*, 2006). La forme tronquée est constituée du domaine catalytique qui comprend les résidus 42 à 233 du gène original (résidus identifiés de 1 à 192 dès lors pour le lecteur). Le domaine catalytique présente à sa surface un large sillon au sein d'une structure  $(\alpha/\beta)_8$  déformée qui ressemble beaucoup à la conformation de l'Axe de *C. thermocellum* ainsi qu'au domaine catalytique de la PgdA de *S. pneumoniae* (figure 8A). Au fond du sillon se trouve un atome de zinc coordonné par deux histidines (H62 et H66) et un aspartate (D13), une molécule d'eau et les oxygènes d'une molécule d'acétate liée, le tout selon une géométrie octaédrique déformée. Cet arrangement est typique des estérases zinc-dépendantes (Hernick et Fierke, 2005). À proximité de cette «sphère» de coordination se trouve un aspartate déprotoné (D12) coordonné par une arginine conservée (R100) localisée au sein d'une poche hydrophobe formée par les résidus V122, W124 et L153 qui délimitent le fond du sillon. Le positionnement de cette poche permet d'ailleurs d'accepter le groupement méthyle de l'acétate. Une histidine (H155) coordonnée par un aspartate (D130) enfoui dans une autre poche hydrophobe donne aussi un lien hydrogène à un

oxygène de l'acétate. Les résidus conservés Y103, W124 et W131 sont tous exposés au solvant et permettent d'offrir une «couverture» hydrophobe en s'alignant avec les anneaux pyranoses du substrat. Le mécanisme d'action de l'AxeA commence par l'activation d'une molécule d'eau par la base catalytique D12. Cette activation se fait via l'ion métallique qui agit comme acide de Lewis. L'hydroxyle nucléophile attaquerait ensuite le carbone électrophile du groupement carbonyle formant un ion oxyanionique maintenu en place par le pont hydrogène donné par le groupement amide du lien peptidique du résidu T103. La libération du groupement amide du substrat se fait via l'histidine 155 qui agit comme acide général. Enfin, le résidu D12 protoné donne un lien hydrogène à l'histidine 155 ce qui redonne le patron d'ionisation initial. La capacité de l'AxeA<sub>ir</sub> à déacétyler les substrats de chitine pourrait être due à la présence de deux résidus hydrophobes. En effet, les résidus Y103 et W124 ne sont pas conservés chez l'Axe Xyn11A de *C. thermocellum*. Or, ces deux enzymes ont une topologie du site actif très semblable, mais contrairement à l'AxeA de *S. lividans*, la Xyn11A n'a aucune activité envers les oligomères de chitine (fig. 7B) (Taylor *et al.*, 2006). On retrouve d'ailleurs un résidu tyrosine équivalent chez la CDA de *C. lindemuthianum* mais pas chez les PgdA et PdaA de *S. mutans* et *B. subtilis* qui sont spécifiques aux peptidoglycanes (Deng *et al.*, 2009). Ainsi, on remarque que pour une structure globale très semblable, les CE-4 présentent une vaste diversité d'affinité de substrats qui serait due à des variations de topologie relativement mineures.

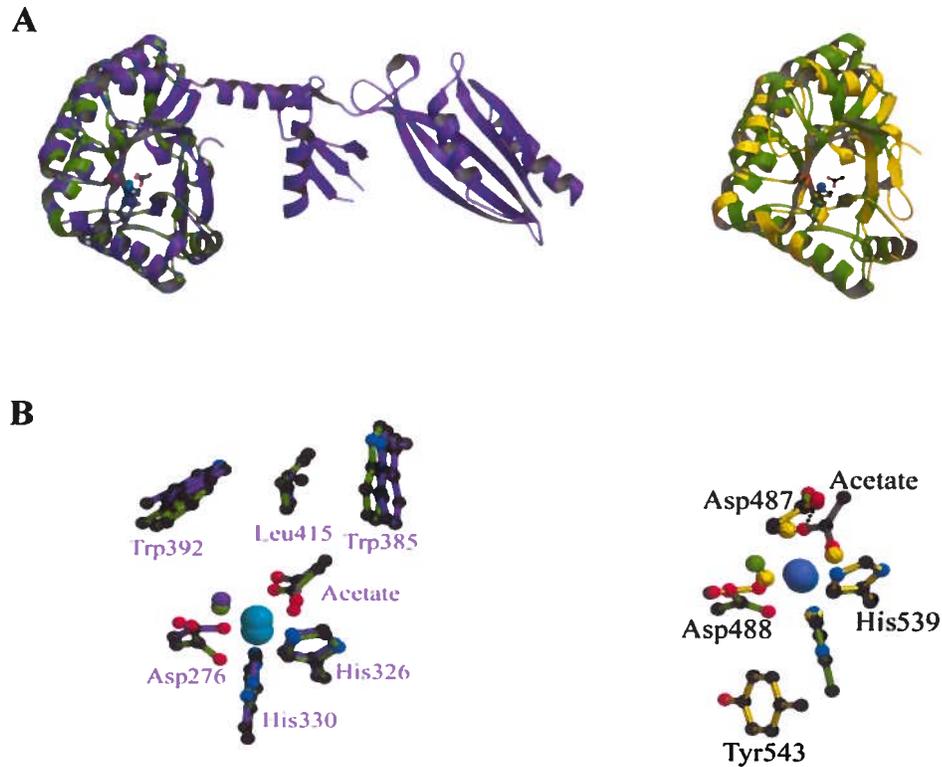


Figure 8. Superposition de la structure tridimensionnelle de l'AxeA<sub>tr</sub> avec celles d'autres CE-4. A, superposition de la structure de l'AxeA<sub>tr</sub> (en vert) schématisée en rubans avec la PgdA de *S. pneumoniae* (en violet) et l'Axe Xyn11A de *C. thermocellum* (en jaune). B, superposition des acides aminés du site catalytique représentés en modèle «boule et bâton». À gauche, superposition des résidus de l'AxeA<sub>tr</sub> (vert) avec ceux de la PgdA (en violet). À droite, superposition avec les résidus du site actif de la Xyn11A (en jaune). Adapté de (Taylor *et al.*, 2006).

## 1.4 Les enzymes chitinolytiques

### 1.4.1 Description et fonctions

Tel que mentionné précédemment, la chitine est le second biopolymère en abondance dans la nature. Ses propriétés hydrophobes et inertes en font un constituant majeur de divers éléments de structure comme les parois cellulaires ou la carapace des crustacés. Malgré sa prévalence et sa robustesse, la chitine est très rapidement récupérée dans la nature grâce à une pléiade d'enzymes chitinolytiques. Parmi ces

enzymes, on retrouve les chitinases, les chitosanases et les lysozymes qui dégradent les liens  $\beta(1\rightarrow4)$  de la chitine, du chitosane et des peptidoglycanes respectivement. Ces enzymes sont ubiquitaires chez à peu près tous les organismes vivants, qu'ils fabriquent de la chitine ou non. Le rôle des enzymes chitinolytiques est aussi diversifié que leurs sources. Chez les vertébrés, ces enzymes servent surtout au sein du tractus digestif, mais on les retrouve aussi comme mécanisme de défense primaire des infections (Dahiya *et al.*, 2006). Elles ont aussi un rôle défensif contre les mycètes infectieux chez les plantes supérieures. Chez les mycètes et les organismes capables de fabriquer de la chitine, elles auraient plutôt un rôle autolytique en étant impliquées dans la morphogénèse, mais elles peuvent également avoir un rôle défensif en modifiant la structure des parois cellulaires ce qui empêche leur dégradation par d'autres organismes. Chez les bactéries, les enzymes chitinolytiques ont principalement un rôle nutritionnel et peuvent servir dans certaines relations parasitaires ou compétitives (Bhattacharya *et al.*, 2007).

Malgré des spécificités différentes, les enzymes chitinolytiques dégradent des substrats relativement semblables. Aussi, elles ont en commun une homologie de structure qui permettrait de lier ce type de substrats. Des études ont démontré que malgré l'absence d'homologie de séquence, certaines chitinases, chitosanases et lysozymes possédaient une structure catalytique formée de deux hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  (figure 9A) (Monzingo *et al.*, 1996). De plus, l'analyse de leur structure tridimensionnelle montre un arrangement conservé de deux domaines globulaires séparés par un long sillon catalytique contenant l'essentiel du noyau commun (figure 9B). Ces enzymes sont donc considérées comme faisant partie d'une superfamille d'hydrolases qui auraient divergé d'un ancêtre commun (Robertus *et al.*, 1998). Ainsi, l'homologie de fonction des enzymes chitinolytiques découlerait d'une homologie de géométrie tridimensionnelle plutôt que d'une homologie de résidus conservés.

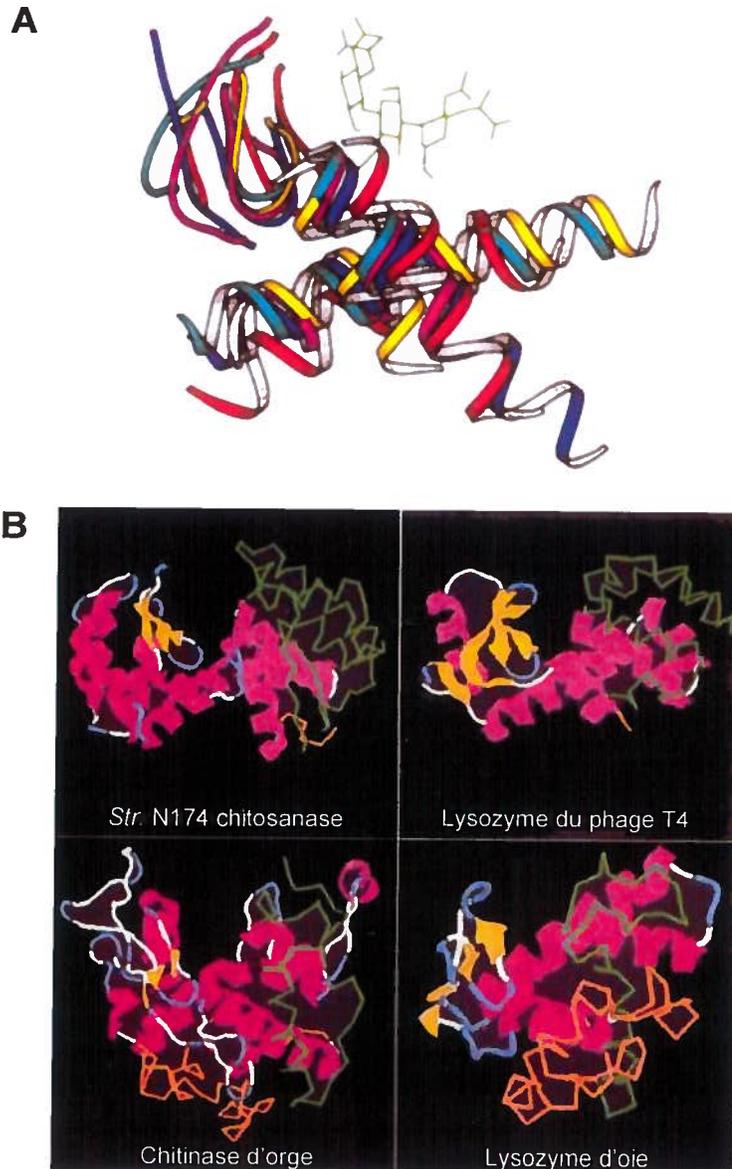


Figure 9. Homologie de structure entre des enzymes chitinolytiques de différentes familles. A, alignement d'éléments de structure invariables démontrant la présence d'un noyau commun. Les centres catalytiques de la chitinase d'orge commun (violet), la chitinase de *Streptomyces sp.* N174 (rouge), le lysozyme de blanc d'œuf de volaille (magenta), de blanc d'œuf d'oie (jaune) et du phage T4 (bleu cyan). Une molécule de chitotetraose est modélisée en bâtonnets verts. Adapté de Monzingo *et al.*, (1996). B, homologie de structure tridimensionnelle entre la chitinase de *Streptomyces sp.* N174 (GH-46), la chitinase de d'orge commun (GH-19), le lysozyme de blanc d'œuf d'oie (GH-23) et le lysozyme du phage T4 (GH-24). Adapté de Fukamizo *et al.* (2000).

## 1.4.2 Les chitinases- description et fonctions

Les chitinases peuvent être classées selon deux principales catégories. Les endochitinases (EC 3.2.1.14) hydrolysent le polymère de façon aléatoire afin de produire des oligomères de *N*-acétyl glucosamine solubles. Les exochitinases (EC 3.2.1.29) quant à elles, peuvent être subdivisées en deux catégories, les chitobiosidases et les *N*-acétyl glucosaminidases (EC 3.2.1.30). Les chitobiosidases relâchent des dimères de chitine à partir de l'extrémité non-réductrice du biopolymère alors que les *N*-acétyl glucosaminidases relâchent des monomères de *N*-acétyl glucosamine à partir des oligomères formés par les endochitinases et les chitobiosidases. Les chitinases ont été initialement regroupées en cinq classes selon leur homologie de structure primaire. Les trois premières classes rassemblaient des séquences de chitinases retrouvées chez les plantes supérieures. Les enzymes des classes I et IV étaient formées par un domaine catalytique hautement conservé et une région N-terminale riche en cystéines qui forme un site de liaison à la chitine (ChBD<sub>Cys</sub>). Les deux domaines sont reliés par une boucle de 10 à 20 résidus. La classe II est formée uniquement du domaine catalytique C-terminal de la classe I sans le domaine ChBD<sub>Cys</sub>. Les classes III et V regroupaient principalement des chitinases d'origine bactérienne. Les différentes classes ont été regroupées ultérieurement en familles de glycosidases (GH). Les classes I, II et IV des chitinases forment la famille 19 des glycosidases (GH-19). Elles n'ont aucune homologie de séquence avec les classes III et V qui forment quant à elles la famille GH-18. Les deux familles ont des structures complètement différentes et emploient des mécanismes différents suggérant qu'elles ont des origines évolutives différentes (Fukamizo, 2000).

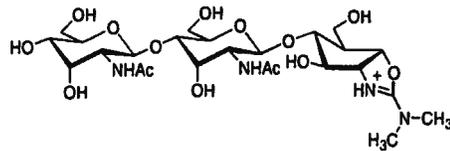
### 1.4.2.1 La famille GH-18

La famille des GH-18 regroupe de nombreuses chitinases provenant de sources très diverses telles les bactéries, les virus, les mammifères, les insectes, les plantes supérieures et les nématodes. Les GH-18 provenant de plantes ont généralement un mécanisme d'hydrolyse de type «endo» avec un clivage aléatoire des liens  $\beta(1\rightarrow4)$

alors que les GH-18 d'origine bactérienne agissent le plus souvent par mode «exo» avec une libération de dimères à partir de l'extrémité non-réductrice du sucre (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998). Dans tous les cas, les GH-18 font appel à un mécanisme de rétention qui permet de conserver l'isomère  $\beta$  du carbone anomérique situé à l'extrémité réductrice des produits via un mécanisme de double inversion. Une autre caractéristique des enzymes de cette famille est leur structure tridimensionnelle en forme de baril  $(\alpha/\beta)_8$ . On a longtemps cru que le mécanisme de rétention faisait appel à deux carboxylates situés spatialement proche l'un de l'autre, un agencement similaire à ce qui est retrouvé chez certains lysozymes (Fukamizo, 2000). Néanmoins, des études de mutagenèse dirigée et des analyses de certaines structures tridimensionnelles n'ont pas réussi à identifier la présence d'un deuxième carboxylate proximal pouvant agir comme résidu catalytique (Watanabe *et al.*, 1994). De plus, de nombreuses études ont démontré que les GH-18 sont fortement inhibées par l'allosamidine, un pseudo-trisaccharide produit par certaines espèces de *Streptomyces*. L'allosamidine est en fait un trisaccharide de chitine dont le résidu terminal (extrémité réductrice) contient un groupement oxazolinium stable (figure 10A). Le puissant pouvoir inhibiteur (de l'ordre du nM) de l'allosamidine proviendrait de sa structure très semblable à un état intermédiaire de la catalyse de la chitine (Andersen *et al.*, 2005). Cet état transitoire passant par un ion oxazolinium n'est possible que si la catalyse emploie un mécanisme d'assistance anchimérique par le groupement acétamide du substrat. Ainsi, cette assistance du groupement acétamide proximal serait due à une distorsion du substrat au site catalytique de l'enzyme (Fukamizo, 2000). Cette distorsion provoquerait une conformation bateau du résidu glycosidique permettant un alignement axial entre le carbone anomérique et l'oxygène du groupement acétamide (White *et al.*, 1997). Suite à l'hydrolyse du lien  $\beta(1\rightarrow4)$  par un résidu aspartique acide, une attaque nucléophile par l'oxygène du groupement acétyle par le côté  $\alpha$  du carbone anomérique permettrait de former un état transitoire avec un ion oxazolinium. Le résidu aspartique acide agirait ensuite comme base générale en activant une molécule d'eau qui viendrait attaquer le carbone anomérique par le côté équatorial ce qui rétablirait la position anomérique  $\beta$  initiale (figure 10B) (Brameld *et al.*, 1998b). L'étude biochimique de nombreuses GH-18 a aussi démontré leur capacité à effectuer la réaction inverse de transglycosylation. Cette caractéristique a

aussi été observée chez d'autres enzymes chitinolytiques à mécanisme de rétention comme certains lysozymes (Fukamizo, 2000). Cette activité est encore mal caractérisée, mais des études de mutagenèse sur le lysozyme du phage T4 ont permis de découvrir certaines pistes intéressantes. Les études biochimiques de cette enzyme ont permis d'identifier un mécanisme d'hydrolyse par inversion employant deux résidus aspartiques et n'ont pas détecté d'activité transglycosidique. Toutefois, la substitution d'une thréonine proximale aux résidus catalytiques par une histidine a permis d'obtenir une enzyme qui agissait par mécanisme de rétention et qui possédait une nouvelle activité transglycosidique similaire à ce qui est retrouvé chez les GH-18 (Kuroki *et al.*, 1999). Ainsi, il suffirait d'avoir un résidu nucléophile à proximité (<5 Å) de l'état transitoire et une orientation adéquate des autres résidus du sucre pour permettre une réaction de transglycosylation. Ces deux caractéristiques se retrouvent chez bon nombre de GH-18 ce qui expliquerait leur habileté à effectuer cette activité unique parmi les enzymes chitinolytiques (Fukamizo, 2000).

A



B

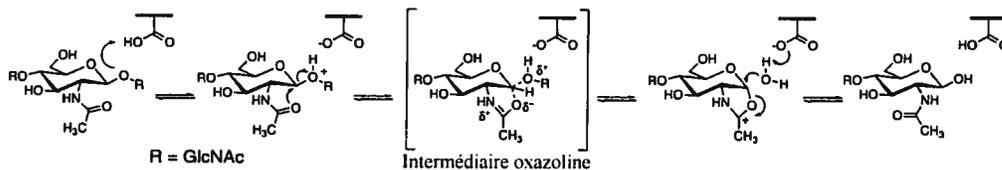


Figure 10. Inhibiteur et mécanisme d'hydrolyse des GH-18. A, structure de l'allosamidine, un puissant inhibiteur des GH-18. B, mécanisme d'hydrolyse de la chitine par rétention impliquant une double inversion du carbone anomérique. La structure intermédiaire ressemble beaucoup à la molécule d'allosamidine. Adapté de Brameld *et al.* (1998).

#### 1.4.2.2 La famille GH-19

La famille des GH-19 a consisté pendant longtemps uniquement de chitinases provenant de plantes supérieures (classes I et II). La chitinase ChiC de l'actinomycète *Streptomyces griseus* HUT6037 a été la première chitinase GH-19 d'origine bactérienne découverte. Les chitinases des familles GH-18 et GH-19 ont des structures et un mécanisme d'hydrolyse qui diffèrent complètement. Les GH-19 ont plutôt une structure riche en hélices  $\alpha$  et possèdent certains éléments similaires aux lysozymes et aux chitosanases (noyau catalytique commun mentionné précédemment) (Fukamizo, 2000). Les GH-19 emploient un mécanisme d'hydrolyse par simple inversion qui inverse l'isomère du carbone anomérique des liens  $\beta(1\rightarrow4)$  (figure 11). De par leur mécanisme différent des GH-18, les GH-19 sont d'ailleurs insensibles à l'allosamidine (Kawase *et al.*, 2006). Le mécanisme d'hydrolyse fait appel à deux résidus aspartiques spatialement éloignés l'un de l'autre. L'un des résidus agit comme acide général en donnant un lien hydrogène à l'oxygène du lien glycosidique menant à la formation d'un intermédiaire oxocarbonium avec l'enzyme. Le deuxième aspartate agit plutôt comme base générale et assure essentiellement deux rôles. Il permet de stabiliser l'ion carbonium formé et vient activer une molécule d'eau proximale. L'espacement entre les deux résidus serait nécessaire pour permettre une attaque nucléophile par la position  $\alpha$  menant à l'inversion de l'état isomérique du carbone anomérique. Chez les GH-19, la distance entre les deux résidus catalytiques est en moyenne de 9 à 11 Å (Fukamizo, 2000).

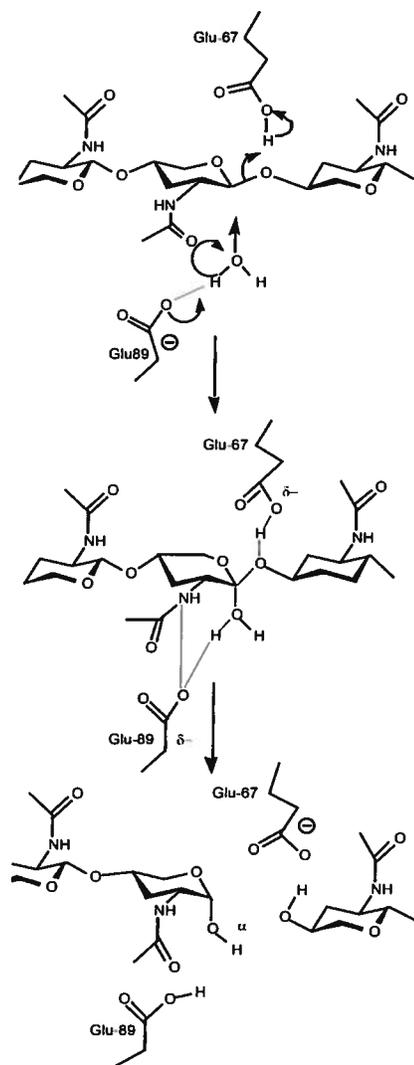


Figure 11. Mécanisme d'hydrolyse par simple inversion des GH-19. Le mécanisme présenté est celui de la chitinase d'orge commun. Le résidu acide (E67) protone l'oxygène du lien labile alors que l'autre résidu (E89) agit comme base générale et active une molécule d'eau proximale qui vient hydrolyser le lien par la position  $\alpha$  du carbone anomérique. Adapté de Fukamizo, (2000).

### 1.4.3 Les chitosanases

Les chitosanases (EC 3.2.1.132) sont des enzymes qui hydrolysent les liens  $\beta(1\rightarrow4)$  du chitosane, un polymère de D-glucosamine ( $\text{GlcNH}_2$ ) avec une proportion variable mais mineure de résidus acétylés. À l'état naturel, le chitosane est typiquement un hétéropolymère formé de quatre types de liens ;  $\text{GlcNH}_2\text{-GlcNH}_2$ ,

GlcNAc-GlcNAc, GlcNAc-GlcNH<sub>2</sub> et GlcNH<sub>2</sub>-GlcNAc (Fukamizo *et al.*, 1997). Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses classes d'enzymes soient capables de dégrader le chitosane, telles que des chitinases, lysozymes, cellulases, hémicellulases, protéases et même certaines lipases (Fukamizo *et al.*, 1997). Néanmoins, les chitosanases sont restreintes à une spécificité envers le chitosane et n'ont aucune activité envers la chitine même si certaines enzymes ont de l'affinité pour des polymères ayant des DA atteignant 60 % (Marcotte *et al.*, 1996). Le chitosane est relativement rare dans la nature par rapport à la chitine. Cependant, il est présent en quantité significative dans la paroi cellulaire des certains mycètes, notamment les *Zygomycètes*, des organismes pathogènes importants dans le domaine de l'agriculture (Marcotte *et al.*, 1996). Le chitosane provenant de mycètes n'est cependant pas déacétylé uniformément avec une distribution typiquement groupée des résidus acétylés (Fukamizo *et al.*, 1992). L'exposition de plantes à ces chitosanes provoque d'ailleurs une réponse immunitaire chez plusieurs plantes. Le rôle naturel des chitosanases serait donc principalement comme mécanisme de défense pour contrer les infections fongiques. Les chitosanases sont regroupées dans plusieurs familles des GH (5, 7, 8, 46, 75 et 80). Les chitosanases reconnaissent une grande diversité de substrats et ont toutes en commun la capacité d'hydrolyser les liens GlcNH<sub>2</sub>-GlcNH<sub>2</sub>. Certaines enzymes reconnaissent spécifiquement les liens GlcNAc-GlcNH<sub>2</sub> ou bien GlcNH<sub>2</sub>-GlcNAc, mais pas les deux. Les chitosanases peuvent être subdivisées en deux catégories. Les endo-chitosanases (EC 3.2.1.132) hydrolysent les polymères de chitosane pour produire des oligomères de longueur variable alors que les exo-chitosanases (EC 3.2.1.165) hydrolysent la libération de monomères de glucosamine à partir de l'extrémité non-réductrice d'oligomères ou de polymères de chitosane. La famille GH-46 est la mieux caractérisée avec la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174 et contient surtout des chitosanases d'origine procaryote dont bon nombre de chitosanases de streptomycètes (Henrissat *et al.*, 1996). Les enzymes de la famille 46 sont formées essentiellement d'hélices  $\alpha$  et procèdent par mécanisme d'inversion, deux similitudes qu'elles partagent avec les GH-19. Les GH-46 possèdent aussi un cœur invariable formé de deux hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  qui constituent le site de liaison du substrat, une structure aussi conservée parmi les chitinases de la famille GH-19 et les lysozymes (Monzingo *et al.*, 1996). La famille GH-75 a été formée à

partir de chitosanases de mycètes qui ne présentaient aucune homologie de séquence avec la famille 46 et ce, même si ces enzymes procèdent aussi par un mécanisme d'inversion. Par contre, la famille GH-80 contient des enzymes qui possèderaient au moins un motif catalytique homologue avec les GH-46 (Tremblay *et al.*, 2000). La famille GH-8 contient plusieurs enzymes de spécificités variables (cellulases, endoxylanases et licheninases). Quant à la famille GH-5, elle contient deux chitosanases (Chol et Choll) de l'organisme *S. griseus* HUT6037 capables d'hydrolyser le chitosane mais aussi la carboxyméthyle cellulose. De plus, ces enzymes sont aussi capables d'effectuer la transglycosylation des substrats en plus d'employer un mécanisme de rétention au niveau de l'hydrolyse, des propriétés similaires aux chitinases de la famille GH-18 (Tanabe *et al.*, 2003).

L'une des chitosanases la mieux étudiée est la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174. Cette enzyme a été découverte à partir d'un micro-organisme du sol d'une érablière du Québec après de laborieux efforts pour trouver des micro-organismes capables de dégrader le chitosane. L'enzyme est relativement versatile et est capable d'hydrolyser des substrats variant de 0 à 60 % d'acétylation avec une activité optimale pour les chitosanes faiblement acétylés (1-20 %) (Boucher *et al.*, 1992). Le patron d'hydrolyse est de type endo- avec une production principale de dimères et de trimères ainsi qu'une production secondaire de monomères. L'enzyme agit par un mécanisme d'inversion qui emploie deux résidus carboxyliques (Glu-22 et Asp-40) placés relativement loin l'un de l'autre avec 13,8 Å entre eux (Marcotte *et al.*, 1996). Le résidu Glu-22 agirait comme acide général grâce à un lien de coordination avec une arginine (Arg-205) conservée chez les GH-46 (Fukamizo *et al.*, 2000). Le résidu Glu-22 donnerait un lien hydrogène à l'oxygène du lien glycosidique alors que le résidu Asp-40 agirait comme base générale et activerait la molécule d'eau nucléophile qui viendrait attaquer le carbone anomérique. La structure tridimensionnelle de l'enzyme montre une forte prévalence d'hélices  $\alpha$  qui forment deux domaines globulaires, un arrangement similaire à ce qui est retrouvé chez le lysozyme du phage T4 malgré l'absence d'homologie de séquence. Au centre de l'enzyme se trouve un long sillon catalytique capable de lier des substrats polymériques avec six sous-sites de liaison (Marcotte *et al.*, 1996).

#### 1.4.4 Les lysozymes

Les lysozymes (EC 3.2.1.17) dégradent les liens  $\beta(1\rightarrow4)$  entre les résidus *N*-acétyl- glucosamine et les résidus d'acide *N*-acétyl-muramique des peptidoglycanes (Henrissat *et al.*, 2000). On retrouve des lysozymes chez pratiquement tous les êtres vivants et ils servent principalement comme moyen de défense contre les infections bactériennes chez les animaux et les plantes supérieures. On retrouve aussi des lysozymes chez les phages et les bactéries qui auraient aussi des fonctions défensives en plus de fonctions parasitaires. Tout comme les chitinases et les chitosanases, les lysozymes sont aussi regroupés dans plusieurs familles (GH-22, 23, 24, 25 et 108). Les lysozymes ont une structure homologue aux chitinases et chitosanases avec deux domaines globulaires au sein desquels se trouve un sillon catalytique capable de lier des substrats polymériques (Henrissat *et al.*, 1997). Ceci expliquerait en partie l'affinité relativement grande des lysozymes envers les substrats chitineux. Le lysozyme de blanc d'œuf de volaille (Hen Egg White Lysozyme ou HEWL, GH-22) a été la toute première protéine cristallisée et la résolution de sa structure tridimensionnelle a permis de découvrir six sous-sites de liaison au substrat (A, B, C, D, E et F) avec les résidus catalytiques situés proche des sites D et E (Strynadka *et al.*, 1996). Il a été démontré que le lien glycosidique situé entre les sites D et E est coupé par un mécanisme acido-basique impliquant deux carboxylates spatialement proches. De plus, une déformation du résidu glycosidique au site D a été observée, déformation qui permettrait la formation d'un ion carbonium essentiel pour l'hydrolyse, un mécanisme similaire à ce qui est observé chez les GH-18. En fait, il a été prouvé que l'état transitoire d'ion carbonium passe par une liaison covalente entre le substrat déformé et l'enzyme, un mécanisme permettant une stabilisation de l'état transitoire (Vocadlo *et al.*, 2001). Sans cette liaison covalente, la durée de vie de l'état transitoire ne serait pas assez longue pour permettre une attaque par un groupement nucléophile. La distance spatiale entre les deux résidus catalytiques s'est avérée être en moyenne autour de 4-5 Å, ce qui permet d'hydrolyser selon un mécanisme de rétention. Le mécanisme d'hydrolyse du HEWL pourrait d'ailleurs se décrire comme se situant à mi-chemin entre celui des GH-18 et des GH-19 (figure 12). Brièvement, un premier résidu carboxylate agit comme acide général et protone l'oxygène du lien

labile menant à la formation d'un intermédiaire oxocarbonium stabilisé par la proximité d'un second carboxylate via une liaison covalente entre l'oxygène du carboxylate et le C1 nucléophile du substrat (Vocadlo *et al.*, 2001). La distorsion du substrat est ce qui permet une telle interaction électrostatique entre l'enzyme et le substrat. Ensuite, le résidu acide agit comme base générale et active une molécule d'eau qui doit diffuser pour attaquer l'intermédiaire par le côté  $\beta$  du C1 permettant de conserver l'isomère original. Le positionnement du deuxième carboxylate permet aussi de protéger le côté  $\alpha$  de l'intermédiaire de l'attaque nucléophile de la molécule d'eau activée. Certaines études ont aussi montré que l'intermédiaire pouvait aussi être intercepté par un groupement glycoside en lieu de la molécule d'eau, ce qui donne un produit de transglycosylation, un phénomène aussi observé chez les GH-18 (Kuroki *et al.*, 1999). Néanmoins, l'étude de certains lysozymes a permis de mettre en lumière d'autres mécanismes d'hydrolyse présents chez les lysozymes. L'étude cristallographique du lysozyme de blanc d'œuf d'oie (Goose Egg White Lysozyme ou GEWL, GH-23) n'a pas permis d'identifier la présence d'un deuxième carboxylate à proximité du résidu catalytique acide. De plus, les produits libérés possédaient la forme  $\alpha$  du carbone anomérique confirmant l'utilisation d'un mécanisme d'inversion similaire aux GH-19 et aux GH-46. À partir des similarités de structure entre GEWL et la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174, deux carboxylates ont été identifiés comme étant potentiellement des résidus basiques capables d'activer une molécule d'eau. Ces résidus se trouvent relativement éloignés du résidu acide (11,2 Å dans les deux cas), une conformation retrouvée chez la plupart des enzymes chitinolytiques ayant un mécanisme d'inversion. Ainsi, les lysozymes présentent des structures et mécanismes similaires aux autres classes d'enzymes chitinolytiques malgré des spécificités de substrats relativement différentes et une absence d'homologie de structure primaire.



## **2. Manuscrit scientifique**

## 2.1 Manuscrit scientifique

La découverte fortuite d'une activité secondaire chez l'AxeA<sub>tr</sub> constitue un apport important de nouvelles connaissances au sujet des CE-4. Selon nos recherches, une telle découverte n'a encore jamais été mentionnée au sein de la communauté scientifique. Nous avons donc opté naturellement vers la rédaction d'un manuscrit scientifique afin de publier notre découverte. Un manuscrit a été soumis pour une publication dans le journal «Protein Science» en date du mois d'avril 2009 et est présentement en attente de révision par les pairs. La preuve de réception de la soumission dudit document est jointe en Annexe A.

### 2.1.1 Implication de l'étudiant

La quasi-totalité des travaux d'analyses biochimiques inclus dans le manuscrit soumis a été effectuée par Guillaume Brault sous la supervision de Claude Dupont (Ph.D.). Les étapes de clonage et de séquençage d'un mutant employé ont été effectuées dans le cadre d'une étude antérieure effectuée par Vladimir Puchart (Ph.D.) sous la supervision de Claude Dupont. Le manuscrit a été rédigé par Guillaume Brault et révisé par Claude Dupont et François Shareck (Ph.D.).

### 2.1.2 Attestation des co-auteurs

OBJET : Contribution des auteurs au manuscrit # PRO-09-0149 intitulé :  
« Deacetylation and cleavage of chitooligosaccharides by acetyl xylan  
esterase A of *Streptomyces lividans* »

La présente est pour confirmer que M. Guillaume Brault a effectué la totalité des analyses biochimiques et de la compilation des résultats présentés dans le manuscrit ci-haut mentionné. Ce travail a été fait sous ma supervision et celle de mon collègue, François Shareck. La souche bactérienne productrice de l'enzyme mutée AxeA<sub>tr</sub>-D130A a été obtenue suite à des travaux effectués antérieurement à l'INRS par M. Vladimir Puchart (Ph.D.). M. Brault a rédigé le manuscrit qui a été révisé par M. François Shareck et moi-même. Le manuscrit est présentement sous considérations pour publication par l'éditeur de la revue Protein Science.

**Claude Dupont, Ph.D.**  
Professeur  
**De:** Brault, Guillaume  
**Date:** mer. 2009-04-22 10:11  
**À:** Shareck, Francois; Dupont, Claude  
**Objet :** attestation des co-auteurs

Bonjour,  
j'aurais besoin de votre approbation ou désaccord à l'affirmation suivante:  
"La quasi-totalité des travaux d'analyses biochimiques inclus dans le manuscrit ont été effectués par Guillaume Brault sous la supervision de Claude Dupont (Ph.D.). Les étapes de clonage et de séquençage d'un mutant étudié ont été effectuées par Vladimir Puchart (Ph.D.) pour une étude antérieure. Le manuscrit a été rédigé par Guillaume Brault et révisé par Claude Dupont et François Shareck."

---

**De:** Shareck, Francois **Date:** mer. 2009-04-22 10:14  
**À:** Brault, Guillaume  
**Cc:**  
**Objet :** RE :

Salut,

tout est conforme

François

---

**Re:** Article AxeA  
Vladimir Puchart [chempuk@yahoo.com]  
**À:** Brault, Guillaume  
**Cc:**

Dear Guillaume,

I have no objection to the paragraph quoted below, you need to declare in your MSc thesis.

Best wishes,

Vladimir Puchart

--- On Wed, 4/22/09, Brault, Guillaume <Guillaume.Brault@iaf.inrs.ca> wrote:

From: Brault, Guillaume <Guillaume.Brault@iaf.inrs.ca>

Subject: Article AxeA

To: chempuk@yahoo.com

Date: Wednesday, April 22, 2009, 10:09 AM

Dear Mr. Puchart,

In order to publish the manuscript submitted to you previously by M. Dupont into my thesis for a master degree, I would need your acceptance to the following statement:

"Redaction of the following submitted article was done in major part by Mr. Guillaume Brault under the supervision of Mr. Claude Dupont. Most of the manipulations and data collection was also done by Mr. Brault except for cloning and sequencing steps of one mutant employed which were done by Mr. Vladimir Puchart for a previously published study. The manuscript submitted was also reviewed and approved by Mr. Dupont, Mr. Shareck and Mr. Puchart."

If you have any objections to the up-mentioned statement, please let me know so corrections could be done properly as soon as possible. Your acceptance can be transmitted simply by replying to this e-mail. I would like to thank you in advance for your cooperation,

Sincerely,

Guillaume Brault

### **2.1.3 Notes sur la présentation du manuscrit**

La version manuscrite ci-jointe présente le document soumis au journal *Protein Science*. Néanmoins, un remaniement a été effectué par soucis d'uniformité du présent mémoire. Les images ont été insérées au fil du texte afin d'en faciliter sa lecture. La numérotation des images et des tables a été harmonisée à celle du mémoire et la mise en page a été effectuée selon le patron du mémoire. De plus, les références ont été jumelées avec celles du mémoire de maîtrise afin d'en faciliter la consultation et d'éviter les répétitions. La version révisée n'étant pas disponible au moment du dépôt de mémoire, seule la version manuscrite soumise au journal est présentée.

#### 2.1.4 Résumé en français

Les chitinases et les chitine-déacétylases sont les enzymes-clé pour convertir la chitine en chitosanes, la forme déacétylée de la chitine, de laquelle découle de nombreuses applications. Des études antérieures ont montrées que l'acétyl-xylane estérase A de *Streptomyces lividans* (AxeA) (EC 3.1.1.72) était assez versatile pour déacétyler partiellement des chitooligosaccharides. L'AxeA appartient à la famille 4 des carbohydrates estérases (CE-4) qui comprend des enzymes de spécificités différentes mais des structures relativement homologues. Afin de mieux comprendre cette activité secondaire, des essais de déacétylation d'oligomères de chitine ont été analysés par HPLC. Cette technique a permis d'identifier une activité glycosidique inattendue. L'enzyme sauvage a été capable d'hydrolyser jusqu'à 90% du chitohexaose disponible en 96h. La libération initiale en quantités égales de chitotriose, chitobiose et chitotetraose suggère un mode d'action de type «endo-». L'AxeA n'a pas démontré d'activité envers d'autres substrats oligomériques tels que le celohexaose, xylohexaose et des oligomères de chitosane complètement déacétylés ce qui suggère qu'il s'agit d'une activité chitinolytique. Selon nos connaissances, ceci constitue le premier rapport d'une activité glycosidique parmi les CE-4 et cette découverte pourrait apporter de nouveaux outils pour la production spécifique d'oligomères de chitosane.

## 2.1.5 Title page

Full article title: Deacetylation and cleavage of chitooligosaccharides by acetyl xylan esterase A of *Streptomyces lividans*.

Author's names: Guillaume Brault<sup>1</sup>, Vladimir Puchart<sup>1,3</sup>, François Shareck<sup>1</sup>, Claude Dupont<sup>1\*</sup>.

Affiliations:

<sup>1</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, 531 boul des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

<sup>(3)</sup> Present address: Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-846 38 Bratislava 45, Slovakia.

\*Corresponding author:

Claude Dupont, 531 boul des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Phone: 450 687 5010

FAX: 450 686 5501

Email: [claudedupont@iaf.inrs.ca](mailto:claudedupont@iaf.inrs.ca)

Running title: Chitin deacetylation and cleavage by the AxeA<sub>tr</sub>.

### 2.1.6 Abstract

Chitinases and chitin deacetylases are the key enzymes for converting chitin into chitosan, the *N*-deacetylated form of chitin, for which many applications are constantly being developed. Previous studies showed that the acetyl xylan esterase A (EC 3.1.1.72) from the actinomycete *Streptomyces lividans* (AxeA) had broad enough specificity to partially deacetylate chitooligosaccharides. The AxeA belongs to the carbohydrate esterase family 4 (CE-4) which contains enzymes of various specificities but with very similar structures of their catalytic domains. HPLC analysis of deacetylation products allowed the detection of an unexpected glycolytic activity toward chitin oligomers. The native enzyme was able to hydrolyze up to 90% of (GlcNAc)<sub>6</sub> after 96h of incubation with an initial equal production of (GlcNAc)<sub>4</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> and (GlcNAc)<sub>2</sub>, therefore suggesting an endo-type activity. The AxeA was unable to hydrolyze other oligomeric substrates such as cellohexaose, xylohexaose or fully deacetylated chitosan oligomers suggesting that the glycosyl hydrolase activity is specifically a chitinase one. Besides being the first report to our knowledge of a glycosyl hydrolase activity among the CE-4 family, this finding could provide new insights for developing a practical and environmentally friendly method for production of specific chitosan oligomers.

**Keywords:** Chitin, chitinase, deacetylase, chitosan, acetyl xylan esterase

#### **General statement:**

We report a novel chitinolytic activity for the *Streptomyces lividans* AxeA, an enzyme known previously to be able to deacetylate chitin. The discovery of that second activity on chitin substrate made that enzyme a unique one within its family. This dual activity will allow the use of AxeA as a template for the development of single step enzymatic production of chitin and chitosan oligomers.

### 2.1.7 Introduction

Chitin, a  $\beta$ -(1,4) linked polymer of *N*-acetyl D-glucosamine (GlcNAc), is one of the most abundant natural polymers after cellulose (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998; Schrempf, 2001). Its main distribution is as a major structural constituent of fungal cell walls, insect exoskeletons, and the outer shells of crustaceans. Chitin has applications in numerous diverse fields including the food, chemical, pharmaceutical, biomedical and biochemical industries. Its chitosan derivatives are known to have antimicrobial, antitumor and hypocholesterolaemic activities, while related materials are used in wastewater treatment and in diverse areas such as drug delivery and wound healing (Tharanathan *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2008).

Chitinases, which hydrolyze the  $\beta$ -linkage of the polymer, are key enzymes in the natural processing of this material. They occur in a wide range of organisms including viruses, bacteria, fungi, insects, higher plants and animals. Their roles are as diverse as their sources (reviewed in (Tronsmo *et al.*, 1993). Chitinases can be classified into two major categories according to their hydrolytic functions: first, endochitinases (EC 3.2.1.14), which cleave the chitin polymer randomly to give soluble low molecular mass oligomers such as chitotetraose and chitotriose (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998 ), and secondly, exochitinases (EC 3.2.1.29) (including chitobiosidases) which catalyze the progressive release of chitobiose from the non-reducing end of the polymer microfibril. The latter category includes *N*-acetyl glucosaminidases (EC 3.2.1.30), which releases *N*-acetyl glucosamine monomers from the oligomers produced by the endochitinases and chitobiosidases, and are necessary to obtain complete hydrolysis of the polymer (Tronsmo *et al.*, 1993). Another but non negligible pathway of chitin degradation is through deacetylation by deacetylases to yield chitosan which is then cleaved into oligomers by chitosanases (EC 3.2.1.132) (Howard *et al.*, 2003).

Based on their primary structures, chitinases are grouped into two glycosyl hydrolases (GH) families: GH-18 and GH-19 (Henrissat *et al.*, 1996; Dahiya *et al.*, 2006). GH-18 enzymes are very diverse in evolutionary terms but retain a typical

( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> fold structure of their catalytic domain and employ a double displacement cleavage mechanism where the initial configuration of the scissile bond is retained by the newly generated reducing end (Davies *et al.*, 1995). GH-18 enzymes contain the conserved catalytic motif DXDXE in their primary structure (Andersen *et al.*, 2005; Hoell *et al.*, 2005) and hydrolyze through a substrate-assisted mechanism with participation of the pyranose adjacent acetamido group (Tronsmo *et al.*, 1993). Such anchimeric assistance is further confirmed by the studies of well-known GH-18 inhibitors such as allosamidine, a pseudo-trisaccharide of whose structure represents the oxazolinium intermediate state of chitin cleavage (Brameld *et al.*, 1998b; Andersen *et al.*, 2005).

It was thought GH-19 family consisted of only plant chitinases until the discovery of the *Streptomyces griseus* HUT6037 ChiC (PDB accession code 1WVU) (Kezuka *et al.*, 2006). This was the first GH-19 enzyme found elsewhere than in a higher plant (Ohno *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1999). There are no sequence homologies between family GH-18 and GH-19 and their tridimensional structures are completely different. GH-19 enzymes present a rather high  $\alpha$ -helical content and some core structures similar to chitosanases and lysozymes (Hart *et al.*, 1995; Monzingo *et al.*, 1996; Robertus *et al.*, 1998). GH-19 chitinases are characterized by the presence of two aspartic residues generally 10-11 Å spatially apart and contain the conserved catalytic motif HETX<sub>n</sub>GX<sub>n</sub>E (Hoell *et al.*, 2006). Furthermore, family GH-19 chitinases employ a single displacement cleavage mechanism that yield a product with a reducing end of inverted configuration compared to the bond hydrolysed (Fukamizo, 2000).

Among organisms containing many chitinases, streptomycetes are well known for their ability to exploit the different nutrient sources available in the soil and are thus considered the main decomposers of soil chitin (Saito *et al.*, 2001). Fortunately, the genome of *Streptomyces* representative specie, *S. coelicolor*, had been sequenced in 2002 by Bentley and co-workers (Bentley *et al.*, 2002). The *S. coelicolor* genome showed a wide diversity in chitinases, with nine genes of family GH-18 (*chiA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *H*, *sco1444*, *sco2799*, *sco7263*) and 2 genes for family GH-19 (*chiF* and *chiG*)

(Saito *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2000). Many other streptomycetes species also contain known chitinases (reviewed in (Saito *et al.*, 2003). Gene duplication of a common ancestor would explain this wide diversity of chitinases among *Streptomyces*. In addition to the expression of many chitinase genes, streptomycetes possess many other chitin-degrading enzymes such as chitosanases and putative lysozymes (Fukamizo *et al.*, 1997; Bentley *et al.*, 2002; Tanabe *et al.*, 2003). Certain species, such as *S. lividans*, even possess a carbohydrate esterase that has specificity broad enough to be able to transform chitin into its chitosan counterpart.

*S. lividans* acetyl xylan esterase A (AxeA) (EC 3.1.1.72) is a deacetylase that cleaves either *O*- or *N*-acetyl moieties found on glycosyl polymers. Based on its primary structure, the catalytic domain of AxeA (AxeA<sub>tr</sub>) was classified as a member of Carbohydrate Esterase family 4 (CE-4) (Shareck *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 2005). CE-4 family is notable for its size with more than 2300 known open reading frames assigned to date (April 2009). This family of deacetylases shows a wide variety of activities such as acetyl xylan esterase (EC 3.1.1.72), chitin deacetylase (EC 3.5.1.41), peptidoglycan *N*-acetyl glucosamine deacetylase (EC 3.1.1.-) and NodB chitooligosaccharide deacetylase (EC 3.5.1.-) (Caufrier *et al.*, 2003). Eleven different CE-4 proteins have their tridimensional structures resolved to date. All CE-4 topologies analysed show a greatly distorted ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> structure among which one can find a shallow and relatively large catalytic cleft capable of binding multimeric substrates (Blair *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). This cleft contains a conserved metal-binding site in which a divalent metal ion is coordinated in a distorted octahedral fashion similar to zinc-dependant hydrolases (reviewed in (Hernick *et al.*, 2005). All CE-4 also bear a catalytic triad His-Asp-Asp, which distinguishes them as being aspartic carbohydrate esterases rather than the more encountered serine esterases (Taylor *et al.*, 2006).

The tridimensional structure of the AxeA<sub>tr</sub> (PDB 2CC0) was obtained in 2006 by Taylor and co-workers (Taylor *et al.*, 2006). In terms of substrate specificity, studies showed affinities toward acetylated methyl xylanopyranosides, chitin, *N*-acetyl-glucosamine oligomers and to a lesser extent, cellulose acetate oligomers

(Biely *et al.*, 1996; Dupont *et al.*, 1996; Caufrier *et al.*, 2003; Morley *et al.*, 2006). Morley and co-workers showed that the  $AxeA_{tr}$  was able to partially deacetylate chitin oligosaccharides and suggested the use of this secondary activity as a potential improvement to alkali-based chitosan production. Nevertheless, yields were relatively low compared to the primary acetyl xylan esterase activity and thus prostrate industrial applications (Morley *et al.*, 2006). In an attempt to understand the implicated mechanism and possibly improve this enzyme activity, mutants of the  $AxeA_{tr}$  were produced from a rational starting point by comparing the tridimensional structure of various CE-4 of various specificities. While studying these mutants for their specificity toward *N*-acetyl glucosamine oligomers, we discovered an unexpected glycosyl hydrolase (GH) activity. Besides being the first report to our knowledge of a dual activity (deacetylase and glycosidase) of a CE-4, this discovery could provide new insights for developing a practical and environmentally friendly method for production of specific chitosan oligomers.

### 2.1.8 Results

**Expression of wild type  $AxeA_{tr}$  and its mutant in *S. lividans*** - The *S. lividans*  $AxeA_{tr}$  was produced in conical flasks with minimal medium containing xylose as sole source of carbon. Under these conditions, the native  $AxeA_{tr}$  and the  $AxeA_{tr}$ -D130A enzymes were over-produced with an expression yield in the range of 300-350 mg/L of secreted enzyme after 72h of incubation. The molecular weights of these recombinant enzymes were almost identical and estimated at 23 kDa, which is consistent with the calculated weight of the truncated form (20.6 kDa). Visual analysis by SDS-PAGE of the secreted  $AxeA_{tr}$  showed that it was already 85-90% pure as the *S. lividans* expression system in minimal media leads to the secretion of very few other proteins. Nevertheless, concentration of the supernatant by ultrafiltration showed the presence of other minor proteins that were removed by anionic chromatography. Still, two protein bands (around 40 kDa and 60 kDa) were visible when the SDS-PAGE was silver stained. These proteins were removed by HPLC size exclusion chromatography in a single pass yielding homogeneity (Fig. 13).

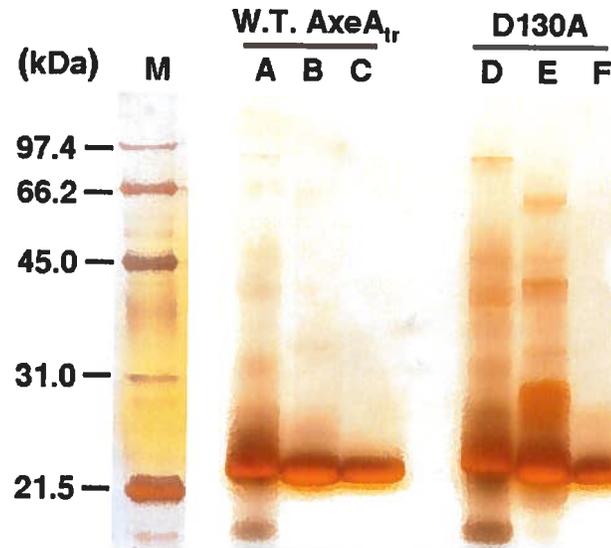


Figure 13. Purity of *S. lividans*  $AxeA_{tr}$  and the  $AxeA_{tr}$ -D130A mutated enzyme. The equivalent of 10  $\mu$ g of total proteins were loaded in each lane. M. Bio-Rad molecular weight standard Low Range (500 ng). A.  $AxeA_{tr}$  expression supernatant. B.  $AxeA_{tr}$  first step purification (ionic exchange chromatography). C.  $AxeA_{tr}$  purified to homogeneity by size exclusion chromatography. D.  $AxeA_{tr}$ -D130A supernatant. E.  $AxeA_{tr}$ -D130A first step purification (ionic exchange chromatography) . F.  $AxeA_{tr}$ -D130A purified to homogeneity by size exclusion chromatography.

**Wild type  $AxeA_{tr}$  specificity on chitooligosaccharides** - In order to characterize the specificity of the  $AxeA_{tr}$  towards chitooligosaccharides, the purified enzyme was incubated with various soluble oligomers under known optimal conditions (Dupont *et al.*, 1996). Analysis of the released products by HPLC showed, besides the expected acetate peak, the presence of various unexpected other signals corresponding exactly to the retention times of known  $(GlcNAc)_n$  standards (Fig. 14). The intensity of these signals was increasing with incubation time as the initial substrate one was decreasing. The release of acetate also increased with time but not to a level sufficient to explain the substrate disappearance rate.

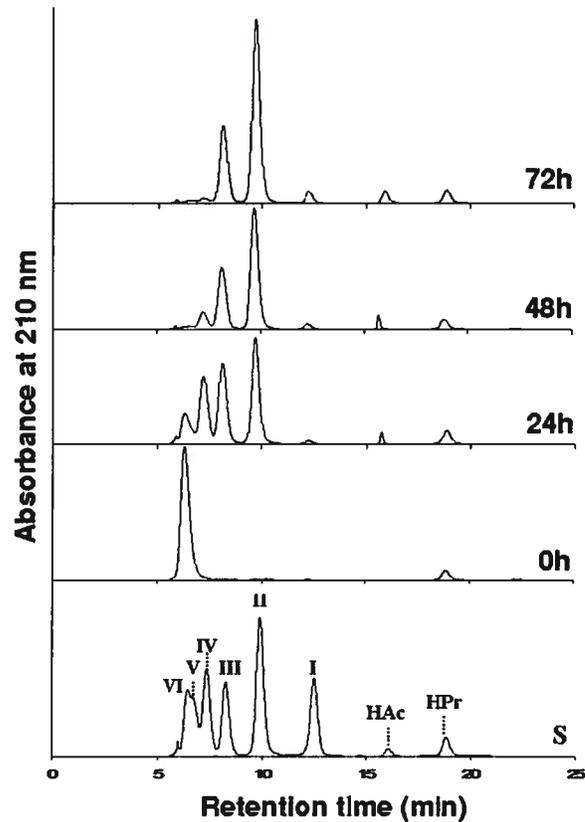


Figure 14. HPLC analysis of the deacetylation and hydrolysis products of  $(\text{GlcNAc})_6$  by the  $\text{AxeA}_{\text{tr}}$ . S. Retention times of known chitooligosaccharides standards; VI,  $(\text{GlcNAc})_6$ , V,  $(\text{GlcNAc})_5$ , IV,  $(\text{GlcNAc})_4$ , III,  $(\text{GlcNAc})_3$ , II,  $(\text{GlcNAc})_2$  and I,  $(\text{GlcNAc})$ . HAc represents liberated acetic acid and HPr represents propionic acid added as a normalisation standard. Other curves represent products released at the indicated incubation times.

Time-course analysis of this GH activity towards  $(\text{GlcNAc})_6$  showed that the  $\text{AxeA}_{\text{tr}}$  gave  $(\text{GlcNAc})_2 > (\text{GlcNAc})_3 \geq (\text{GlcNAc})_4$  after 24h of reaction (Fig. 15A). This pattern was conserved until the 48<sup>th</sup> hour of incubation after which the hexamer level (about 30%) seems to be too low to cope with newly formed  $(\text{GlcNAc})_4$  who was hydrolysed into two molecules of  $(\text{GlcNAc})_2$ , while the  $(\text{GlcNAc})_3$  product did not fluctuate. After 72 hours of incubation, the  $(\text{GlcNAc})_3$  level started to diminish as it was slowly converted into  $(\text{GlcNAc})_2$  and  $(\text{GlcNAc})$ . No pentamer was generated from  $\text{GlcNAc}_6$  hydrolysis even after 96 hours at which time there was still about 9% of the original substrate left. Incubation with  $(\text{GlcNAc})_5$  showed also the same initial

cleavage pattern with production of equal amounts of (GlcNAc)<sub>2</sub> and (GlcNAc)<sub>3</sub> and a specific activity similar to the one measured with (GlcNAc)<sub>6</sub> substrate. Cleavage of (GlcNAc)<sub>4</sub> produced almost exclusively (GlcNAc)<sub>2</sub> products in a linear fashion with a very small production of (GlcNAc)<sub>3</sub>. Hydrolysis of (GlcNAc)<sub>3</sub> gave exclusively dimer and monomer species with a very slow conversion yield of only 30% after 96 hours of incubation, while (GlcNAc)<sub>2</sub> was barely hydrolyzed. Specific activities measured show almost equal value for (GlcNAc)<sub>6</sub> and (GlcNAc)<sub>5</sub> substrates but decreased with diminishing degree of polymerisation (DP) of the substrate with almost no activity toward (GlcNAc)<sub>2</sub> (Table 3). Finally, no transglycosylase activity was observed with all the substrates employed.

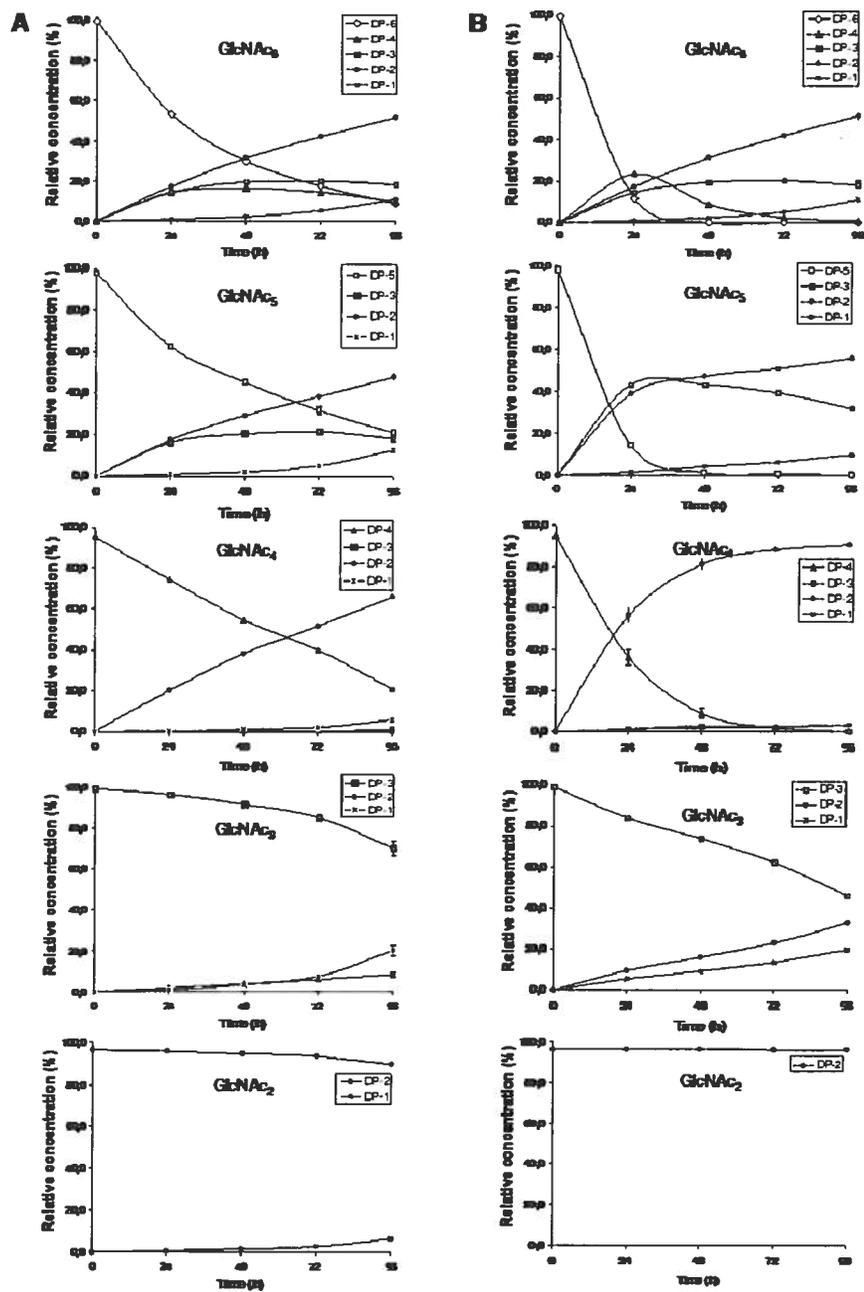


Figure 15. Time-course hydrolysis of various chitin oligomers by the  $AxeA_{1r}$  and the  $AxeA_{1r}$ -D130A. Enzymes were incubated with  $(GlcNAc)_n$  oligomers ( $n=6$  to  $2$ ). A. Hydrolysis products generated by  $AxeA_{1r}$ . B. Hydrolysis products generated by  $AxeA_{1r}$ -D130A.

Table 3. AxeA<sub>tr</sub> specific activities toward chitooligosaccharides.

Substrate	Deacetylase activity IU/mg	Glycosyl hydrolase activity IU/mg
(GlcNAc) <sub>6</sub>	0.068	0.026
(GlcNAc) <sub>5</sub>	0.050	0.024
(GlcNAc) <sub>4</sub>	0.051	0.017
(GlcNAc) <sub>3</sub>	0.049	0.007 ± 0.001 <sup>a</sup>
(GlcNAc) <sub>2</sub>	0.042	0.002
(GlcNAc)	n/d <sup>b</sup>	n/a <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Standard error was less than 4% unless specified.

<sup>b</sup>n/d: Activity not detectable.

<sup>c</sup>n/a: Activity not applicable.

**Influence of mutations on enzyme activity** – The initial goal of the study was to investigate the specificity of the AxeA<sub>tr</sub> towards soluble chitooligosaccharides, but the discovery of the glycosidase activity required further investigation as the AxeA<sub>tr</sub> has no known homology to any catalytic domain of GH enzymes (Puchart *et al.*, 2006). Since the AxeA<sub>tr</sub>-D130A mutant showed a strong GH activity with a complete loss of the deacetylase activity (Table 4), this mutant was selected for further characterization of the GH activity with the various oligomers substrates previously employed with the native AxeA<sub>tr</sub>. Cleavage pattern of the various chitooligosaccharides was essentially the same as for the AxeA<sub>tr</sub> with initial production of (GlcNAc)<sub>2</sub>>(GlcNAc)<sub>3</sub>≥(GlcNAc)<sub>4</sub> from the substrate (GlcNAc)<sub>6</sub> in an endo-splitting manner (Fig. 15B). Differences were noted though in the hydrolysis speed with consumption of all of the initial substrate between 24 and 48 hours of incubation compared to less than 50% for the AxeA<sub>tr</sub>. Hydrolysis of the other substrates followed the same cleavage pattern as for the AxeA<sub>tr</sub> but was also more rapid. To further characterize this GH activity, the native AxeA<sub>tr</sub> and the AxeA<sub>tr</sub>-D130A enzymes were incubated in the same conditions as mentioned previously with adjunction of 1 mM of EDTA. Addition of the chelator to the reaction mixture completely inhibited the deacetylase activity of the AxeA<sub>tr</sub> but did not significantly affect the chitinase activity of either enzyme (Table 4).

Table 4. Specific activities of the AxeA<sub>tr</sub> and the mutated AxeA<sub>tr</sub>-D130A in presence or absence of metal cofactor.

Type of activity	Specific activity <sup>a</sup>			
	AxeA <sub>tr</sub>		AxeA <sub>tr</sub> -D130A	
	1 mM Co <sup>2+</sup>	1 mM EDTA	1 mM Co <sup>2+</sup>	1 mM EDTA
Deacetylase U <sup>b</sup>	45.1 ± 3.5	0.0	0.0	0.0
Chitinase U <sup>c</sup>	25.0 ± 3.5	19.7 ± 0.5	41.1	39.5 ± 2.9

<sup>a</sup> Enzymatic assays were performed with (GlcNAc)<sub>6</sub> under the conditions described in the Materials and methods section.

<sup>b</sup> U = μmol/min of liberated acetate per μmol of enzyme .

<sup>c</sup> U = μmol/min of initial substrate consumed per μmol of enzyme .

**Hydrolysis of other substrates** --To determine if the GH activity was specific toward amino sugar substrates, native AxeA<sub>tr</sub> and AxeA<sub>tr</sub>-D130A enzymes were incubated with chitosan hexamer (GlcNH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>. Assays with the fully deacetylated hexamer did not show any hydrolase activity even after 96 hours of incubation. Other substrates known to be deacetylated by the AxeA<sub>tr</sub> were also tested to assess possible hydrolase activity. Xylohexaose and cellobiohexaose were incubated with both enzymes under the same conditions and refractive index analysis showed no measurable hydrolysis (Table 5). Carboxymethyl cellulose, peptidoglycans and cellulose acetate were not deacetylated nor hydrolysed by the native and the mutated enzyme. The only observable activity was toward chitin polymers. Hydrolysis of crab shell chitin and glycol chitin-80 was observed but activities measured were more than 10 fold less than with (GlcNAc)<sub>6</sub> (Table 5). The only detectable products released from those substrates were the fully acetylated dimer (GlcNAc)<sub>2</sub> and to a lesser extent the (GlcNAc)<sub>3</sub> product.

Table 5. Specific activities of the AxeA<sub>ir</sub> and the AxeA<sub>ir</sub>-D130A mutant toward various polymeric substrates.

Substrate	Solubility	Specific activity		
		AxeA <sub>ir</sub>		AxeA <sub>ir</sub> -D130A
		Deacetylase (IU/mg)	Glycosyl hydrolase (IU/mg)	Glycosyl hydrolase (IU/mg)
<i>B. subtilis</i> peptidoglycan	N	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
<i>Streptomyces sp.</i> peptidoglycan	N	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Crab shell chitin	N	0.011	n/d <sup>a</sup>	0.003
Glycol chitin-80	Y	0.014	n/d <sup>a</sup>	0.001
Chitosan-24	Y	0.007	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Chitosan hexamer	Y	n/a <sup>b</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Cellulose acetate	N	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Carboxymethyl cellulose	Y	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Cellohexaose	Y	n/a <sup>b</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Xylohexaose	Y	n/a <sup>b</sup>	n/d <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>

n/d = activity not detectable

n/a = activity not applicable

**Cleavage pattern of the enzyme** – At equilibrium, the ratio between the  $\alpha$  and the  $\beta$  anomeric forms of chitoooligosaccharides is approximately 60:40 (Horn *et al.*, 2006; Krokeide *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2008). In order to get more insight into the type of chitinase activity observed from the mutated enzyme, degradation reactions were done with an excess of enzyme towards substrate (GlcNAc)<sub>6</sub>. The major products from the hydrolysis of chitohexaose were, as expected, (GlcNAc)<sub>4</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> and (GlcNAc)<sub>2</sub> with initial  $\alpha/\beta$  anomer ratios after 10 minutes of reaction of 75:25, 74:26 and 69:31, respectively. The trimer and tetramer ratios showed a clear predominance of the  $\alpha$  form suggesting an inverting mechanism while the dimer ratio was closer to equilibrium. These ratios remained in favour of the  $\alpha$  form until the 30<sup>th</sup> minute of incubation after which they decline to reach the normal equilibrium at 120 minutes due to spontaneous mutarotation (Fig. 16). To determine whether the release of chitobiose happened from the reducing end, 4-nitrophenyl-*N,N'*-acetyl chitobiose ((GlcNAc)<sub>2</sub>-pNP) was employed as a chitin trimer analog. Assay analyses did not show any detectable degradation products suggesting unproductive binding of this chitotriose analog. On the other hand, assays with ((GlcNAc)<sub>3</sub>-pNP) substrate

(tetramer analog) did yield production of  $(\text{GlcNAc})_2$  and  $((\text{GlcNAc})-p\text{NP})$  as expected. A very small but significant amount of  $(\text{GlcNAc})_3$  and  $p\text{NP}$  was also detected suggesting two potential binding modes for this substrate.

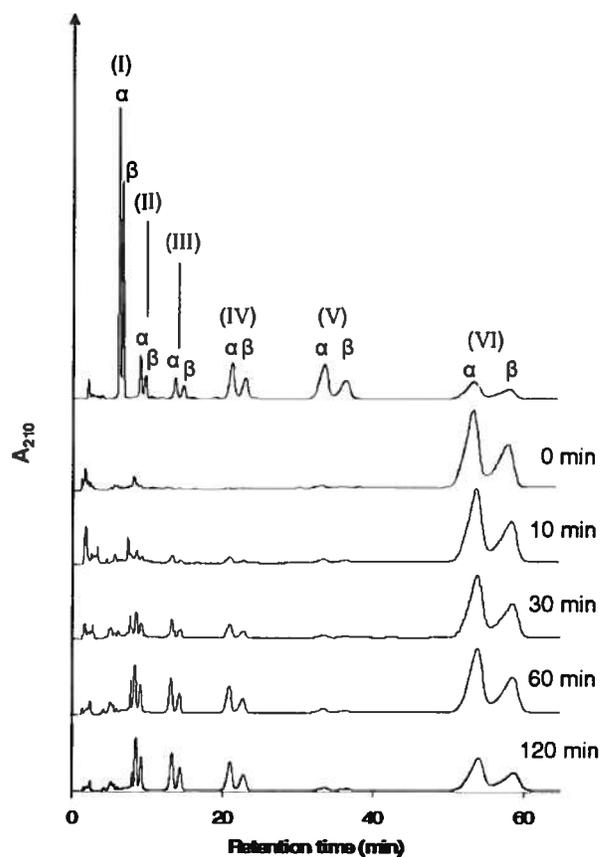


Figure 16. Time-course analysis of anomeric species of chitinase activity of  $\text{AxeA}_{\text{I}}\text{-D130A}$ . with chitohexaose. Product species with respect to time are represented with comparison to chitooligosaccharides standards.

### 2.1.9 Discussion

While assaying the  $\text{AxeA}_{\text{I}}$  for its specificity toward chitooligosaccharides, HPLC analysis showed the unexpected presence of smaller acetylated oligomers. These products were increasing in concentration as the initial substrate was disappearing. Acetate levels measured were similar to previous reports (Morley *et al.*, 2006; Puchart *et al.*, 2006) but were not high enough to explain the rapid decrease of hexamer, thus indicating its hydrolysis into smaller oligomers. The detection

technique previously employed for characterization of the  $AxeA_{tr}$  deacetylase activity could not highlight the production of oligomers since the quantification of released acetate was based on a second enzyme-linked conversion (Morley *et al.*, 2006; Nisole *et al.*, 2006). Therefore, the HPLC technique used here is a more efficient approach for the characterization of CDA activity as it provides visualization and quantification of deacetylation and oligomers hydrolysis at once (Krokeide *et al.*, 2007). Albeit *S. lividans* is known to express many chitinases, electrophoresis analysis with concentrated enzyme confirmed the homogeneity of the enzymes employed for assays. Furthermore, numerous reports had shown that chitinases expression in *S. lividans* was triggered by presence of chitinous substrates (Nguyen *et al.*, 1997; Miyashita *et al.*, 2000) and we expressed our clones into minimal media with xylose as sole carbon source. These results indicated a clear GH activity of the enzyme toward chitooligosaccharides with simultaneous deacetylation.

The  $AxeA_{tr}$  showed an almost equal tendency to produce  $(GlcNAc)_4$ ,  $(GlcNAc)_3$  and  $(GlcNAc)_2$  out of the hexamer (Fig. 15A). Incubation with smaller DP oligomers showed the same pattern leading to final production of the dimer. These results clearly suggest an endo-type of GH activity as the hexameric substrate is cleaved into DP-4, DP-3 and DP-2 in near equal proportions at early reaction stages (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998). Assays with polymeric chitin also confirmed the endo-type of activity with release of chitobiose and chitotriose. The weak activities measured with *p*NP-labelled substrates were in accordance with previous reports of the very slow deacetylase activity of the  $AxeA_{tr}$  toward *p*NP-labelled substrates (Biely *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Biely *et al.*, 2007). Studies with other CE-4 have shown that a subsite corresponding to the *p*NP group positioning had the most influence on the free binding energy with strong recognition of the glucosamine moiety whether it is acetylated or not (Hekmat *et al.*, 2003). This hydrophobic stacking of the sugar moiety could explain the low affinity for *p*NP groups at the reducing end. Albeit results with  $(GlcNAc)_3$ -*p*NP cannot allow conclusions on whether cleavage happens from the reducing end or not, detection of chitobiose, and to a lesser extent chitotriose, confirms two substrates binding modes for the chitinase activity. Anomeric species studies showed that cleavage happens from the sugar

reducing end as the ratio of (GlcNAc)<sub>4</sub> produced out of (GlcNAc)<sub>6</sub> favoured the  $\alpha$  form. Furthermore, (GlcNAc)<sub>2</sub> released from this cleavage had an anomeric ratio closer to the equilibrium state of the reducing end of the hexamer substrate.

Screening of various clones revealed that the Ax<sub>e</sub>A<sub>ir</sub>-D130A completely lost its deacetylase activity while it kept its capacity to hydrolyze chitin oligomers (Table 4). The cleavage pattern was the same as the native Ax<sub>e</sub>A<sub>ir</sub> with main production of trimer and dimer, but more rapidly with complete degradation of the initial substrate between 24 and 48 hours of incubation (Fig. 15B). Sequence alignment of the Ax<sub>e</sub>A<sub>ir</sub> primary structure with various *Streptomyces* GH-18, GH-19 and GH-46 did not show any significant homology allowing the identification of implicated catalytic residues that could explain such behaviour (data not shown). However, residue D130 is conserved among CE-4 enzymes and is known to tether a catalytic histidine that act as a general acid involved in the release of the acetyl moiety (Blair *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). Thus, removal of this carboxylate essential for the deacetylase activity doubled the GH activity, indicating that the loss of that coordination network would allow the enzyme to perform exclusively with more efficient hydrolysis of the oligomeric substrates.

CE-4 enzymes are considered metal-dependant enzymes (Taylor *et al.*, 2006). Chelation of Co<sup>2+</sup> ligands by the addition of EDTA completely inhibited the deacetylase activity of the Ax<sub>e</sub>A<sub>ir</sub> but did not affect significantly its hydrolytic activity (Table 4). This confirms that the GH activity observed does not need metal ion assistance that is in agreement with general studies on chitinases and chitosanases, which does not recognize them as metal dependant hydrolases (Davies *et al.*, 1995; Fukamizo, 2000). However, Biely and co-workers reported that the free 3-hydroxyl group of the sugar residue actually makes a hydrogen bond with the metal ligand of CE-4 enzymes and was essential for productive substrate positioning allowing the chitin deacetylase activity (Biely *et al.*, 2007). It is thus possible to consider a substrate positioning that would favour in the esterase activity rather than the glycosidase activity. Albeit depletion of the co-factor was sufficient to prevent deacetylation, it did not improve hydrolysis activity to confirm this hypothesis.

Early stage analysis showed that the presence of liberated acetate and substrate cleavage happened both from the beginning of the incubation but did not allow perceiving if the enzyme deacetylated first and then cleaved, which would give a chitosanase activity, or if it cleaved first and then deacetylated, which would mean it is a chitinase. Nevertheless, the ability to hydrolyze fully acetylated oligomers by the  $AxeA_{tr}$ -D130A enzyme indicated that the  $AxeA_{tr}$  acts as a chitinase. Furthermore, incubation with chitosan hexamer and chitosan-24 (24% acetylated) did not generate any hydrolysis product. On the other hand, crab shell chitin and glycol chitin-80 (80% acetylated) were hydrolyzed in a way similar to what was observed with chitin oligomers. This confirms the chitinase character of the  $AxeA_{tr}$  rather than being a chitosanase, which would obviously be more compatible with its chitin deacetylase activity.

Assays done with non-acetylated oligomeric  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) substrates such as gluco- and xylo- hexamers showed that both the native and the mutated enzymes had absolutely no activity toward these substrates. This is in agreement with previous reports also showed that the  $AxeA_{tr}$  had absolutely no xylanolytic activity (Dupont *et al.*, 1996). The inability to cleave these substrates suggests that the presence of an acetylated moiety is essential for substrate binding as reported for many chitinases and deacetylases (Blair *et al.*, 2006). Neither the native  $AxeA_{tr}$  nor  $AxeA_{tr}$ -D130A enzymes showed the ability to cleave *O*-acetylated cellulose-acetate either, which suggests that both the amido and acetyl groups are necessary. The absence of the  $AxeA_{tr}$  deacetylase activity on cell wall peptidoglycan has been reported previously and was believed to be due to the high hydrophobicity of the substrate (Caufrier *et al.*, 2003). However, the ability of  $AxeA_{tr}$  to degrade insoluble crab shell chitin suggests that the hydrophobic nature is not the limiting aspect but rather than the bulkiness of the crossed-linked peptidoglycan backbone.

### 2.1.10 Conclusion

Acetyl xylan esterase A of *S. lividans* is an enzyme capable of removing *O*- and *N*- acetyl moieties from substrates. We have shown that *S. lividans*  $AxeA_{tr}$  can

effectively deacetylate and hydrolyze oligomeric chitinous substrates. Early-stage analysis showed that the two reactions occur simultaneously but the deacetylase activity is metal dependant while the GH activity is not. Assays with various substrates showed that the GH activity is specific to *N*-acetyl substrates and hydrolysis experiments using the deacetylase-less mutated *AxeA<sub>tr</sub>*-D130A enzyme showed that it was a chitinase-type activity. Assays with chitinous substrates further confirmed that the enzyme is not a chitosanase. Cleavage pattern of chitooligosaccharides (production of chitotriose and chitobiose) suggested an endo-type of chitinase activity. Cleaved products showed an inverting-type mechanism where an  $\alpha$  configuration is produced from hydrolysis of the  $\beta$  link oligomers. Although the *AxeA<sub>tr</sub>* tridimensional structure is more akin to the family GH-18 chitinases, structural analysis and primary structure alignment showed no common features between the *AxeA<sub>tr</sub>* and various chitinases or chitosanases, thus complicating the identification of residues implicated specifically in the GH activity. Mutation of the residue essential for deacetylase activity, D130, improved the GH activity suggesting concomitant mode of action but further rational studies will be necessary to confirm this hypothesis. Nevertheless, this is the first report of a GH activity among CE-4 enzymes and the *AxeA<sub>tr</sub>* could prove to be a useful starting tool in fields such as specific chitosan production for which various applications are well known.

### **2.1.11 Materials and methods**

#### ***Chemicals***

All the reagents used were of the highest commercial purity available. Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were from New England Biolabs Inc. (Ipswich, USA) and GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Chitooligosaccharides ((GlcNAc)<sub>n</sub>; n=1-6), chitosan oligosaccharides ((GlcNH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; n=1-6) and cellohexaose were purchased from Seikagaku Biobusiness Corp. (Tokyo, Japan). Xylohexaose was purchased from Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland). Low viscosity carboxymethyl cellulose, 4-nitrophenyl *N-N'*-diacetyl chitotriose ((GlcNAc)<sub>3</sub>-*p*NP), 4-nitrophenyl *N-N'*-diacetyl chitobiose ((GlcNAc)<sub>2</sub>-*p*NP), 4-nitrophenyl *N*-acetyl glucosamine ((GlcNAc)-PNP) and Pratical grade Crab Shell

chitin were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Cell wall peptidoglycan from the gram positive organisms *Bacillus subtilis* and *Streptomyces sp.* were also purchased from Sigma. Glycol chitin-80 (80% acetylated) was prepared as mentioned in a previous work (Caufrier *et al.*, 2003). Chitosan-24 (24% acetylated) was obtained from Vanson Inc. (Redmond, USA).

#### ***Cloning of catalytic domain of acetylxyylan esterase A and site-directed mutagenesis***

All molecular biology procedures and DNA manipulations followed published methods (Hopwood *et al.*, 1985). Plasmid pIAF934 containing the gene encoding for the catalytic domain of AxeA (starting from Ala-42 and ending at Ser-236 of mature product (Shareck *et al.*, 1995)) was used as a template for mutagenic polymerase chain reaction as mentioned in Puchart and co-workers (Puchart *et al.*, 2006). All new gene constructs were analysed by DNA sequencing by a dideoxy-chain termination method (Sanger *et al.*, 1992). In all cases, expected sequences of both DNA strands were confirmed.

#### ***Electrophoresis analysis***

Separation of proteins by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed following a published method (Laemmli, 1970). Samples were denatured as mentioned previously (Dupont *et al.*, 1996) and proteins visualized by silver staining.

#### ***Protein expression and purification***

The expression and purification of the AxeA<sub>ir</sub> and its AxeA<sub>ir</sub>-D130A mutant was done using a modified technique employed by Caufrier and co-workers (Caufrier *et al.*, 2003). Strains were cultivated in 500 mL Erlenmeyer flasks for 72h at 34°C with agitation (250 rpm) in M14 medium supplemented with 1% xylose (w/v) as sole carbon source. Mycelium was removed by centrifugation and the supernatant filtered through a 0.2 µm nylon membrane (Whatman, Maidstone, UK). The resulting protein mixture was then concentrated by ultrafiltration and dialysed against MES-NaOH 10 mM, pH 5.5. The dialyzed enzyme solution was loaded on a Hi-Trap Carboxymethyl anionic column (16 mm x 2.5 cm) (GE Healthcare) pre-equilibrated with MES-NaOH

10 mM, pH 5.5 at 4°C. AxeA<sub>ir</sub> was eluted with a linear gradient of MES-NaOH 10 mM, pH 5.5, 1M NaCl buffer. Fractions were collected and proteins monitored at 280 nm. Elution fractions were analyzed on SDS-PAGE and fractions containing AxeA<sub>ir</sub> were pooled and concentrated to 4 mg/mL by ultrafiltration. Partially purified enzyme (1 mg) was loaded on two size exclusion HPLC columns Protein-Pak 125 (7.8 mm x 30 cm) connected in series (Waters). Elution was done in isocratic mode with sodium phosphate buffer 0.1 M pH 6.0 at 0.5 mL/min and 25°C. Elution fractions collected (1 mL each) were analysed with silver-stained SDS-PAGE to assess purity.

### ***Protein concentration***

Total protein concentration was determined using a BCA Protein Assay Kit (Pierce) by comparison with standards curves of bovine serum albumin (BSA) provided. Samples were quantified using the 96-well microplate assay following the manufacturer's instructions.

### ***Analytical methods***

Determination of the enzymatic activities toward chitooligosaccharides and *p*NP-labelled chitin oligomers was by an isocratic HPLC method. Reactions were done at 50°C in sodium phosphate buffer 40 mM pH 6.0 with 1 mM of CoCl<sub>2</sub> as cofactor and the equivalent of 1.62 mM of (GlcNAc)<sub>6</sub>, 1.93 mM of (GlcNAc)<sub>5</sub>, 2.41 mM of (GlcNAc)<sub>4</sub>, 3.19 mM of (GlcNAc)<sub>3</sub>, 9.43 mM of (GlcNAc)<sub>2</sub> or 9.04 mM of (GlcNAc). For studies with 4-nitrophenyl labelled substrates, assays were performed with 1.67 mM of (GlcNAc)<sub>3</sub>-*p*NP or 4.58 mM of (GlcNAc)<sub>2</sub>-*p*NP. In all cases, reactions were started by the addition of purified AxeA<sub>ir</sub> or its respective mutants to 995 nM (final concentration). Aliquots (200 μL) were taken and added to 50 μL of 0.4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to stop the reaction, as indicated. For cofactor influence on enzymatic activity, the assay was done as described but with addition of 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Samples (100 μL) were injected on an Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column (7.8 mm x 30 cm) (Bio-Rad, Hercules, USA). Elution was done in isocratic mode with a mobile phase of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM at a flow rate of 0.6 mL/min and 45°C. Acetylated products were detected by absorbance at 210 nm and *p*NP-moiety in acidic conditions could be detected simultaneously at 270 nm by employing a dual

wavelength detector. Identification of molecular species was done by comparison with retention times of known standards. Concentrations were determined, after normalisation with an internal standard, by comparing to peak areas of known concentrations of each standard. It was determined under these conditions that the absorbance was linear for all the standards within the range of concentrations used. Determination of chitinase and deacetylase activity on polymeric substrates was done in the conditions mentioned previously using as substrate, either 2 mg/mL of carboxymethyl cellulose, 1 mg/mL of peptidoglycans, 1 mg/mL of crab shell chitin, 1 mg/mL (1.90 mM) of glycol chitin-80 or 1 mg/mL (11.68 mM) of chitosan-24. All of the reaction products were analysed using the isocratic HPLC ion exclusion method mentioned previously at 210 nm for detection of acetate or acetylated products. The deacetylase activity was expressed in IU/mg of protein where one international unit equals to 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  of released acetate. The glycosyl hydrolase activity was expressed in IU/mg of protein where one unit equals to 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  of initial substrate consumed.

Monitoring of hydrolysis of non-acetylated substrates was done in the same conditions as mentioned for chitooligosaccharides but substrates employed were either 1.97 mM of xylohexaose, 3.32 mM of chitosan hexamer ( $\text{GlcNH}_2$ )<sub>6</sub> or 4.04 mM of cellobiohexaose. Reactions were performed for 96h with aliquots taken at 24 hours intervals. Samples of xylohexaose and cellobiohexaose hydrolysis reactions were analyzed by the injection of 100  $\mu\text{L}$  onto a size exclusion Aminex Carbohydrate HPX-47A column (7.8 mm x 30 cm) (Bio-Rad). Products were eluted with water at 0.5 mL/min at 45°C and monitored by refractive index using a Waters 410 Differential refractometer. Elution peaks were compared to known standards for retention times and peak area. Determination of chitosanase activity was done with a more sensitive technique using High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Employing a Dionex DX-500 chromatography system (Dionex Co., Sunnyvale, USA), samples were loaded (10  $\mu\text{L}$ ) onto a CarboPac PA-100 column (4 mm x 25 cm) with a 16 mM NaOH mobile phase at 1 mL/min flow rate at 25°C. Elution was done using a concave NaOH gradient from 16 mM to 100 mM in 15 minutes.

The anomeric forms of the hydrolytic products from (GlcNAc)<sub>6</sub> were determined using a modified HPLC method from Koga and co-workers (Koga *et al.*, 1998). The enzymatic reaction was performed at 37°C in sodium phosphate buffer 13.3 mM pH 6.0 with 2.69 mM of substrate. The reaction was started by the addition of excess AxeA<sub>Ir</sub>-D130A enzyme (19.9 μM final concentration) to minimize spontaneous mutarotation. After incubation for 0, 10, 30, 60 and 120 min, an aliquot of the reaction was immediately frozen in liquid nitrogen to stop the reaction and avoid anomeric equilibrium. Samples were stored at -80°C until analysis. For analysis, 10 μL of each sample was immediately loaded onto a TSK-Gel Amide-80 3 μm column (4.6 X 150 mm) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany). Elution was done using a mobile phase of acetonitrile-water (75:25 v/v) at a flow rate of 1 mL/min at 25°C. Hydrolytic products were recorded by absorbance at 210 nm.

#### **2.1.12 Acknowledgments**

Presented work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grants #257885 and #155496). Guillaume Brault was granted a fellowship by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). Special thanks to Liette Biron for her technical help with *S. lividans* manipulations, and Roger Dubuc for excellent technical assistance.

### **3. Méthodologie et résultats supplémentaires**

## 3.1 Méthodologie supplémentaire

### 3.1.1 Manipulations génétiques du gène de l'*axeA<sub>lr</sub>*

Les mutants rationnels ont été produits par la méthode d'élongation par chevauchement tel que décrit précédemment (Puchart *et al.*, 2006). Les méthodes d'analyse et de manipulation de l'ADN ont été effectuées par Liette Biron sous la supervision de François Shareck (Ph.D.) La liste des amorces dégénérées employées pour effectuer ces mutations est disponible à l'Annexe B du présent mémoire. Le gène codant pour l'*AxeA<sub>lr</sub>* a été muté par une première PCR combinant les amorces externes (WT N-terminus forward et WT C-terminus reverse) avec les amorces internes correspondantes. Les deux portions (5' et 3') de gènes produites ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v). Les fragments d'ADN correspondants ont été extraits du gel et purifiés avec la trousse Qlaquick (Qiagen, Mississauga, Canada) pour ensuite être utilisés pour une deuxième PCR. Les deux fragments ont été combinés et une deuxième PCR employant les amorces externes a été effectuée pour reconstituer le gène. Les fragments obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % et ont été extraits et purifiés tel que mentionné précédemment. Les gènes mutés de l'*axeA<sub>lr</sub>* et le plasmide d'expression pIAF934 ont été digérés avec les enzymes de restriction *SphI* et *SacI* afin de produire des extrémités cohésives et les fragments issus de cette digestion ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments correspondants aux gènes mutés de l'*axeA<sub>lr</sub>* et au plasmide linéarisé ont été extraits et purifiés avec la trousse Qlaquick. Les gènes ont été ligés au vecteur d'expression pIAF934 qui a été cloné dans la souche d'*E. coli* BL21/pREP4 par électro-transformation. Toutes les séquences des gènes mutés ont été vérifiées par séquençage afin de confirmer la présence de la mutation désirée. Le séquençage a été effectué à l'aide des amorces universelles M13for et M13rev. Les plasmides issu du clonage des gènes mutés de l'*axeA<sub>lr</sub>* avec le vecteur pIAF934 ont été par la suite clonés dans la souche d'expression *S. lividans* IAF45  $\Delta$ *axeA* (Lussier, 2006) par transformation de protoplastes tel que décrit par Nisole et collaborateurs (2006).

### **3.1.2 Caractérisation de l'activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub> et des enzymes mutées**

La méthodologie employée pour caractériser l'activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub> et des enzymes mutées correspondantes envers des oligosaccharides de chitine est décrite dans la section «Material and methods» du manuscrit. Les techniques d'expression et de purification de l'enzyme sont décrites dans le paragraphe «Protein expression and purification». La pureté de l'enzyme a été confirmée par SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. Les résultats sont présentés à la figure 16. La caractérisation de l'activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub> et des enzymes mutées envers différents chitoooligosaccharides a été effectuée selon la méthodologie décrite dans la même section au paragraphe intitulé «Analytical methods». L'activité de déacétylation de l'enzyme sauvage et des enzymes mutées ont été caractérisées sur une période d'incubation de 96h avec des aliquotes prises à des intervalles de 24 h. Toutes les expérimentations ont été effectuées en triplicata. Pour les tests de caractérisation sur 24 h des activités de déacétylation et glycosidique de l'AxeA<sub>tr</sub> et de l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A, les mêmes conditions réactionnelles que pour la cinétique sur 96 h ont été employées. Les aliquotes ont été prélevées à des intervalles de deux heures pour les huit premières heures, puis à des intervalles de quatre heures jusqu'au temps d'incubation de 24 h.

### **3.1.3 Analyse du degré d'acétylation des produits réactionnels**

Les travaux d'analyse des produits réactionnels par spectrométrie de masse ont été effectués par Marie-Christine Tang (M.Sc.) sous la supervision de Karen C. Waldron (Ph.D.) du département de chimie de l'Université de Montréal. Les échantillons de cinétiques enzymatiques de l'enzyme sauvage purifiée avec le (GlcNAc)<sub>6</sub> ont été analysés. Les produits de la réaction ont été séparés par chromatographie HPLC d'interactions hydrophiles sur une colonne Luna Cyano 3µm (4.6 mm x 15cm) (Phenomenex, Torrance, É.-U.). L'adsorption a été effectuée avec une phase mobile aqueuse d'acide formique 0,1 % et l'élution a été faite avec un gradient descendant de 55 % à 35 % d'acétonitrile en 8,5 minutes. Les oligomères ont ensuite été ionisés par électronébulisation (ESI) et détectés à l'aide d'un spectromètre

de masse MSD 1100 simple quadrupôle (Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.). L'identification des produits a été faite par comparaison des temps de rétention avec divers étalons d'homo- et d'hétéro-oligomères de chitine et de chitosane.

#### **3.1.4 Tests d'inhibition à l'allosamidine**

L'allosamidine employée a été généreusement fournie par M. Shohei Sakuda (Ph.D.) de l'Université de Tokyo. L'échantillon de 1 mg a été dilué dans 1 mL de tampon phosphate 100 mM pH 6,0 pour donner une solution stock de 1,606 mM qui a été aliquotée et conservée à -20 °C. Les tests d'inhibition ont été effectués avec trois ratios molaires enzyme/inhibiteur de 100 :1, 1 :1 et 1 :100. Les réactions ont été effectuées avec 1,62 mM de (GlcNAc)<sub>6</sub> dans un tampon sodium phosphate 40 mM pH 6,0 complété avec 1 mM de CoCl<sub>2</sub>. La réaction a été démarrée avec l'ajout de 20 µg d'enzyme sauvage ou d'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A purifiée (concentration finale de 995 nM). La réaction a été incubée 24h à 50°C avec agitation (1000 rpm). Les produits de réaction sur 24 h ont été analysés selon la technique HPLC décrite précédemment dans le manuscrit scientifique à la section «Materials and methods».

#### **3.1.5 Alignements de séquences protéiques**

Tous les alignements de séquences protéiques ont été effectués à l'aide du logiciel Vector NTI version 10.0 (Invitrogen, Burlington, Canada). Les séquences peptidiques ont été sélectionnées à partir de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences des peptides de sécrétion ont été omises lorsque qu'elles étaient indiquées. Seules les séquences correspondant aux domaines catalytiques ont été alignées sauf pour les gènes n'ayant pas d'information sur la présence d'une séquence codant pour un peptide de sécrétion.

#### **3.1.6 Modélisations tridimensionnelles**

Toutes les modélisations tridimensionnelles ont été produites à l'aide du logiciel Molecular Operating Environment (MOE) version 8.0 (Chemical Computing

Group, Montréal, Canada). Les dossiers-sources contenant les données cristallographiques ont été téléchargés à partir de la base de données du Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RSCB-PDB) (<http://www.rcsb.org/>). Les superpositions de structures tridimensionnelles entre CE-4 ont été effectuées en utilisant la fonction «Flexible alignment» du logiciel. Les résidus catalytiques et le ligand métallique ont été employés comme points de référence pour l'alignement des structures. La simulation de positionnement du chitotriose au sein du site catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub> a été effectuée à l'aide de la fonction «Molecule docking» en utilisant les paramètres par défaut suggérés par le logiciel. Une vingtaine de modèles ont été produits et les modèles présentant un positionnement du groupement acétyle proche de la position de l'acétate lié dans la structure cristalline de l'AxeA<sub>tr</sub> ont été sélectionnés. La position finale du substrat a été ajustée manuellement afin de respecter les liens hydrogènes et les encombrements stériques décrits dans la littérature.

## **3.2 Résultats supplémentaires**

### **3.2.1 Analyse de l'activité de déacétylation d'oligomères de chitine**

Bien que plusieurs études aient démontré la capacité de l'AxeA<sub>tr</sub> à déacétyler divers substrats solubles de chitine, les méthodes analytiques employées étaient toutes de nature indirecte. Des études plus poussées étaient donc nécessaires afin de mieux caractériser cette activité secondaire. Les techniques employées sont essentiellement celles décrites dans le manuscrit scientifique et font appel à de simples analyses par HPLC basées sur la séparation des produits de réaction en fonction de leur taille et de leur charge ionique. Ces techniques offrent le double avantage de pouvoir effectuer des analyses quantitatives et qualitatives en même temps des produits libérés. Ainsi, il est possible de quantifier l'acétate libéré mais aussi de déterminer précisément le type d'oligosaccharides présents pour autant qu'ils soient acétylés.

Afin de caractériser l'activité de déacétylation de la chitine par l'AxeA<sub>tr</sub>, l'enzyme purifiée a été incubée avec divers chito oligosaccharides dans des conditions

optimales décrites précédemment. L'analyse par HPLC a permis de démontrer que l'AxeA<sub>tr</sub> est capable de déacétyler les oligomères de DP 6 à 2 mais pas les monomères de (GlcNAc). Un rendement maximal de déacétylation de 45 % envers le (GlcNAc)<sub>6</sub> a été mesuré après 96 h d'incubation (figure 17). L'ajout d'un excès d'enzyme fraîche suivie d'une période d'incubation supplémentaire de 24 h n'a pas permis d'augmenter cette valeur. Le patron d'hydrolyse observé avait un profil du type «Michaelis-Menten» envers les différents types d'oligomères avec une vitesse maximale de déacétylation durant les premières 12 h de réaction pour la déacétylation du chitohexaose et durant les premières 24 h pour les autres substrats. Les rendements de déacétylation observés diminuaient avec une diminution du degré de polymérisation (DP). Les valeurs maximales mesurées après 96 h d'incubation étaient de l'ordre 40 %, 37 %, 18,5 % et 17 % pour le (GlcNAc)<sub>5</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> et le (GlcNAc)<sub>2</sub> respectivement.

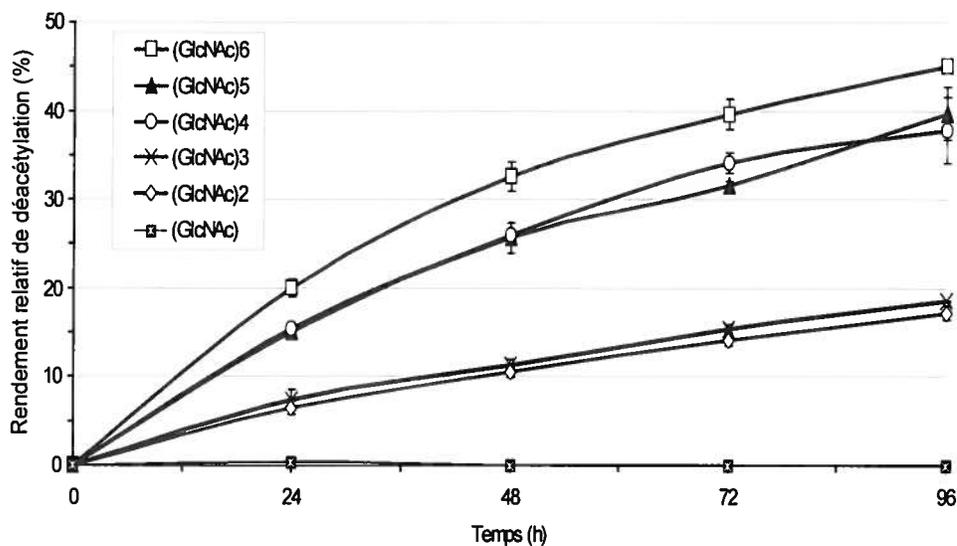


Figure 17. Rendements de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub> envers divers chito-oligosaccharides en fonction du temps.

Les activités spécifiques mesurées pour la déacétylation de chito-oligosaccharides par l'AxeA<sub>tr</sub> sont présentées dans le tableau 6. Ces activités ont été mesurées dans des conditions linéaires de libération d'acétate correspondant à une période de 12 h ou 24 h d'incubation selon les essais. Tout comme le rendement de

déacétylation, les activités spécifiques décroissaient avec une diminution du DP avec une valeur maximale d'activité spécifique pour le (GlcNAc)<sub>6</sub>. Néanmoins, les activités spécifiques mesurées envers les substrats (GlcNAc)<sub>5,3</sub> sont très semblables et il y a une baisse significative qu'à partir du DP-3. L'activité spécifique mesurable la plus faible a été observée pour le chitobiose avec tout de même un peu plus de 60 % de l'activité mesurée pour le chitohexaose.

Tableau 6. Activités spécifiques de l'AxeA<sub>tr</sub> envers différents chitooligosaccharides.

Substrat	Activité spécifique IU/mg
(GlcNAc) <sub>6</sub>	0.068 <sup>a</sup>
(GlcNAc) <sub>5</sub>	0.050
(GlcNAc) <sub>4</sub>	0.051
(GlcNAc) <sub>3</sub>	0.049
(GlcNAc) <sub>2</sub>	0.042
(GlcNAc)	n/d <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Activité mesurée sur une période de 12h.

<sup>b</sup>n/d: Activité non-détectable.

### 3.2.2 Activité de déacétylation de mutants rationnels du gène de l'axeA<sub>tr</sub>

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action, mais aussi d'améliorer potentiellement l'activité de déacétylation de la chitine par l'AxeA<sub>tr</sub>, une étude comparative des structures tridimensionnelles de différentes CE-4 ayant différentes spécificités enzymatiques a été effectuée. À l'aide d'un logiciel de modélisation et des structures cristallines de CE-4 disponibles sur le serveur de la RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>), des superpositions de structures ont été réalisées afin d'identifier des régions du site catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub> pouvant affecter sa spécificité (figure 18 A à D). Cette approche rationnelle a permis d'identifier une boucle de longueur variable parmi les CE-4 étudiées qui s'étend des résidus E121 à N133 (numérotation de l'AxeA<sub>tr</sub>, figure 19). Cette région a donc été ciblée pour un criblage par mutations en résidus alanines afin de déterminer l'implication des résidus

originaux dans la spécificité de l'enzyme envers les substrats de chitine. De plus, certains résidus hydrophobes importants ont été mutés afin de déterminer le type fonctionnalité impliquée (ex. interactions hydrophobes, encombrement stérique, polarité, etc.).

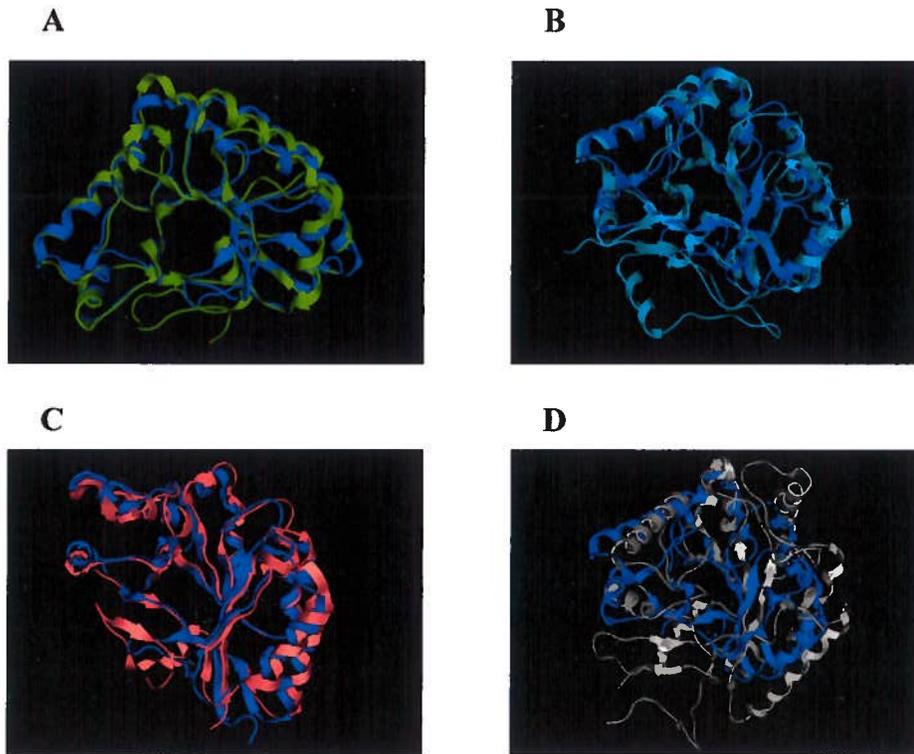


Figure 18. Superposition de la structure tridimensionnelle de l'AxeA<sub>tr</sub> avec certaines CE-4 de spécificités différentes. La structure de l'AxeA<sub>tr</sub> (PDB: 2CC0) est représentée en rubans bleus. A, Superposition avec l'acétyl-xylane estérase Xyn11A de *Clostridium thermocellum* (PDB: 2C71). B, Superposition avec la peptidoglycane acide *N*-acétyl-muramique déacétylase PdaA de *Bacillus subtilis* (PDB: 1NY1). C, Superposition avec la peptidoglycane *N*-acétyl-glucosamine déacétylase PgdA de *Streptococcus pneumoniae* (PDB: 2C1G). D, Superposition avec la carbohydrate estérase de *Pseudomonas aeruginosa* PA1517 (PDB: 1Z7A). Superpositions effectuées à l'aide du logiciel MOE v8.0.

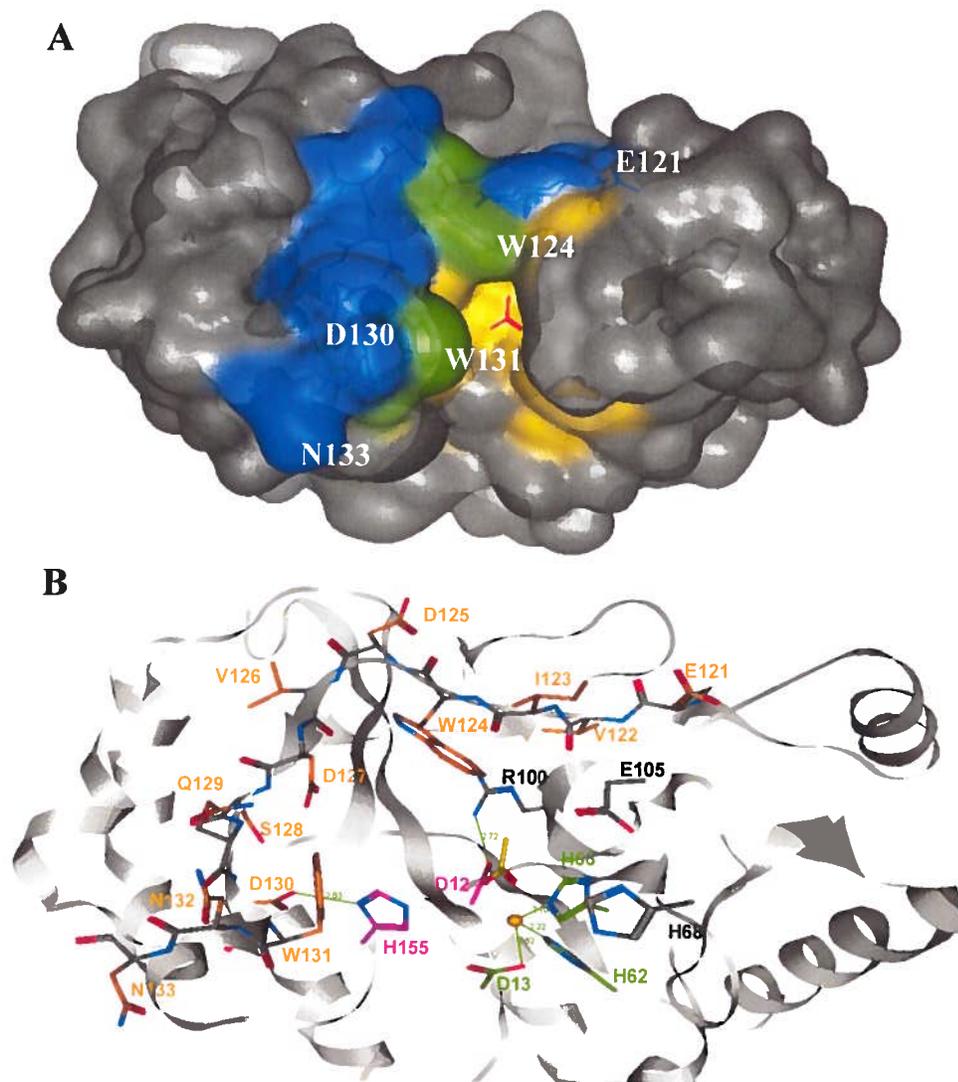


Figure 19. Représentation tridimensionnelle de la région ciblée pour la mutagenèse par rapport à la structure de l'AxeA<sub>II</sub>. A, représentation tridimensionnelle de la surface de l'AxeA<sub>II</sub>. La région sélectionnée pour les mutations est représentée en bleu. Les résidus conservés parmi les CE-4 sont présentés en jaune. Les résidus conservés chez les CE-4 faisant partie de la région ciblée sont représentés en vert. La molécule d'acétate liée au site catalytique est représentée en bâtonnets rouges. B, représentation tridimensionnelle de la région mutée par modèle «bâtonnets». Les chaînes latérales des résidus de la région mutée sont identifiées en orange. Les résidus catalytiques sont identifiés en magenta et les résidus de coordination de l'atome de zinc (boule orange) sont identifiés en vert. L'acétate lié au sein du site catalytique est représentée par des bâtonnets jaunes. Les lignes vertes correspondent à des liens de coordination et les chiffres représentent la distance en Angströms (Å) entre les chaînes latérales. Les représentations ont été effectuées à l'aide du logiciel MOE v8.0 à partir du dossier PDB 2CC0 (AxeA<sub>II</sub>).

Tous les mutants produits ont ensuite été exprimés dans les mêmes conditions que pour l'enzyme sauvage. Enfin, toutes les protéines recombinantes ont été purifiées par une première étape de chromatographie ionique telle que décrite dans la section «Materials and methods» du manuscrit scientifique. Étant donné l'importance de la charge de travail qu'implique la purification jusqu'à homogénéité d'une vingtaine d'enzymes mutées, il a été décidé d'évaluer visuellement la pureté des enzymes recombinantes après cette première étape de purification. L'analyse SDS-PAGE des mutants purifiés a montré qu'ils étaient purs à au moins 95 %, ce qui est suffisant pour un criblage initial pour leur spécificité envers le (GlcNAc)<sub>6</sub>. Le rendement de déacétylation en fonction du temps est présenté dans le tableau 7. Ainsi, on remarque que la mutation des résidus absolument conservés au sein des CE-4 affecte grandement l'activité de déacétylation avec une perte totale d'activité pour l'enzyme *AxeA<sub>ir</sub>-D130A* et des activités très faibles pour les enzymes *AxeA<sub>ir</sub>-W124A* et *AxeA<sub>ir</sub>-W131A*. Il est intéressant de constater que l'activité enzymatique des enzymes *AxeA<sub>ir</sub>-W124F* et *AxeA<sub>ir</sub>-W124S* est tout de même environ 2 et 2,5 fois plus grande par rapport à l'enzyme *AxeA<sub>ir</sub>-W124Y* qui cumule l'encombrement aromatique de la phénylalanine et la polarité de la sérine. À l'inverse, la mutation *W131S* n'a eu que peu d'effets pour rétablir l'activité enzymatique alors que l'enzyme *AxeA<sub>ir</sub>-W131Y* est celle qui semble avoir récupéré le plus de fonctionnalité pour ce résidu. De plus, trois enzymes mutées présentent une activité de déacétylation significativement supérieure à l'enzyme sauvage dont deux mutations qui ciblent des résidus polaires non-chargés. Néanmoins, aucune enzyme n'a pu hydrolyser plus de 60 % des groupements acétate disponibles. Parmi les résidus mutés ayant une fonction carboxylique, les mutations *D127A* et *D130A* semblent avoir une importance majeure dans l'activité de déacétylation avec une baisse respective de 92 % et de 100 % de l'activité enzymatique. La mutation des résidus *E121* et *D125* ne semble pas avoir affecté grandement l'activité de déacétylation avec une légère hausse de 5 % et une baisse de 6 % respectivement.

Tableau 7. Rendements relatifs de déacétylation du chitohexaose par des mutants rationnels de l'AxeA<sub>tr</sub> par rapport à l'enzyme sauvage.

Clone	Déacétylation relative (%)
AxeA <sub>tr</sub> sauvage	100,0
E121A	106,0 <sup>a</sup>
V122A	122,6 <sup>b</sup>
I123A	64,8 <sup>b</sup>
W124A	2,2 <sup>b</sup>
W124F	53,8 <sup>b</sup>
W124S	44,8 <sup>b</sup>
W124Y	20,4 <sup>b</sup>
D125A	93,3
V126A	93,7 <sup>c</sup>
D127A	8,0 <sup>a</sup>
S128A	126,5 <sup>d</sup>
Q129A	76,6 <sup>d</sup>
D130A	0,0 <sup>a</sup>
W131A	1,6 <sup>c</sup>
W131F	9,8 <sup>c</sup>
W131S	3,1 <sup>d</sup>
W131Y	17,5 <sup>d</sup>
N132A	127,9 <sup>d</sup>
N133A	97,7 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>: Incubation de 96h.

<sup>b</sup>: Incubation de 94h.

<sup>c</sup>: Incubation de 118h.

<sup>d</sup>: Incubation de 114h.

### 3.2.3 Alignement de séquences de l'AxeA<sub>tr</sub> avec des CDA de la famille des CE-4

Suite à ces résultats intéressants, un alignement de séquences protéiques partielles avec des CDA de la famille des CE-4 a été effectué afin de mieux comprendre l'implication possible de chacun des résidus mutés. L'alignement montre que les résidus W124, D127, D130 et W131 sont conservés sauf pour la CDA de *C. lindemuthianum* qui conserve toutefois des résidus ayant un encombrement aromatique à la position des tryptophanes de l'AxeA<sub>tr</sub>. Le résidu V122 est aussi très conservé et toutes les enzymes gardent un résidu hydrophobe non-aromatique à cette

position. Par contre, le résidu S128 est unique à l'AxeA<sub>tr</sub>, mais la position chez les toutes les CDA est occupée par un résidu thréonine qui garde une fonctionnalité de polarité non-chargée. La position du résidu D125 est plus ou moins conservée mais là aussi, la polarité est conservée. Enfin, les résidus E121, V126, Q129, N132 et N133 ne semblent pas être conservés au sein des CDA. Le caractère hydrophobe de la position V126 semble unique à l'AxeA<sub>tr</sub>. La position I123 est majoritairement occupée par des résidus hydrophobes très similaires sauf dans le cas de la CDA de *C. lindemuthianum* qui possède un résidu aspartique à la place. Il semble y avoir une conservation de la polarité pour la position occupée par le résidu N132 alors qu'il y a absence de consensus pour la position occupée par le résidu N133.

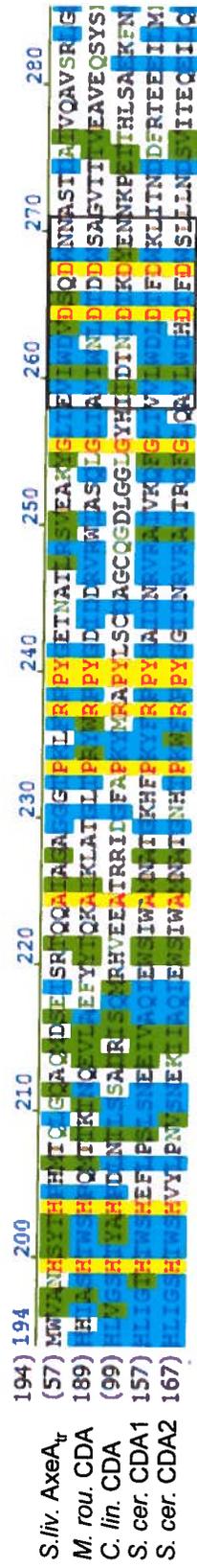


Figure 20. Alignement de séquences protéiques partielles de CDA de la famille des CE-4 avec la région mutée de l'AxeA<sub>tr</sub>. *S. liv.* AxeA<sub>tr</sub> acétyl-xylane estérase A de *S. lividans* 1326 (GenBank AAC06115.1). *M. rou.* CDA, chitine déacétylase de *Micor rouxii* ATCC 24905 (GenBank CAA79525.1). *C. lin.* CDA, chitine déacétylase de *Colletotrichum lindemuthianum* (GenBank AAT68493.1). *S. cer.* CDA1, chitine déacétylase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* S288C (GenBank AAB67356.1). *S. cer.* CDA2, chitine déacétylase 2 de *Saccharomyces cerevisiae* S288C (GenBank AAB67355.1). La région ciblée pour les mutations est encadrée en noir. Les résidus identiques sont surlignés en jaune et les résidus conservés en cyan. Les alignements similaires sont surlignés en vert. Alignement de séquences effectué à l'aide du logiciel Vector NTI version 10.0.

### 3.2.4 Analyse du degré d'acétylation des produits réactionnels

Bien que l'approche d'analyse des produits réactionnels par HPLC soit une méthode simple et efficace pour caractériser l'activité de déacétylation de la chitine, elle ne permet pas d'identifier les différentes espèces de produits en fonction de leur DA. Ainsi, un oligomère totalement déacétylé ne sera pas identifié, de même qu'un oligomère partiellement acétylé (ex.  $(\text{GlcNAc})_4-(\text{GlcNH}_2)_2$ ) aura le même temps d'éluion que sa contrepartie totalement acétylée. Afin de pallier à ces limites, un travail de collaboration a été mis en place avec l'équipe de Karen C. Waldron (Ph.D.) du département de chimie de l'Université de Montréal. Mme Waldron a développé une méthode de séparation et d'analyse d'oligomères de chitine et de chitosane ayant différents DP et DA. Les techniques employées font appel au HPLC-MS/MS pour quantifier et identifier chaque espèce de produit.

L'analyse des oligomères produits en fonction du temps est représentée par la figure 21. Après 24 h d'incubation, il y a autant de DP-6 mono- et di-déacétylé (DA-5 et DA-4) que d'espèces complètement acétylées de DP-4, DP-3 et DP-2 qui proviennent de l'hydrolyse du chitohexaose. Le DP-2 mono-déacétylé constitue le principal produit après 72 h d'incubation. Il est intéressant de noter que l'accumulation d'espèces tri-acétylés (DP-6 et DP-4) se déroule au début de la réaction et varie très peu par la suite. Les oligomères de plus petite taille (DP-4, 3 et 2) complètement acétylés semblent aussi être déacétylés plus lentement que les autres espèces car le niveau est relativement stable en fonction du temps. Il n'y a aucune présence d'oligomères complètement déacétylés et ce, peu importe la durée d'incubation. Néanmoins, ces espèces complètement acétylées diminuent tout de même en fonction du temps vers une accumulation d'espèces de DA-2 et DA-1 et ce, de toutes les longueurs. Il y a cependant beaucoup plus de DP-2 et de DP-4 mono-acétylé que de DP-6 et de DP-3 mono-acétylé. Les niveaux d'espèces di-acétylées après 72 h sont semblables pour les différents oligomères sauf pour le DP-2 qui est légèrement plus faible à cause d'une conversion en DP-2 mono-acétylée. Néanmoins,

on remarque qu'à la 72<sup>e</sup> heure, le niveau de DP-2 mono-acétylé a fortement augmenté alors que le niveau de DP-2 di-acétylé n'a que très peu diminué.

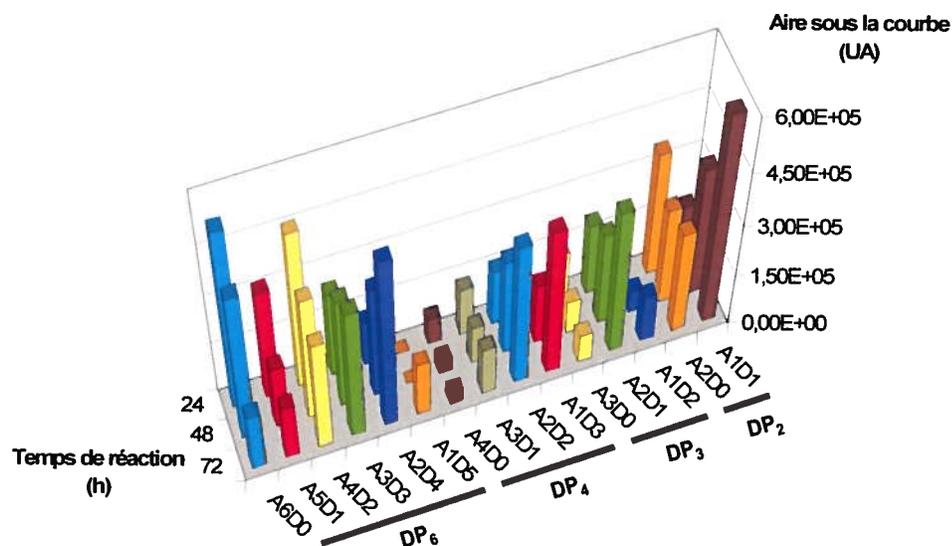


Figure 21. Analyse HPLC-MS/MS des produits d'hydrolyse du  $(\text{GlcNAc})_6$  par l'AxeA<sub>r</sub> en fonction du temps. A<sub>n</sub> représente le nombre de groupements acétylés par oligomère. D<sub>n</sub> représente le nombre de groupements déacétylés par oligomères. DP représente le degré de polymérisation de l'oligomère. Les aires sous la courbe (ASC) sont représentées en unités arbitraires (UA). Figure produite par Marie-Christine Tang et reproduite avec son autorisation.

### 3.2.5 Analyse de l'activité enzymatique durant la phase initiale de la réaction

Une analyse complémentaire selon les techniques décrites précédemment a été effectuée sur une période de 24 h afin de déterminer plus en détails les produits libérés lors de la phase initiale de la réaction enzymatique. L'analyse de la dégradation du  $(\text{GlcNAc})_6$  en fonction du temps par l'enzyme sauvage est représentée dans la figure 22-A. L'analyse montre que la déacétylation et l'hydrolyse du substrat en DP-3 et DP-2 se déroulent en même temps dès le début de l'incubation. La production de DP-2 fluctue légèrement dans le temps mais celle de DP-3 est quasi-linéaire. Par contre, le DP-4 n'apparaît qu'entre la 8<sup>e</sup> et la 12<sup>e</sup> heure d'incubation alors que le *N*-acétylglucosamine est présent aussi très faiblement dès les premiers temps d'incubation.

Entre la 8<sup>e</sup> et la 12<sup>e</sup> heure d'incubation, le DP-4 s'accumule rapidement à un niveau similaire au DP-3 et au DP-2. Il n'y a aucune présence de DP-5 peu importe le temps d'incubation. Par contre, la dégradation du (GlcNAc)<sub>6</sub> par l'enzyme mutée AxeA<sub>ir</sub>-D130A montre, outre l'absence d'acétate libérée, que le DP-4, le DP-3 et le DP-2 sont présents en concentrations égales et ce, dès les premiers instants d'incubation. Par la suite, il y a une légère augmentation de la formation de DP-4 jusqu'à la 8<sup>e</sup> heure d'incubation où ce niveau diminue pour être convertit en DP-2. La formation de DP-2 est d'ailleurs quasi linéaire tout au long de l'incubation avec une concentration finale environ trois fois supérieure à ce qui a été observé pour l'enzyme sauvage. La production de *N*-acétyle glucosamine, quant à elle, est de niveau similaire à ce qui a été observé pour l'enzyme sauvage.

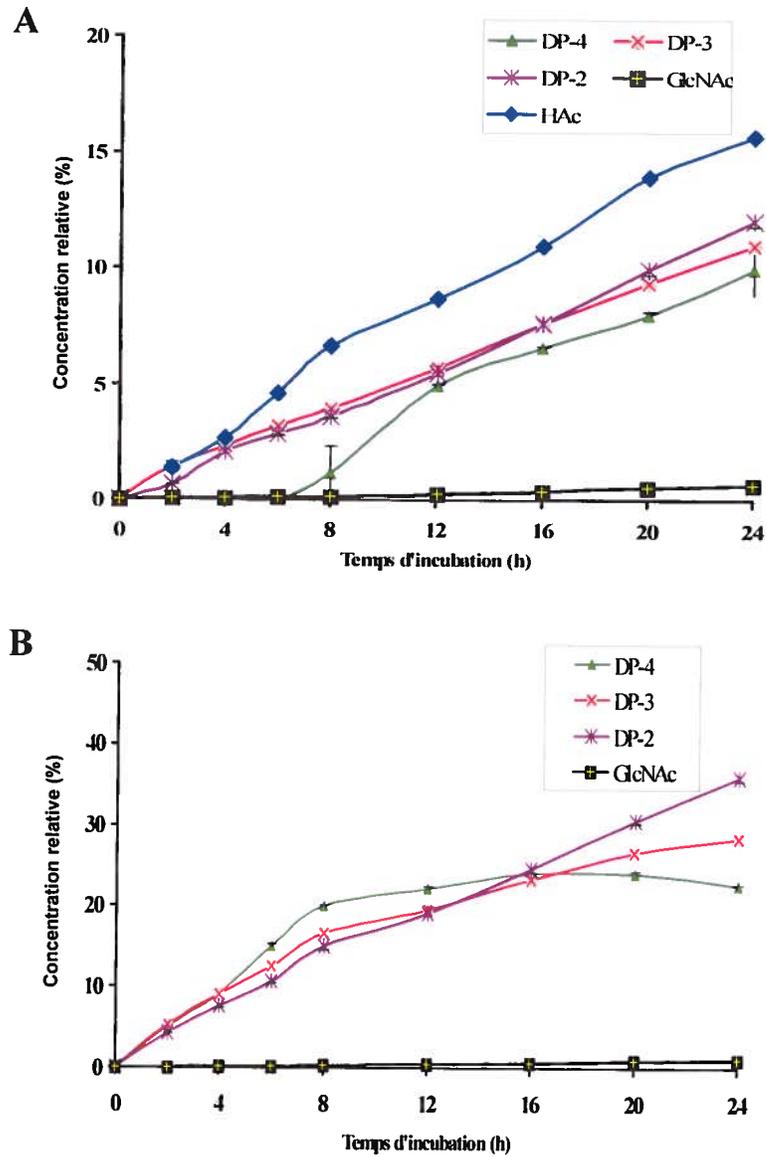


Figure 22. Produits libérés du (GlcNAc)<sub>6</sub> en fonction du temps par l'AxeA<sub>tr</sub> et l'enzyme mutée AxeA<sub>tr</sub>-D130A sur une période de 24 h d'incubation. A, produits libérés par l'enzyme sauvage. B, produits libérés par l'enzyme mutée AxeA<sub>tr</sub>-D130A. DP, degré de polymérisation. GlcNAc, *N*-acétyl glucosamine. HAc, acétate libérée.

### 3.2.6 Les tests d'inhibition par l'allosamidine

L'allosamidine est un puissant inhibiteur compétitif des chitinases de la famille GH-18. Aucune chitinase de la famille GH-19 n'a montré de sensibilité à l'allosamidine à ce jour. Tester l'activité glycosidique en présence de cet inhibiteur

permet donc d'apporter des informations complémentaires permettant de caractériser le type d'activité glycosidique. La figure 23 représente la concentration relative des produits en fonction des différentes concentrations d'allosamidine pour l'enzyme sauvage et l'enzyme AxeA<sub>ir</sub>-D130A. L'analyse de l'enzyme sauvage montre qu'il n'y a pas d'inhibition significative de l'activité de déacétylation et l'activité glycosidique envers le chitohexaose. Une légère hausse de l'activité glycosidique a cependant été observée pour la concentration 0,01x d'inhibiteur. Le patron d'hydrolyse de l'enzyme AxeA<sub>ir</sub>-D130A n'a pas présenté de différences significatives mis à part une hausse de l'activité glycosidique en présence d'excès d'allosamidine (100x).

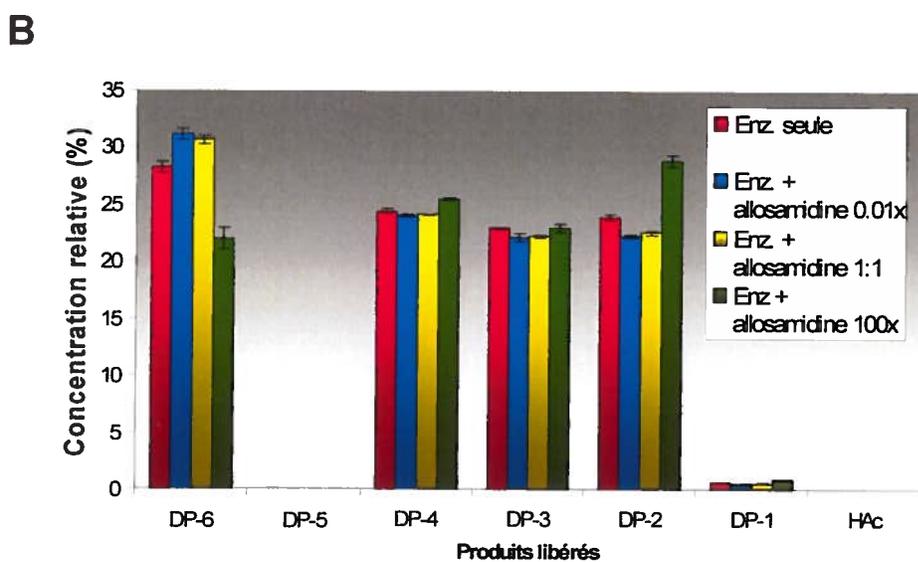
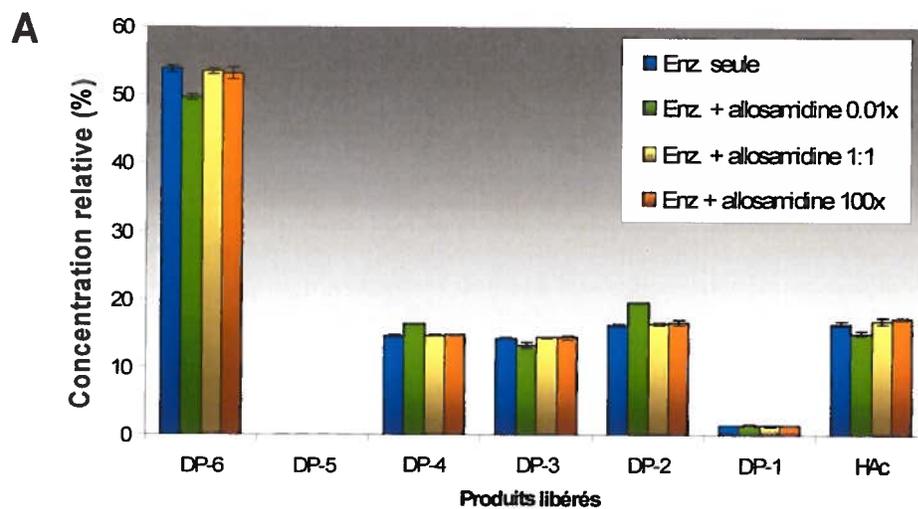


Figure 23. Hydrolyse du  $(\text{GlcNAc})_6$  sur période d'incubation de 24 h par l'enzyme sauvage et l'enzyme mutée  $\text{AxeA}_{\text{ir}}\text{-D130A}$  en présence d'allosamidine. A. Produits libérés par l'enzyme sauvage. B. Produits libérés par l' $\text{AxeA}_{\text{ir}}\text{-D130A}$ . DP, degré de polymérisation. HAc, acétate.

### 3.2.7 L'analyse de mutants de l'axeA<sub>tr</sub> provenant d'études antérieures

Dans le but d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité glycosidique observée, des mutants des résidus catalytiques produits par Puchart et collaborateurs (2006) ont aussi été testés. Les mutants ont été exprimés et purifiés jusqu'à homogénéité selon les mêmes méthodes que pour le clone sauvage. Les enzymes purifiées ont été testées pour leur activité envers le chitohexaose selon les mêmes conditions que pour l'enzyme sauvage. Le tableau 8 représente les activités spécifiques mesurées des mutants de résidus potentiellement impliqués dans l'activité glycosidique.

Tableau 8. Activités de déacétylation et glycosidique spécifiques<sup>a</sup> de l'AxeA<sub>tr</sub> et d'enzymes mutées envers le chitohexaose.

Enzyme	Activité de déacétylation <sup>b</sup> IU/mg	Activité glycosidique <sup>b</sup> IU/mg
AxeA <sub>tr</sub>	0.068	0.026
AxeA <sub>tr</sub> -D12A	0.000	0.009
AxeA <sub>tr</sub> -D13A	0.000	0.003 ± 0.0004
AxeA <sub>tr</sub> -H62A	0.000 <sup>c</sup>	0.387 <sup>c</sup>
AxeA <sub>tr</sub> -H66A	0.000 <sup>c</sup>	0.123 <sup>c</sup>
AxeA <sub>tr</sub> -H68A	0.048 <sup>c</sup>	0.256 <sup>c</sup>
AxeA <sub>tr</sub> -E121A	0.068	0.006
AxeA <sub>tr</sub> -D125A	0.070	0.017
AxeA <sub>tr</sub> -D127A	0.003	0.011
AxeA <sub>tr</sub> -D130A	0.000	0.098
AxeA <sub>tr</sub> -D156A	0.041	0.013

<sup>a</sup> L'erreur relative mesurée est ≤ 5% sauf si mentionnée.

<sup>b</sup> Activité mesurée sur 24 h d'incubation.

<sup>c</sup> Activité mesurée sur 2 h d'incubation.

On remarque que la mutation du résidu catalytique D12 et du résidu de coordination D13 (impliqués dans l'activité de déacétylation) annule complètement l'activité de déacétylation, mais perturbe aussi grandement l'activité glycosidique avec une diminution d'un facteur 10 pour la mutation D13A. Par contre, la mutation des résidus histidines localisés au sein du site actif augmente considérablement l'activité glycosidique avec une hausse de 1500 %, 470 % et 985 % respectivement

pour les enzymes AxeA<sub>ir</sub>-H62A, AxeA<sub>ir</sub>-H66A et AxeA<sub>ir</sub>-H68A. En fait, l'activité glycosidique de ces enzymes mutées était telle que le substrat initial a été complètement consommé après seulement 8 h d'incubation dans le cas de l'enzyme AxeA<sub>ir</sub>-H62A. Ces mutants ont donc été caractérisés sur une période de 24 h plutôt que de 96 h afin de conserver des conditions linéaires de réaction. De plus, l'activité de déacétylation des enzymes mutées au niveau des résidus histidine a été complètement annulée sauf pour l'enzyme AxeA<sub>ir</sub>-H68A qui a conservé environ 75 % de l'activité de l'enzyme sauvage. La mutation des résidus aspartiques localisés proche du site catalytique a provoqué une diminution de l'activité glycosidique sauf dans le cas du résidu D130 avec une hausse de plus de 300 % de l'activité spécifique, mais une perte complète de l'activité de déacétylation. À noter que les mutations E121A et D125A ont montré une baisse de l'activité glycosidique de 75 % et 35 % respectivement alors que l'activité de déacétylation de ces enzymes était essentiellement la même comparativement à l'enzyme sauvage. La mutation du résidu D156 a provoqué une diminution de 40 % de l'activité de déacétylation et de 50 % de l'activité glycosidique.

### **3.2.8 Alignement de séquences protéiques de GH avec l'AxeA<sub>ir</sub>**

Afin d'identifier les résidus catalytiques potentiellement impliqués dans l'activité glycosidique, des alignements de séquences avec des GH de streptomycètes des familles 18, 19 et 46 ont été effectués. Les séquences employées ont été ciblées dans le but d'augmenter les chances de trouver certaines homologies qui pourraient fournir quelques indices sur l'activité observée. Les résultats d'alignements avec les GH-18 n'ont montré aucune homologie significative de séquence avec une homologie de moins de 7 % (figure 24). L'alignement avec des GH-19 de streptomycètes n'a pas démontré d'homologie de séquence significative non-plus mis à part pour certains résidus hydrophobes (V122, W124 et W131, numérotation de l'AxeA<sub>ir</sub>) (figure 25). Aucune homologie n'est cependant observée entre les résidus catalytiques (D12, D13 et H155) de l'AxeA<sub>ir</sub> et ceux des GH-19 contenus dans le motif catalytique conservé au sein de cette famille. Enfin, l'alignement avec des chitosanases de la famille GH-46 montre une certaine homologie de résidus aspartiques, mais les résidus catalytiques

des chitosanases ne sont pas conservés chez l'AxeA<sub>1r</sub> et l'homologie de séquence est relativement faible de moins de 23 % (figure 26).

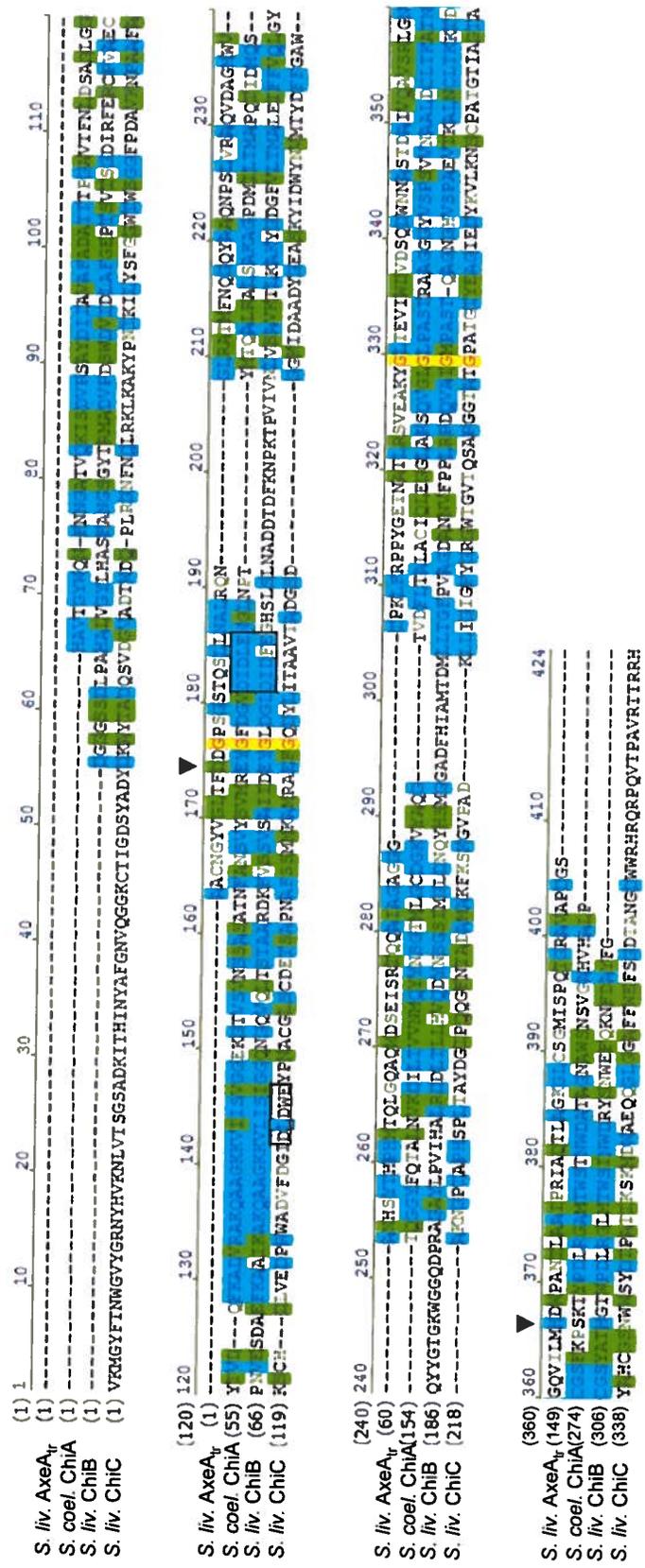


Figure 24. Alignement de séquences protéiques partielles de chitinasés de la famille GH-18 de streptomycètes avec l'AxeA<sub>tr</sub> (*S. liv.* AxeA<sub>tr</sub>), acétyl-xylane estérase A tronquée de *S. lividans* 1326 (a.a. 42-240). (*S. coel.* ChiA), séquence du domaine catalytique ChiA (SCO5003) de *S. coelicolor* (a.a. 281-566). (*S. liv.* ChiB), domaine catalytique de ChiB de *S. lividans* 1326 (a.a. 277-608). (*S. liv.* ChiC), domaine catalytique de ChiC de *S. lividans* TK64 (a.a. 243-594). Le motif catalytique des GH-18 est encadré en noir. Les résidus catalytiques de l'AxeA<sub>tr</sub> sont identifiés par des flèches. Les résidus identiques sont surlignés en jaune et les résidus conservés en cyan. Le motif catalytique des GH-18 est encadré en noir. Les alignements similaires sont surlignés en vert. Alignement de séquences effectué à l'aide du logiciel Vector NTI version 10.0.



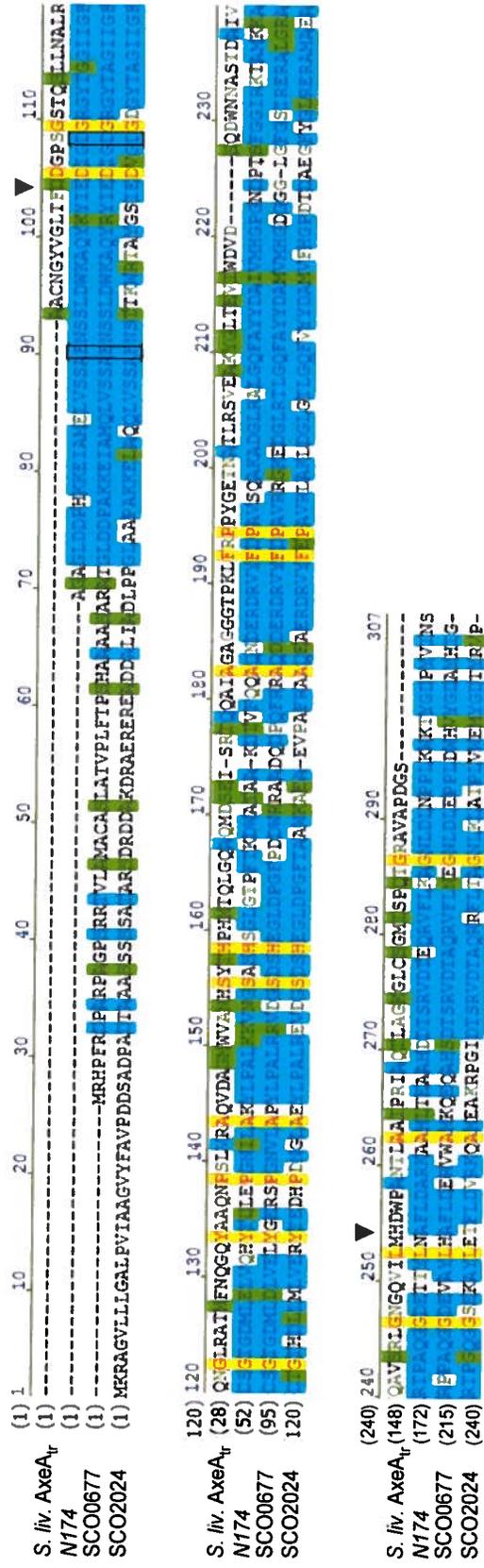


Figure 26. Alignement de séquences protéiques partielles de chitosanases de la famille GH-46 de streptomycètes avec l'AxeA<sub>tr</sub> (*S. liv.* AxeA<sub>tr</sub>), acétyle-xylane estérase A tronquée de *S. lividans 1326* (a.a. 42-240). (N174), séquence du domaine catalytique de la chitosanase de *Streptomyces sp. N174* (a.a. 41-278). (SCO0677), chitosanase de *S. coelicolor*. (SCO2024), chitosanase SCO2024 de *S. coelicolor*. Les résidus catalytiques des GH-46 sont encadrés en noir. Les résidus catalytiques de l'AxeA<sub>tr</sub> sont identifiés par des flèches. Les résidus identiques sont surlignés en jaune et les résidus conservés en cyan. Les alignements de résidus similaires sont surlignés en vert. Alignement de séquences effectué à l'aide du logiciel Vector NTI version 10.0.

### 3.2.9 Modélisation de positionnement de substrat

Afin d'aider à identifier des résidus potentiellement impliqués dans l'activité glycosidique, une simulation de positionnement de chitotriose au sein de l'AxeA<sub>tr</sub> a été effectuée. En se basant sur des études similaires effectuées avec d'autres CE-4, nous avons employé l'acétate lié dans la structure cristalline de l'AxeA<sub>tr</sub> (PDB 2CC0) comme point de repère pour aligner une molécule de substrat. La simulation a été effectuée à partir d'une molécule de chitotriose cristallisée et de la structure de l'AxeA<sub>tr</sub>. La modélisation obtenue donne trois sites de liaison (-1, 0, +1) en accord avec la nomenclature adaptée par Tokuyasu et collaborateurs (2000) pour décrire les CE. Selon cette nomenclature, la déacétylation se déroulerait au résidu central situé au sous-site 0. Le substrat positionné aligne les groupements acétyles des résidus -1 et +1 vers l'extérieur du sillon catalytique alors que l'acétyle du résidu 0 forme des liens de coordination avec l'atome de zinc lié. De plus, la simulation montre un positionnement du groupement acétyle en accord avec la position de la molécule d'acétate libre liée au site catalytique. Le positionnement permet de constater qu'il y a des interactions d'empilement hydrophobe entre les résidus du substrat et les résidus hydrophobes exposés aux solvants (Y103, W124 et W131). À partir des résultats de l'analyse de l'état anomérique des produits d'hydrolyse (voir article), nous proposons une modélisation de liaison du substrat au sein de l'enzyme pour l'activité glycosidique. Selon la nomenclature des GH, trois sites de liaison sont observés (-1, +1, +2) avec l'hydrolyse ayant lieu entre les sous-sites -1 et +1 (Davies *et al.*, 1997). Cette modélisation montre que le résidu D13 est en alignement avec l'oxygène du lien  $\beta(1\rightarrow4)$  entre les résidus -1 et +1 du substrat alors que le résidu D12 est en alignement avec l'oxygène du lien entre les résidus +1 et +2.

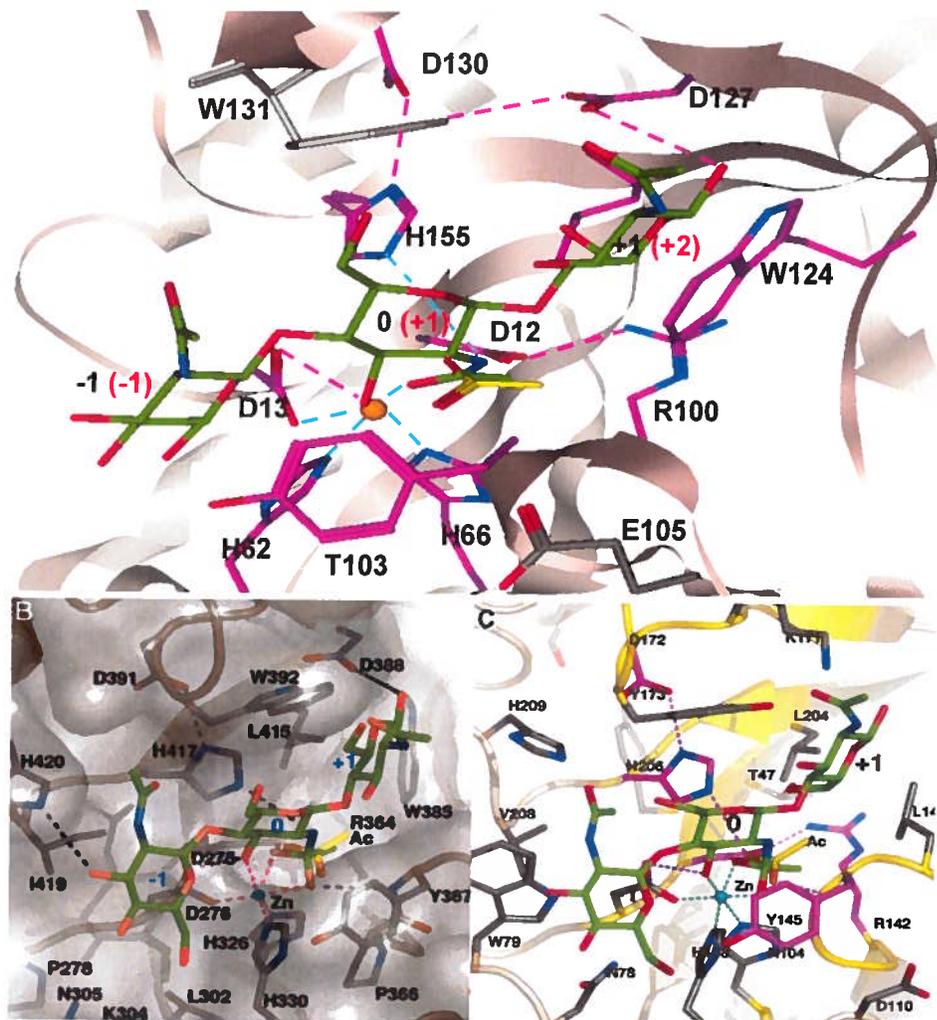


Figure 27. Positionnement du chitotriose au sein du site catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub>. A, modélisation du positionnement du chitotriose au site catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub>. (GlcNAc)<sub>3</sub> est représenté en bâtonnets verts avec les sous-sites (-1, 0, +1) pour l'activité de déacétylation (en noir) et les sous-sites (-1, +1, +2) pour l'activité glycosidique (en rouge). Les résidus conservés parmi les CE-4 sont colorés en magenta et les liens hydrogènes sont présentés en lignes brisées magenta. L'atome de zinc est présenté en orange et les interactions de coordination sont en lignes brisées bleu cyan. La simulation a été effectuée à l'aide du logiciel MOE v8.0 à partir des dossiers PDB 2CC0 (AxeA<sub>tr</sub>) et de la structure du ligand (PDB 1T0W). Le positionnement du ligand a été effectué en comparaison avec des études similaires et en utilisant l'acétate liée (en jaune) comme point de référence. B, modélisation de la PgdA de *S. pneumoniae* (Blair *et al.*, 2005). C, modélisation de la CDA de *C. lindemuthianum* (Blair *et al.*, 2006).

## **4. Discussion**

## 4.1 Activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub>

### 4.1.1 Déacétylation de chitooligosaccharides par l'AxeA<sub>tr</sub>

La caractérisation de l'activité de déacétylation de l'enzyme sauvage a montré une déacétylation partielle des divers chitooligosaccharides avec un rendement maximal de 45 % pour le chitohexaose. Le rendement de déacétylation était proportionnel au DP avec une préférence marquée pour des oligomères de quatre résidus ou plus. Plusieurs études ont prouvé la préférence des CE-4 en général par rapport aux substrats polymériques. Ceci a été particulièrement bien démontré pour les CDA qui nécessitent au moins un trimère pour déacétyler, mais qui préfèrent des oligosaccharides plus longs (Tsigos *et al.*, 1999; Tokuyasu *et al.*, 2000; Martinou *et al.*, 2002; Hekmat *et al.*, 2003). Par exemple, l'étude cristallographique de la CDA de *C. lindemuthianum* a permis de démontrer la présence de quatre sous-sites de liaison au substrat (sites -2, -1, 0 et +1 selon la nomenclature de l'auteur) qui assurent la reconnaissance de substrats tétramériques ou plus longs (Blair *et al.*, 2006).

Les rendements de déacétylation mesurés étaient très semblables à ce qui a été rapporté antérieurement avec des techniques de mesures indirectes (Caufrier *et al.*, 2003; Morley *et al.*, 2006; Nisole *et al.*, 2006). Ceci confirme l'efficacité de l'approche HPLC comme outil pour analyser quantitativement et qualitativement l'activité de déacétylation de la chitine de diverses enzymes. De plus, les activités spécifiques déterminées étaient aussi semblables à ce qui a été rapporté antérieurement selon des conditions similaires (Puchart *et al.*, 2006). Néanmoins, l'activité spécifique mesurée envers le (GlcNAc)<sub>6</sub> était au moins 2000 fois plus faible que l'activité spécifique de l'AxeA<sub>tr</sub> envers l'acétyl-xylane (170 IU/mg) (Taylor *et al.*, 2006). Ceci confirme la nature secondaire de l'activité de déacétylation de la chitine par l'AxeA<sub>tr</sub>. Il est tout de même intéressant de constater que l'activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub> envers la cellulose acétate (CA) était plus faible (31% de déacétylation après 102h, (Altaner *et al.*, 2003)) que son activité de déacétylation envers la chitine, un phénomène intrigant pour une enzyme impliquée dans un système xylanolytique.

La déacétylation d'oligomères de chitine par l'AxeA<sub>tr</sub> montre clairement un patron de déacétylation partielle. L'ajout d'enzyme fraîche supplémentaire n'a pas permis d'augmenter les rendements mesurés ce qui confirme que la déacétylation partielle n'est pas due à une inactivation de l'enzyme mais plutôt à un patron de déacétylation partiel dont le positionnement des groupements acétyles restant empêche la déacétylation complète. Ceci pourrait s'expliquer par la nécessité de la présence d'au moins deux groupements acétyles sur des résidus précis afin de positionner le substrat selon une orientation productive (Tokuyasu *et al.*, 2000). La déacétylation de chitooligosaccharides par la CDA de *C. lindemuthianum* a montré un patron de déacétylation partielle qui serait dû à la forte reconnaissance de deux sous-sites (-2 et 0) pour les résidus acétylés (Tsigos *et al.*, 1995). Or, le positionnement de ces sous-sites produirait un patron de déacétylation partiel dont la fonction pourrait être de prévenir une reconnaissance par les chitinases de l'hôte infecté par le phytopathogène (Tokuyasu *et al.*, 2000). Il est possible que ce soit l'une des fonctions de l'activité secondaire de l'AxeA<sub>tr</sub> même s'il n'existe aucun indice métabolique permettant d'étayer cette hypothèse. D'autres CE-4 ont aussi présenté un patron de déacétylation partiel. L'étude du mécanisme de la PgdA de *S. pneumoniae* a permis de démontrer que le chitotriose est toujours déacétylé au résidu du centre en premier et qu'une seule autre déacétylation était ensuite possible laissant le résidu de l'extrémité réductrice acétylé (Blair *et al.*, 2005). L'analyse par spectrométrie de masse de la déacétylation du (GlcNAc)<sub>6</sub> par l'AxeA<sub>tr</sub> confirme ce type de patron avec une forte production initiale d'espèces mono- et di-déacétylées progressant vers une accumulation d'espèces mono- et di-acétylées (figure 21). De plus, il est intéressant de noter que l'accumulation d'espèces tri-acétylées (DP-6 et DP-4) se déroule au début de la réaction et varie très peu par la suite. Ceci semble confirmer que la déacétylation partielle de ces oligomères se fait selon un patron précis qui empêche toute déacétylation subséquente, car le DP-3 totalement acétylé (donc même DA) est efficacement déacétylé en fonction du temps. Le niveau relativement stable dans le temps de DP-2 ne permet pas d'expliquer l'importante hausse de DP-2 mono-acétylée au temps 72 h. Ceci suggère plutôt une production majeure provenant de substrats de DP plus élevé et que l'enzyme a très peu d'affinité pour la déacétylation du DP-2. Il y a tout de même une légère baisse de DP-2 di-acétylé au temps 72 h. L'étude de la

CDA de *C. lindemuthianum* a donné des résultats semblables et a montré que l'enzyme était capable de déacétyler le substrat positionné aux sous-sites (0, +1) mais qu'aucune déacétylation n'était possible avec une liaison aux sous-sites (-1, 0) (Tokuyasu *et al.*, 2000). Bien que la position exacte des groupements acétyles restants soit encore à élucider pour conclure que l'AxeA<sub>ir</sub> agit de façon similaire, l'absence de déacétylation totale semble confirmer la nécessité d'au moins deux groupements acétyles dont l'un doit se situer au site catalytique pour permettre une reconnaissance du substrat.

#### 4.1.2 Activité de déacétylation de mutants rationnels de l'AxeA<sub>ir</sub>

L'alignement de structures tridimensionnelles de CE-4 ayant des spécificités différentes a permis d'identifier rationnellement une région potentiellement impliquée dans la reconnaissance du substrat. Cette région, qui s'étend des résidus E121 à N133, forme une boucle qui couvre le fond et un côté du sillon catalytique et des mutants de chaque résidu de cette boucle ont été produits (figure 19). Elle contient l'un des motifs conservé (motif IV) des CE-4 reconnu pour être impliqué dans la liaison du substrat (Blair *et al.*, 2006). Ainsi, selon des études d'ingénierie protéique rationnelle, les substitutions d'acides aminés situés à proximité d'un site de fixation au substrat seraient propices à modifier la spécificité d'une enzyme (Cedrone *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2005). Les clones produits ont été partiellement purifiés par chromatographie ionique afin d'effectuer un criblage initial de l'activité de déacétylation envers le chitohexaose. Bien qu'il soit possible de retrouver dans le surnageant d'expression d'autres enzymes ayant une activité comparable à l'AxeA<sub>ir</sub> (Bentley *et al.*, 2002), l'analyse préliminaire de l'activité de déacétylation de la chitine de ces mutants a montré une grande variabilité de l'activité de déacétylation qui ne peut être attribuée uniquement à une contamination par d'autres enzymes. Ainsi, certaines tendances sont tout de même observables et permettent d'identifier le rôle potentiel de certains acides aminés dans la reconnaissance du substrat. C'est pourquoi ces résultats préliminaires sont tout de même présentés au lecteur.

Le criblage de l'activité de déacétylation des enzymes mutées envers la chitine a permis d'identifier certains acides aminés essentiels pour le positionnement du substrat et son hydrolyse. La mutation des résidus absolument conservés (à savoir, W124, D130 et W131) a eu un fort impact sur l'activité enzymatique (tableau 7). La mutation du résidu conservé D130 par un résidu hydrophobe a complètement inhibé l'activité de déacétylation. Plusieurs études ont démontré l'importance de ce résidu au sein des CE-4, car sa proximité avec un résidu catalytique histidine (lui aussi conservé) permettrait d'abaisser substantiellement le  $pKa$  de ce dernier, lui assurant ainsi une fonction de résidu catalytique acide (Blair *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006; Puchart *et al.*, 2006). Les résidus hydrophobes W124 et W131 sont clairement exposés au solvant au sein du site catalytique et participeraient à d'importantes interactions aromatiques avec les hexoses (Taylor *et al.*, 2006). D'ailleurs, la mutation de ces résidus en phénylalanine rétablit l'activité de déacétylation de la chitine à 54 % et 10 % pour les enzymes  $AxeA_{ir}$ -W124F et  $AxeA_{ir}$ -W131F respectivement alors que les enzymes  $AxeA_{ir}$ -W124A et  $AxeA_{ir}$ -W131A n'avaient pratiquement pas d'activité. De plus, les enzymes  $AxeA_{ir}$ -W124Y et  $AxeA_{ir}$ -W131Y avaient respectivement 20 % et 18 % d'activité, ce qui suggère qu'une faible polarité est aussi nécessaire. Étonnamment, l'enzyme  $AxeA_{ir}$ -W124S montrait 45 % d'activité par rapport à l'enzyme sauvage, soit plus du double de la mutation W124Y, ce qui suggère que la présence d'un groupement polaire à un endroit bien précis est aussi importante que celle du groupement aromatique pour interagir favorablement avec le substrat. Le résidu D127 est relativement conservé au sein des CE-4 et totalement conservé au sein de l'alignement de CDA choisies. Certaines études de simulation de liaison de chitotriose montrent que ce résidu formerait d'ailleurs un lien hydrogène avec l'extrémité réductrice du substrat, mais aussi qu'il forme un lien de coordination avec le résidu W131 (Blair *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006). Ce résidu aurait donc une importance essentielle dans le positionnement du substrat au sein du site catalytique et pourrait expliquer la différence d'activité produite par les mutations similaires W124F et W131F. À l'inverse, le résidu D125 est relativement peu conservé au sein même des CDA étudiées et est orienté dans une direction opposée au sillon catalytique. Il a donc peu de chance d'interagir avec le substrat ce qui expliquerait le peu d'impact résultant de sa mutation. Le résidu E121 est quant à lui

unique à l'AxeA<sub>tr</sub> et la plupart des CE-4 possèdent un résidu hydrophobe en lieu, ce qui pourrait expliquer la légère augmentation d'activité observée chez l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-E121A. Le résidu V122 est cependant relativement conservé quant à lui au sein des CE-4 qui possèdent toutes en fait un résidu hydrophobe à cette position. Fait remarquable, la diminution de l'encombrement stérique provoquée par la mutation V122A a permis une hausse significative de l'activité de déacétylation de la chitine de près de 25 %. Ce résidu forme avec les résidus W124 et L153 une poche hydrophobe au sein de laquelle se trouve le résidu conservé R100 qui coordonne le résidu catalytique D12 (figure 19) (Blair *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). Cette poche sert également à accueillir le groupement méthyle de l'acétate. Il est possible que la réduction de l'encombrement stérique permette un meilleur positionnement du groupement méthyle tout en conservant la modulation essentielle par le résidu R100. La mutation du résidu S128 par une alanine a aussi augmenté significativement l'activité enzymatique. Or, les alignements de séquences de CE-4 montrent qu'il y a absence de consensus des résidus occupant cette position (Blair *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2009). Néanmoins, l'alignement de séquences de CDA de CE-4 (figure 20) montre qu'elles possèdent toutes un résidu thréonine en lieu de la sérine. Ceci suggère qu'une interaction polaire non-chargée serait toutefois nécessaire dans cette région afin de bien positionner les substrats chitineux. La hausse de l'activité de déacétylation de la chitine par l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-S128A pourrait s'expliquer par le fait que le résidu S128 se trouve à 3,8Å du résidu D130 suggérant fortement une interaction polaire entre les deux. La présence d'un résidu alanine pourrait augmenter l'hydrophobicité autour du résidu D130 ce qui aurait comme impact d'augmenter sa capacité à coordonner le *pKa* du résidu catalytique H155. Enfin, la mutation du résidu N132 en alanine est la modification qui a eu le plus d'impact au niveau de l'activité avec une augmentation de près de 29%. Fait étonnant, les résidus N132 et N133 ne sont pas conservés au sein des CE-4, mais la plupart des enzymes possèdent un résidu polaire à la position de l'arginine 132 de l'AxeA<sub>tr</sub>. La CDA de *C. lindemuthianum* possède même un résidu carboxylique acide en lieu de l'arginine. Il est possible que les résidus de cette position forment des interactions avec la chaîne latérale du résidu tryptophane proximal (W131) et que l'insertion d'un résidu hydrophobe favorise une orientation plus adéquate de ce dernier avec le

substrat. Bien que certaines enzymes mutées montrent une hausse du rendement de déacétylation, aucune n'a semblé capable de totalement déacétyler le chitohexaose, ce qui confirme le mécanisme de déacétylation partielle de l'AxeA<sub>tr</sub>. Or, certaines CDA très semblables à l'AxeA<sub>tr</sub> sont capables de déacétyler complètement certains substrats, il est donc fort probable que de légères différences au sein de plusieurs sous-sites de liaison soient responsables du patron de déacétylation (Blair *et al.*, 2006). Ceci impliquerait une approche rationnelle plus complexe ciblant plusieurs régions du site catalytique. Bien que ces résultats soient intéressants, il resterait néanmoins à les confirmer avec des essais enzymatiques employant des enzymes pures. De plus, l'étude de double-mutants permettrait peut-être d'éclaircir plus en détail les interactions avec les oligomères de chitine.

## 4.2 Activité glycosidique de l'AxeA<sub>tr</sub>

Lors de l'analyse de l'activité de déacétylation par HPLC, plusieurs signaux correspondants à des oligosaccharides ont été observés. Ces signaux augmentaient au fur et à mesure que celui du substrat initial diminuait (figure 14). La concentration d'acétate libérée n'était pas suffisante pour expliquer la disparition du substrat. De plus, les temps de rétention observés correspondaient exactement aux temps de rétention d'oligomères de chitine purs. Ceci prouvait qu'il y avait bel et bien une activité de déacétylation mais aussi glycosidique concomitante, une activité encore jamais répertoriée au sein des CE-4 à notre connaissance. L'analyse de l'activité enzymatique du clone sauvage sur 24h a montré qu'en fait, la déacétylation et la l'hydrolyse se déroulent bel et bien de façon concomitante dès les premiers instants d'incubation (figure 22). Ceci complique l'analyse de l'activité glycosidique, car il est difficile de déterminer dans de telles conditions si l'enzyme déacétyle d'abord le substrat pour ensuite le cliver, ce qui indiquerait une activité chitosanolytique, ou bien si l'enzyme coupe les substrats acétylés pour ensuite les déacétyler, ce qui signifierait une activité chitinolytique. Néanmoins, l'étude du mutant D130A (sans activité de déacétylation) a permis de conclure que l'activité glycosidique est bel et bien une activité chitinolytique. L'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A a donc été tout naturellement

employée afin de mieux caractériser l'activité glycosidique observée, car elle permettait d'analyser «séparément» les deux activités. Ainsi, les essais enzymatiques avec divers substrats chitineux ont montré que l'enzyme sauvage et l'enzyme  $AxeA_{tr}$ -D130A n'étaient actifs qu'envers les substrats totalement acétylés même si l'enzyme sauvage avait une affinité à déacétyler le chitosane (tableau 5).

#### **4.2.1 Activité glycosidique de l'enzyme sauvage et de l'enzyme $AxeA_{tr}$ -D130A durant la phase initiale de la réaction**

L'analyse de l'activité enzymatique sur 24h de l'enzyme sauvage montre qu'il y a production initiale de DP-2 et DP-3, mais aucune production de DP-4 jusqu'à la 8<sup>e</sup> heure d'incubation. Ceci suggère que le DP-4 formé initialement est immédiatement hydrolysé en deux molécules de DP-2. Il est possible que l'activité de déacétylation soit l'une des causes de ce phénomène, car l'enzyme  $AxeA_{tr}$ -D130A montre un patron d'hydrolyse différent avec la production égale de DP-2, DP-3 et DP-4 dès les premiers instants. Ainsi, le DP-4 produit par l'enzyme sauvage pourrait être un substrat adéquat pour une déacétylation exhaustive (mais partielle) produisant un produit indétectable par l'approche HPLC. Néanmoins, le patron initial d'hydrolyse de l'enzyme sauvage et de l'enzyme  $AxeA_{tr}$ -D130A montre que l'enzyme agit comme une endo-chitinase. L'incubation avec des substrats polymériques de chitine confirme aussi ce mode avec la production de chitobiose et de chitotriose uniquement. Il est intéressant toutefois de constater que l'enzyme produit du chitobiose de façon quasi-linéaire peu importe le DP du substrat employé. Ceci suggère que la production de DP-3 pourrait en fait être une conséquence due à deux modes de liaison du substrat au sein du site catalytique.

La confirmation d'une activité chitinolytique de type endo-chitinase, bien qu'intéressante, ne permet pas de déterminer le mécanisme d'action impliqué. L'identification du mécanisme est importante car elle permet d'orienter les manipulations permettant l'identification potentielle de résidus catalytiques. Ainsi, le mécanisme anchimérique de rétention retrouvé chez les GH-18 n'implique pas nécessairement la participation d'un deuxième résidu carboxylate alors que le mécanisme de simple inversion des GH-19 implique la participation de deux résidus

carboxyliques séparés spatialement d'au moins 9Å (Fukamizo, 2000). Dans le but de caractériser le mécanisme impliqué, l'enzyme sauvage et l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A ont été incubés en présence d'allosamidine, un puissant inhibiteur spécifique aux GH-18 (figure 23) (Andersen *et al.*, 2005). L'absence de différence significative de l'activité glycosidique en présence de fortes concentrations d'allosamidine suggère que l'enzyme agirait par un mécanisme d'inversion semblable à celui retrouvé chez les GH-19. Qui plus est, la présence d'allosamidine semble même stimuler légèrement l'activité glycosidique de l'enzyme sauvage et de l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A ce qui suggère qu'elle est effectivement employée comme substrat. Toutefois, l'absence d'inhibition par l'allosamidine ne signifie pas que l'enzyme agit nécessairement par un mécanisme de simple inversion. En effet, certains lysozymes sont reconnus pour ne pas être inhibés par l'allosamidine alors qu'ils hydrolysent la chitine par un mécanisme de double-inversion menant à la rétention du carbone anomérique tout comme les GH-18 (Fukamizo, 2000). L'étude de l'isomère du carbone anomérique des produits d'hydrolyse du chitohexaose par l'enzyme AxeA<sub>tr</sub>-D130A a permis de conclure que la forme  $\alpha$  du C-1 de l'extrémité réductrice était dominante pour les espèces DP-3 et DP-4 alors que le DP-2 avait un ratio plus proche de celui du substrat initial (figure 16). Outre un indice probant de la présence d'un mécanisme d'hydrolyse par inversion, ces résultats semblent suggérer que l'hydrolyse se déroule à partir du second lien glycosidique à partir de l'extrémité réductrice. Néanmoins, l'étude de l'hydrolyse de substrats artificiels possédant un groupement *p*-nitrophényle n'a pas permis de corroborer ces observations. D'autres études avec des substrats artificiels plus longs (ex. (GlcNAc)<sub>4</sub>-*p*NP)) pourraient permettre de contrer la faible affinité de l'AxeA<sub>tr</sub> pour le résidu phényle et ainsi confirmer l'orientation du substrat au sein du site catalytique lors de la glycolyse. Il est toutefois plausible de conclure que le mécanisme d'hydrolyse de l'AxeA<sub>tr</sub> emploie bel et bien un mécanisme de simple inversion peut-être semblable à ce qui est retrouvé chez les chitinases GH-19 et les chitosanases GH-46. Ce mécanisme impliquerait donc la présence de deux résidus carboxyliques situés à au moins 9-10 Å de part et d'autre du lien glycosidique pour permettre une activation nucléophile d'une molécule d'eau qui attaquerait par le côté  $\alpha$  du carbone anomérique.

#### 4.2.2 Activité glycosidique d'enzymes mutées de l'AxeA<sub>tr</sub>

Afin d'identifier les résidus potentiellement impliqués dans l'activité glycosidique, des mutants produits lors d'une étude antérieure ont aussi été exprimés et purifiés (tableau 8). Les mutations induites ciblaient des acides aminés conservés au sein des CE-4 et ont permis de confirmer les résidus impliqués dans l'activité de déacétylation de l'AxeA<sub>tr</sub>. Les résultats ont montré que les résidus de coordination D13, H62 et H66 étaient essentiels à l'activité de déacétylation et que les résidus D12 et H155 seraient impliqués dans le bris du lien ester du substrat selon un mécanisme acido-basique classique (Puchart *et al.*, 2006). Ces mutants ainsi que des mutants des résidus aspartiques de la boucle E121 à N133 ont été sélectionnés pour la caractérisation de leur activité glycosidique envers le chitohexaose. La mutation du résidu catalytique D12 et du résidu de coordination D13 a grandement affecté l'activité glycosidique en plus d'annuler complètement l'activité de déacétylation. La mutation D13A a provoqué une baisse drastique d'activité avec une réduction d'un facteur dix par rapport à l'enzyme sauvage. Ceci pourrait confirmer l'implication de ces résidus dans l'activité glycosidique où le résidu D13 aurait un rôle central. La présence d'une activité résiduelle si minime soit elle peut être due à la proximité (5 Å) de ces deux résidus acides où l'un peut compenser pour la mutation de l'autre et vice-versa. Un tel phénomène a d'ailleurs été observé récemment chez des enzymes mutées de la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174 (Lacombe-Harvey *et al.*, 2009). Les résidus D12 et D13 sont aussi de bons candidats pour activer une molécule d'eau qui pourrait attaquer par le côté  $\alpha$  du carbone C1. Les résidus correspondant à l'aspartate D12 chez les CE-4 sont reconnus comme agissant comme base générale permettant l'activation d'une molécule d'eau (Blair *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2006; Puchart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). De plus, ce résidu est coordonné par une arginine conservée (R100) enfouie dans une poche hydrophobe, un arrangement aussi retrouvé au sein du site catalytique des GH-19 et des GH-46 (Fukamizo, 2000; Fukamizo *et al.*, 2000). Il est fort probable que ces résidus soient impliqués dans l'activation de la molécule d'eau permettant l'hydrolyse par simple inversion du lien labile. Lacombe-Harvey et collaborateurs (2009) ont employé une approche élégante pour identifier les résidus agissant comme base générale dans le mécanisme d'inversion. En effet, il a été

démontré que l'activité de mutants de résidus agissant comme base catalytique pouvait être rétablie par l'ajout d'azote de sodium (Miyake *et al.*, 2002). Une telle approche pourrait être envisagée afin de pouvoir identifier le résidu basique impliqué dans l'activité glycosidique. Néanmoins, l'étude des mutants D12 et D13 permet de confirmer que l'activité glycosidique observée chez l'AxeA<sub>ir</sub> et ses mutants n'est pas due à la contamination par d'autres chitinases constitutives, mais bien à l'enzyme AxeA<sub>ir</sub> même.

Il est intéressant de constater que le fait de muter les résidus histidines proche du site actif augmente drastiquement l'activité glycosidique tout en inhibant l'activité de déacétylation. En fait, les enzymes AxeA<sub>ir</sub>-H62A et AxeA<sub>ir</sub>-H66A ont une activité glycosidique tellement élevée que tout le substrat initial a été consommé en un peu plus de 8 h d'incubation, alors qu'il restait 10 % du substrat disponible après 96h d'incubation pour l'enzyme sauvage. Les positions occupées par les résidus D13, H62 et H66 forment la triade de liaison de métaux divalents chez les CE-4 et sont absolument conservés au sein de cette famille (Puchart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006). Il n'est donc pas surprenant que leur mutation provoque une perte totale de l'activité de déacétylation puisque les CE-4 sont des enzymes métal-dépendantes. Néanmoins, la mutation du résidu H68, qui n'est pas impliqué dans la coordination du métal, a aussi grandement augmenté l'activité glycosidique. Qui plus est, la mutation du résidu D130 a aussi provoqué une augmentation significative de l'activité glycosidique. Or, ce résidu est impliqué dans la coordination du résidu catalytique H155 en ajustant son *pKa* pour permettre d'agir comme acide général dans l'activité de déacétylation (Blair *et al.*, 2005). Ainsi, toutes les mutations ayant un impact sur les résidus histidines proches du site catalytique ont grandement augmenté l'activité glycosidique, que ces résidus soient catalytiques, de coordination ou bien simplement capables de former un lien hydrogène avec le substrat comme le résidu H68. Il est possible que ces résidus participent à un positionnement du substrat essentiel à l'activité de déacétylation, mais qui entreraient en «compétition» avec l'activité glycosidique. Ceci expliquerait la forte hausse d'activité glycosidique observée lorsque l'activité de déacétylation est nulle. Biely et collaborateurs (2007) ont démontré que le groupement hydroxyle en C3 du substrat formait un lien hydrogène

avec l'ion de coordination assurant un positionnement du substrat essentiel à l'activité de déacétylation. Il est possible donc que le fait de muter les résidus H62 et H66 empêche la liaison du cofacteur et permette une plus grande liberté de positionnement au sein du site catalytique. Néanmoins, l'étude de l'activité glycosidique en présence d'EDTA n'a pas permis de démontrer une amélioration de l'activité glycosidique, ce qui suggère que ce type d'interaction n'est pas suffisant à lui seul pour expliquer le phénomène. Toutefois, l'analyse de la mutation E121A a montré peu d'impact sur l'activité de déacétylation, alors qu'elle réduit fortement l'activité glycosidique. Ceci suggère que ce résidu participe effectivement à un positionnement du substrat beaucoup plus favorable à l'activité glycosidique qu'à l'activité de déacétylation. De plus, la même chose est observée avec la mutation du résidu D125 qui n'est pas conservé chez les CE-4. Sa mutation n'affecte pas l'activité de déacétylation de l'enzyme puisqu'il ne participe pas au positionnement du substrat comme le résidu D127 étant donné son orientation. Néanmoins, sa mutation provoque une diminution de moitié de l'activité glycosidique, suggérant qu'il pourrait jouer un rôle dans un positionnement favorisant l'activité glycosidique. L'hypothèse des deux positionnements pourrait aussi expliquer la libération de DP-3 et de DP-2 par l'enzyme. Il est cependant évident que des études plus poussées impliquant des doubles mutants seront nécessaires pour corroborer cette hypothèse.

### **4.3 L'identification de résidus catalytiques potentiels**

#### **4.3.1 Alignements de séquences partielles de GH avec l'AxeA<sub>tr</sub>**

Les streptomycètes sont considérés comme étant les principaux décomposeurs de la chitine dans le sol. Aussi, l'analyse du génome du premier représentant, *S. coelicolor*, a montré, outre la présence d'une dizaine de CE-4 présomptives, la présence de nombreuses chitinases ainsi que quelques chitosanases (Bentley *et al.*, 2002). Il est donc possible que l'activité glycosidique de l'AxeA<sub>tr</sub> résulte d'une homologie commune avec certaines GH. Dans le but d'identifier des résidus catalytiques impliqués dans cette activité, des alignements de séquences avec des

chitinases et chitosanases de *S. coelicolor* et *S. lividans* ont été effectués (figures 24 à 26). La structure  $(\alpha/\beta)_8$  déformée de l'AxeA<sub>tr</sub> suggère une homologie avec les chitinases GH-18. De plus, la proximité des résidus D12 et D13 (5 Å) suggère un mécanisme d'hydrolyse par rétention similaire à ce qui est retrouvé chez les lysozymes de la famille GH-22. Toutefois, l'analyse des produits d'hydrolyse a confirmé un mécanisme d'inversion apparenté aux GH-19 et aux GH-46. Aussi, l'alignement de séquences a montré beaucoup plus d'homologie avec les GH-19 que les GH-18. Néanmoins, aucun alignement significatif des résidus conservés des GH-19 n'a été observé avec l'AxeA<sub>tr</sub>. Il est cependant intéressant de constater que les résidus conservés des CE-4 W124 et W131 s'alignent avec des résidus équivalents des GH-19. Or, ces résidus sont reconnus pour s'aligner avec les cycles pyranosiques des résidus du substrat par des interactions hydrophobes. Plusieurs résidus carboxylates de l'AxeA<sub>tr</sub> s'alignent avec ceux des GH-46, mais il n'y a pas de correspondance entre les résidus catalytiques des deux familles. Il y a cependant concordance entre le résidu catalytique D12 de l'AxeA<sub>tr</sub> et un résidu catalytique «accessoire» de la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174. En effet, la substitution du résidu catalytique D40 de la chitosanase par une glycine inhibait fortement l'activité chitosanolytique tout en conservant une activité résiduelle significative, un phénomène semblable à ce qui a été observé pour les enzymes mutées D12A et D13A de l'AxeA<sub>tr</sub>. L'étude de doubles mutants D40G-E36Q a permis d'identifier que le résidu E36 était suffisamment bien orienté et positionné au sein du site actif de l'enzyme mutée D40G pour agir comme base catalytique secondaire et compenser en partie la perte du résidu catalytique (Lacombe-Harvey *et al.*, 2009). Il est possible aussi que l'alignement de ces résidus «secondaires» soit une coïncidence, cependant ceci pourrait expliquer l'observation d'un phénomène de substitution apparente du rôle catalytique entre les résidus D12 et D13 de l'AxeA<sub>tr</sub> tel que mentionné précédemment. Néanmoins, l'absence d'homologie significative des résidus clés suggère plutôt une homologie de structure qui pourrait expliquer l'activité glycosidique observée. Il est bien connu que les lysozymes, les chitinases et les chitosanases forment une «super-famille» de GH malgré l'absence totale d'homologie de séquence entre les familles. En effet, ces GH ont toutes gardées une homologie de structure avec un «noyau» invariable formé de deux hélices- $\alpha$  et d'un feuillet- $\beta$  (Monzingo *et al.*, 1996). Cependant, le site

catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub> est surtout formé de boucles  $\beta$  parallèles alors que les hélices  $\alpha$  sont rassemblées dans la couronne extérieure, un arrangement très différent de ce qui est retrouvé chez les GH avec la présence de deux domaines globulaires de part et d'autre du site catalytique (Fukamizo, 2000). Les alignements de structure n'ont d'ailleurs démontré aucune homologie de structure significative entre l'AxeA<sub>tr</sub> et certaines GH (résultats non-présentés).

#### 4.3.2 Modélisation du positionnement du chitotriose

Plusieurs études antérieures ont permis de résoudre les structures tridimensionnelles des CE-4. Blair et collaborateurs (2005; 2006) ont d'ailleurs procédé à des simulations de positionnement de chitotriose au sein du site catalytique de la PgdA de *S. pneumoniae* et de la CDA de *C. lindemuthianum*. À partir de ces simulations, nous avons produit un modèle de positionnement du chitotriose dans le sillon catalytique de l'AxeA<sub>tr</sub>. Tokuyasu et collaborateurs (2000) ont proposé une nomenclature du site catalytique des CE-4 basée sur une modification de la nomenclature appliquée aux sous-sites des GH. La figure 27 montre le positionnement du chitotriose à au moins trois sous-sites (-1, 0, +1) de l'AxeA<sub>tr</sub> selon la nomenclature employée pour décrire les CE-4. Le modèle proposé est en accord avec la déacétylation du substrat au site «0» et montre aussi un positionnement adéquat pour permettre une hydrolyse du lien glycosidique. Les résultats de l'analyse du carbone anomérique ont suggéré que l'hydrolyse se produisait au second lien glycosidique à partir de l'extrémité réductrice. Ainsi, la nomenclature des GH a été appliquée à ce modèle avec les sous-sites (-1, +1 et +2) et l'action hydrolytique se déroulant entre les résidus -1 et +1. Le modèle proposé montre que les résidus D13 et D12 sont tous les deux en position idéale pour activer une molécule d'eau du côté  $\alpha$  du lien labile, mais le résidu D13 est placé directement face à l'oxygène du lien  $\beta(1\rightarrow4)$  entre les résidus -1 et +1. Ceci semble confirmer que le résidu D13 agirait comme base catalytique, un résultat corroboré par l'activité mesurée avec le mutant D13A. Néanmoins, le résidu D12 possède déjà le rôle d'activateur dans l'activité de déacétylation et pourrait expliquer l'apparente «compétition» menant à la formation de DP-2 et de DP-3. Des

études plus poussées seront nécessaires afin de départager les rôles respectifs de ces deux résidus aspartate.

Le mécanisme d'inversion observé chez les GH-19 et les GH-46 implique la participation d'un second résidu aspartique acide afin de donner un lien hydrogène à l'oxygène du lien labile. La modélisation du positionnement du chitotriose et l'étude de l'activité glycosidique des mutants aspartiques suggère que les résidus étudiés n'auraient pas les caractéristiques d'un résidu catalytique. Néanmoins, le résidu E105 se situe approximativement à 12,5 Å des résidus D12 et D13. Bien que cette distance soit plus grande que la moyenne observée chez les GH-19, l'étude de la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174 a montré que les deux résidus catalytiques étaient séparés par une distance de 13,8 Å (Fukamizo *et al.*, 1997). Néanmoins, le résidu E105 est trop loin (~7,5 Å) de l'oxygène du lien glycosidique pour permettre de donner un lien hydrogène. De plus, l'encombrement stérique du résidu Y103 empêche la protonation directe. Le rôle catalytique du résidu E105 ne serait possible que si l'enzyme adopte une certaine liberté de conformation permettant un rapprochement de l'aspartate vers le substrat. Le résidu E105 est en effet situé sur une boucle- $\beta$  qui pourrait allouer suffisamment de flexibilité pour un tel phénomène. Il n'est pas impossible que les interactions aromatiques entre le résidu Y103 et un anneau pyranose de la molécule de chitotriose participe à ce déplacement. Le rapprochement d'un résidu catalytique éloigné a d'ailleurs été suggéré pour expliquer la distance entre les résidus catalytiques et l'oxygène du lien labile chez la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174 (Marcotte *et al.*, 1996). D'autres études de GH-19 ont aussi suggéré un mécanisme de flexion de l'enzyme et du substrat pour permettre l'hydrolyse (Brameld *et al.*, 1998a). De simples études de mutagenèse dirigée pourront permettre d'identifier le rôle potentiel du résidu E105 dans l'activité glycosidique de l'AxeA<sub>II</sub>.

## **5. Conclusion**

## 5. Conclusion

L'acétyl-xylane estérase A de *S. lividans* est une enzyme capable d'hydrolyser les groupements *O*- et *N*-acétyles de pentoses et d'hexoses. Plusieurs études ont démontré que l'AxeA<sub>lr</sub> peut déacétyler partiellement certains substrats chitineux solubles pour produire du chitosane, un biopolymère employé dans de nombreux domaines. Néanmoins, ces études n'ont pas employé de techniques permettant une compréhension en profondeur du phénomène et ont permis de constater qu'il s'agissait d'une activité secondaire de l'enzyme. Dans le but de mieux comprendre et de potentiellement améliorer cette activité enzymatique, nous avons produit des mutations au sein d'une région du site catalytique potentiellement impliquée dans la spécificité de l'enzyme. Ces mutants ont été analysés par une méthode HPLC simple permettant une analyse quantitative et qualitative des produits réactionnels. Cette approche a permis pour la première fois de découvrir que l'AxeA<sub>lr</sub> possédait aussi une activité glycosidique envers les substrats chitineux.

L'analyse de l'activité de déacétylation de l'enzyme sauvage envers des chitooligosaccharides a montré une déacétylation partielle jusqu'à un maximum de 45 % des groupements disponibles ainsi qu'une préférence pour les substrats ayant un degré de polymérisation de quatre résidus ou plus. Le criblage initial des mutants produits a permis d'identifier des résidus critiques dont la mutation a fait augmenter significativement le rendement maximal de déacétylation, jusqu'à 60 % dans certains cas, sans toutefois permettre une déacétylation complète des substrats employés. Ces résultats prometteurs restent cependant à être confirmés à l'aide d'enzymes homogènes afin d'identifier des mutations pouvant mener à des enzymes plus spécifiques envers les oligomères de chitine. Néanmoins, parmi les mutants produits, il s'est avéré que l'enzyme mutée AxeA<sub>lr</sub>-D130A présentait une perte totale de l'activité de déacétylation, mais avait toutefois une activité glycosidique plus forte que l'enzyme sauvage. Cette enzyme a donc été employée pour caractériser plus en profondeur cette activité inusitée.

L'activité glycosidique s'est avérée être hautement spécifique aux sucres aminés totalement acétylés. L'activité chitinolytique étudiée s'est révélée être du type «endo» avec une nette préférence pour la production de chitobiose et de chitotriose. Cette activité glycosidique était du même ordre que l'activité de déacétylation d'oligomères de chitine ce qui suggère qu'il s'agit en fait de deux activités secondaires concomitantes. Néanmoins, des essais ont montré que l'activité de déacétylation était métal-dépendante alors que l'activité glycosidique ne l'était pas. Ceci suggère que l'enzyme posséderait à tout le moins un second site catalytique employant un autre mécanisme d'hydrolyse. L'étude des mutants des résidus catalytiques impliqués dans l'activité de déacétylation montre que les deux activités impliqueraient plusieurs résidus communs. Certaines différences suggèrent toutefois qu'il pourrait aussi y avoir deux modes de liaison du substrat au sein du sillon catalytique de l'enzyme. La mutation des résidus essentiels pour l'activité de déacétylation provoque une augmentation marquée de l'activité glycosidique ce qui suggère que les deux activités sont en fait en «compétition» au sein du site de liaison du substrat. La mutation des résidus catalytiques D12 et D13 a annulé l'activité de déacétylation et fortement inhibé l'activité glycosidique, ce qui suggère qu'ils pourraient être impliqués dans deux activités en fonction du positionnement du substrat.

Les produits libérés de l'hydrolyse de chitoooligosaccharides possédaient une inversion du carbone anomérique de l'extrémité réductrice, ce qui suggère un mécanisme d'hydrolyse par simple inversion similaire à ce qui est retrouvé chez les chitinases de la famille des glycosides hydrolases 19 et les chitosanases de la famille GH-46. Même si la structure tridimensionnelle de l'AxeA<sub>tr</sub> présente des similitudes avec les GH-18 et qu'elle possède deux résidus aspartiques proches comme chez les GH-22, les alignements de séquences avec des chitinases et chitosanases de familles GH-18, GH-19 et GH-46 n'ont pas montré d'homologies significatives permettant l'identification sérieuse de résidus catalytiques. Il est donc fort probable que l'homologie d'activité avec les GH découle d'une homologie topologique des certains résidus clés au sein du site catalytique. À partir de modélisations de positionnement de chitotriose au sein de CE-4, un modèle a été produit pour l'AxeA<sub>tr</sub> suggérant la

participation d'un second résidu aspartique relativement éloigné du substrat, une conformation similaire à ce qui est observée chez les GH-46.

Bien que ces résultats soient intéressants, il reste beaucoup à faire pour caractériser en profondeur l'activité glycosidique. La mutation des résidus histidine a fortement stimulé (plus de 1500% dans certains cas) l'activité glycosidique et pourrait offrir une piste pour produire des biocatalyseurs plus performants. Il est évident que des études employant un second tour de mutations seront nécessaires afin d'éclaircir le rôle des résidus impliqués et de produire des biocatalyseurs plus performants. Il n'empêche que les deux activités secondaires de l'AxeA<sub>tr</sub> envers les substrats chitineux en font une enzyme à fort potentiel pour la production spécifique d'oligomères de chitosane.

## Annexe A: Communications publiques

### Publications :

#### Manuscrit soumis au journal Protein Science- avril 2009 :

Manuscrit en révision par les pairs.

Titre: Deacetylation and cleavage of chitooligosaccharides by acetyl xylan esterase A of *Streptomyces lividans*.

Auteurs: Guillaume Brault, Vladimir Puchart, François Shareck et Claude Dupont.

Contribution: principal auteur et instigateur des résultats présentés.

#### Preuve de réception du manuscrit :

-----Message d'origine-----

De: onbehalf@scholarone.com [<mailto:onbehalf@scholarone.com>] De la part de jdelaney@uoregon.edu

Envoyé : 21 avril 2009 14:22

À : Dupont, Claude

Objet : Protein Science - Manuscript number PRO-09-0149

21-Apr-2009

Dear Prof. Dupont,

Your manuscript entitled "Deacetylation and cleavage of chitooligosaccharides by acetyl xylan esterase A of *Streptomyces lividans*." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Protein Science. Your manuscript number is PRO-09-0149. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission. You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/proteinscience> . If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Protein Science.

Sincerely,

Protein Science Editorial Office

## Avis de décision de l'éditeur :

### Decision Letter (PRO-09-0149)

**From:** dbeckett@umd.edu

**To:** claude.dupont@laf.inrs.ca

**CC:**

**Subject:** Protein Science - Decision on Manuscript ID PRO-09-0149

**Body:** May 10, 2009

Dear Prof. Dupont,

Manuscript ID PRO-09-0149 entitled "Deacetylation and cleavage of chitooligosaccharides by acetyl xylan esterase A of *Streptomyces lividans*." which you submitted to Protein Science has been reviewed. The comments of the referee(s) are included at the bottom of this letter.

A revised version of your manuscript that takes into account the comments of the referee(s) will be reconsidered for publication. Both reviewers have suggested major revisions that will require additional experiments.

Please note that submitting a revision of your manuscript does not guarantee eventual acceptance, and that your revision may be subject to re-review by the referee(s) before a decision is rendered.

You can upload your revised manuscript and submit it through your Author Center. Log into <http://mc.manuscriptcentral.com/proteinscience> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions".

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the referee(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript.

If you have not already done so, please fill out the attached Copyright Assignment Form and return it via regular mail to the address printed on the form.

**IMPORTANT:** We have your original files. When submitting (uploading) your revised manuscript, please delete the file(s) that you wish to replace and then upload the revised file(s).

Once again, thank you for submitting your manuscript to Protein Science and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,

Prof. Dorothy Beckett  
Associate Editor, Protein Science  
dbeckett@umd.edu

## **Communications par affiche :**

### **Participation au 5<sup>e</sup> WCIBB- avril 2008 :**

Participation par affiche au 5<sup>e</sup> «World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing», Chicago, Illinois, É-U. Congrès du 27 au 30 avril 2008.

Titre: Novel endoglucanase activity from acetyl xylan esterase A of *Streptomyces lividans*.

Auteurs: Guillaume Brault<sup>(1)</sup>, Marie-C. Tang<sup>(2)</sup>, Karen C. Waldron<sup>(2)</sup>, François Shareck<sup>(1)</sup> et Claude Dupont<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> INRS-Institut Armand-Frappier - Microbiologie et Biotechnologie, Laval, Québec, Canada.

<sup>(2)</sup> Université de Montréal - Département de chimie, Montréal, Québec, Canada.

Sujet : Présentation publique d'une nouvelle activité enzymatique secondaire d'une enzyme de la famille des carbohydriques estérases 4 découverte dans le cadre du projet de maîtrise.

Contribution: principal auteur et instigateur des résultats présentés.

## Annexe B: Liste des amorces employés pour la mutagenèse dirigée

Amorces	Séquence de nucléotides
WT N-terminus forward	5'-CACTCGCATGCGTACCAGTACCGGA-3' (Site <i>SphI</i> )
WT C-terminus reverse	5'-CCCGAGCTCTCAACTGCCGTCGGGAGCGACCGC-3' (Site <i>SacI</i> )
E121→A forward	5'-TACGGGCTGACCGCCGTGATCTGGGAC -3'
E121→A reverse	5'-GTCCAGATCACGGCGGTCAGCCCGTA -3'
V122→A forward	5'-GGGCTGACCGAGGCCATCTGGGACGTC -3'
V122→A reverse	5'-GACGTCCCAGATGGCCTCGGTCAGCCC -3'
I123→A forward	5'-CTGACCGAGGTGGCCTGGGACGTCGAC -3'
I123→A reverse	5'-GTCGACGTCCCAGGCCACCTCGGTCAG -3'
W124→A forward	5'-ACCGAGGTGATCGCCGACGTCGACTCG-3'
W124→A reverse	5'-CGAGTCGACGTCGGCGATCACCTCGGT-3'
W124→S forward	5'-ACCGAGGTGATCTCCGACGTCGACTCG -3'
W124→S reverse	5'-CGAGTCGACGTCGGAGATCACCTCGGT -3'
W124→Y forward	5'-ACCGAGGTGATCTACGACGTCGACTCG -3'
W124→Y reverse	5'-CGAGTCGACGTCGTCGATCACCTCGGT -3'
W124→F forward	5'-ACCGAGGTGATCTTCGACGTCGACTCG -3'
W124→F reverse	5'-CGAGTCGACGTCGAAGATCACCTCGGT -3'
D125→A forward	5'-GAGGTGATCTGGGCCGTCGACTCGCAG -3'
D125→A reverse	5'-CTGCGAGTCGACGGCCCAGATCACCTC -3'
V126→A forward	5'-GTGATCTGGGACGCCGACTCGCAGGAC -3'
V126→A reverse	5'-GTCCTGCGAGTCGGCGTCCCAGATCAC -3'
D127→A forward	5'-ATCTGGGACGTCGCCTCGCAGGACTGG -3'
D127→A reverse	5'-CCAGTCCTGCGAGGCGACGTCCCAGAT -3'
S128→A forward	5'-TGGGACGTCGACGCCCAGGACTGGAAC -3'
S128→A reverse	5'-GTTCCAGTCCTGGGCGTCGACGTCCCA -3'
Q129→A forward	5'-GACGTCGACTCGGCCGACTGGAACAAC -3'
Q129→A reverse	5'-GTTGTTCCAGTCGGCCGAGTCGACGTC -3'
D130→A forward	5'-GTCGACTCGCAGGCCTGGAACAACGCC -3'
D130→A reverse	5'-GGCGTTGTTCCAGGCCTGCGAGTCGAC -3'
W131→A forward	5'-GACTCGCAGGACGCCAACAACGCCAGT -3'
W131→A reverse	5'-ACTGGCGTTGTTGGCGTCCTGCGAGTC -3'
W131→S forward	5'-GACTCGCAGGACTCCAACAACGCCAGT -3'
W131→S reverse	5'-ACTGGCGTTGTTGGAGTCCTGCGAGTC -3'

W131→Y forward	5'- GACTCGCAGGACTACAACAACGCCAGT -3'
W131→Y reverse	5'- ACTGGCGTTGTTGTAGTCCTGCGAGTC -3'
W131→F forward	5'- GACTCGCAGGACTTCAACAACGCCAGT -3'
W131→F reverse	5'- ACTGGCGTTGTTGAAGTCCTGCGAGTC -3'
N132→F forward	5'- TCGCAGGACTGGGCCAACGCCAGTACC -3'
N132→F reverse	5'- GGTA CTGGCGTTGGCCCAGTCCTGCGA -3'
N133→F forward	5'- CAGGACTGGAACGCCGCCAGTACCGAC -3'
N133→F reverse	5'- GTCGGTACTGGCGGCGTTCCAGTCCTG -3'

## Références

- Altaner, C., Saake, B., Tenkanen, M., Eyzaguirre, J., Faulds, C.B., Biely, P., Viikari, L., Siika-aho, M. et Puls, J. 2003. Regioselective deacetylation of cellulose acetates by acetyl xylan esterases of different CE-families. Journal of biotechnology **105**, 95-104.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. et Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature **417**, 141-147.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. et Gupta, R.K. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. Critical reviews in biotechnology **27**, 21-28.
- Biely, P., Mastihubova, M., Cote, G.L. et Greene, R.V. 2003. Mode of action of acetylxylan esterase from *Streptomyces lividans*: a study with deoxy and deoxy-fluoro analogues of acetylated methyl beta-D-xylopyranoside. Biochimica et biophysica acta **1622**, 82-88.
- Biely, P., Mastihubova, M. et Puchart, V. 2007. The vicinal hydroxyl group is prerequisite for metal activation of *Clostridium thermocellum* acetylxylan esterase. Biochimica et biophysica acta **1770**, 565-570.
- Blair, D.E., Hekmat, O., Schuttelkopf, A.W., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S.G. et van Aalten, D.M. 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Biochemistry **45**, 9416-9426.
- Blair, D.E., Schuttelkopf, A.W., MacRae, J.I. et van Aalten, D.M. 2005. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**, 15429-15434.
- Blair, D.E. et van Aalten, D.M. 2004. Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine. FEBS letters **570**, 13-19.
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W.A. et Brzezinski, R. 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. Applied microbiology and biotechnologies **38**, 188-193.

Brameld, K.A. et Goddard, W.A., 3rd 1998a. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**, 4276-4281.

Brameld, K.A., Shrader, W.D., Imperiali, B. et Goddard, W.A., 3rd 1998b. Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. Journal of molecular biology **280**, 913-923.

Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C. et Bouriotis, V. 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. Carbohydrate research **338**, 687-692.

Cedrone, F., Menez, A. et Quemeneur, E. 2000. Tailoring new enzyme functions by rational redesign. Current opinion in structural biology **10**, 405-410.

Cohen-Kupiec, R. et Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Current opinion in biotechnology **9**, 270-277.

Cuero, R.G. 1999. Antimicrobial action of exogenous chitosan. Experientia supplementum **87**, 315-333.

Dahiya, N., Tewari, R. et Hoondal, G.S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied microbiology and biotechnology **71**, 773-782.

Davies, G. et Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure **3**, 853-859.

Davies, G.J., Wilson, K.S. et Henrissat, B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. The Biochemical journal **321 ( Pt 2)**, 557-559.

Deng, D.M., Urch, J.E., ten Cate, J.M., Rao, V.A., van Aalten, D.M. et Crielaard, W. 2009. *Streptococcus mutans* SMU.623c codes for a functional, metal-dependent polysaccharide deacetylase that modulates interactions with salivary agglutinin. Journal of bacteriology **191**, 394-402.

Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. The Biochemical journal **319 ( Pt 3)**, 881-886.

Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. Current protein & peptide science **1**, 105-124.

Fukamizo, T. et Brzezinski, R. 1997. Chitosanase from *Streptomyces sp.* strain N174: a comparative review of its structure and function. Biochemistry and cell biology **75**, 687-696.

Fukamizo, T., Ohkawa, T., Sonoda, K., Toyoda, H., Nishiguchi, T., Ouchi, S. et Goto, S. 1992. Chitinous components of the cell wall of *Fusarium oxysporum*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **56**, 1632-1636.

Gardner, K.H. et Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of beta-chitin. Biopolymers **14**, 1581-1595.

Hart, P.J., Pflugger, H.D., Monzingo, A.F., Hollis, T. et Robertus, J.D. 1995. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. Journal of molecular biology **248**, 402-413.

Hekmat, O., Tokuyasu, K. et Withers, S.G. 2003. Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: an investigation using steady-state kinetic analysis and MS. The Biochemical journal **374**, 369-380.

Henrissat, B. et Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. The Biochemical journal **316 ( Pt 2)**, 695-696.

Henrissat, B. et Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Current opinion in structural biology **7**, 637-644.

Henrissat, B. et Davies, G.J. 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. Plant physiology **124**, 1515-1519.

Hernick, M. et Fierke, C.A. 2005. Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. Archives of biochemistry and biophysics **433**, 71-84.

Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. Biotechnology annual review **2**, 237-258.

Hoell, I.A., Dalhus, B., Heggset, E.B., Aspino, S.I. et Eijsink, V.G. 2006. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. The FEBS journal **273**, 4889-4900.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Vruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P. et Ward, J.M. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich, UK.

Horn, S.J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K.M. et Eijsink, V.G. 2006. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. The FEBS journal **273**, 491-503.

Howard, M.B., Ekborg, N.A., Weiner, R.M. et Hutcheson, S.W. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. Journal of industrial microbiology & biotechnology **30**, 627-635.

Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T. et Nonaka, T. 2006. Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. Journal of molecular biology **358**, 472-484.

- Khor, E. et Lim, L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials **24**, 2339-2349.
- Koga, D., Takanori, Y. et Yasuyuki, A. 1998. HPLC analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **62**, 1643-1646.
- Krokeide, I.M., Synstad, B., Gaseidnes, S., Horn, S.J., Eijsink, V.G. et Sorlie, M. 2007. Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. Analytical biochemistry **363**, 128-134.
- Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W. et Copping, L.G. 1990. Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Berlin: Heidelberg.
- Kumar, M.N., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. et Domb, A.J. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical reviews **104**, 6017-6084.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. Marine biotechnology (New York, NY) **8**, 203-226.
- Kuroki, R., Weaver, L.H. et Matthews, B.W. 1999. Structural basis of the conversion of T4 lysozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**, 8949-8954.
- Lacombe-Harvey, M.E., Fukamizo, T., Gagnon, J., Ghinet, M.G., Denhart, N., Letzel, T. et Brzezinski, R. 2009. Accessory active site residues of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase: variations on a common theme in the lysozyme superfamily. The FEBS journal **276**, 857-869.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- Lamarque, G., Viton, C. et Domard, A. 2004. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. Biomacromolecules **5**, 992-1001.
- Lussier, F.X. 2006. Étude d'évolution dirigée portant sur l'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec. 171 p.
- Majeti, N.V. et Kumar, R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive & fonctionnal polymers **46**, 1-27.
- Marcotte, E.M., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Brzezinski, R. et Robertus, J.D. 1996. X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174. Nature structural biology **3**, 155-162.

Martinou, A., Koutsioulis, D. et Bouriotis, V. 2002. Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein expression and purification **24**, 111-116.

Minke, R. et Blackwell, J. 1978. The structure of alpha-chitin. Journal of molecular biology **120**, 167-181.

Miyake, H., Otsuka, C., Nishimura, S. et Nitta, Y. 2002. Catalytic mechanism of beta-amylase from *Bacillus cereus* var. mycoides: chemical rescue of hydrolytic activity for a catalytic site mutant (Glu367-->Ala) by azide. Journal of biochemistry **131**, 587-591.

Monzingo, A.F., Marcotte, E.M., Hart, P.J. et Robertus, J.D. 1996. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. Nature structural biology **3**, 133-140.

Morley, K.L., Chauve, G., Kazlauskas, R., Dupont, C., Shareck, F. et Marchessault, R.H. 2006. Acetyl xylan esterase-catalyzed deacetylation of chitin and chitosan. Carbohydrates and polymers **63**, 310-315.

Morley, K.L. et Kazlauskas, R.J. 2005. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? Trends in biotechnology **23**, 231-237.

Nisole, A., Lussier, F.X., Morley, K.L., Shareck, F., Kazlauskas, R.J., Dupont, C. et Pelletier, J.N. 2006. Extracellular production of *Streptomyces lividans* acetyl xylan esterase A in *Escherichia coli* for rapid detection of activity. Protein expression and purification **46**, 274-284.

Oberbarnscheidt, L., Taylor, E.J., Davies, G.J. et Gloster, T.M. 2007. Structure of a carbohydrate esterase from *Bacillus anthracis*. Proteins **66**, 250-252.

Puchart, V., Gariépy, M.C., Shareck, F. et Dupont, C. 2006. Identification of catalytically important amino acid residues of *Streptomyces lividans* acetyl xylan esterase A from carbohydrate esterase family 4. Biochimica et biophysica acta **1764**, 263-274.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in polymer sciences **31**, 603-632.

Robertus, J.D., Monzingo, A.F., Marcotte, E.M. et Hart, P.J. 1998. Structural analysis shows five glycohydrolase families diverged from a common ancestor. The Journal of experimental zoology **282**, 127-132.

Saito, A., Fujii, T. et Miyashita, K. 2003. Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion. Antonie van Leeuwenhoek **84**, 7-15.

- Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T. et Miyashita, K. 1999. High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Bioscience, biotechnology, and biochemistry **63**, 710-718.
- Saito, A., Ishizaka, M., Francisco, P.B., Jr., Fujii, T. et Miyashita, K. 2000. Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Microbiology (Reading, England) **146** ( Pt 11), 2937-2946.
- Saito, A., Miyashita, K., Biukovic, G. et Schrempf, H. 2001. Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. Applied and environmental microbiology **67**, 1268-1273.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology (Reading, Massachusset) **24**, 104-108.
- Schrempf, H. 2001. Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. Antonie van Leeuwenhoek **79**, 285-289.
- Shareck, F., Biely, P., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1995. Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. Gene **153**, 105-109.
- Strynadka, N.C. et James, M.N. 1996. Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography. Experientia supplementum **75**, 185-222.
- Taylor, E.J., Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Vincent, F., Brzozowski, A.M., Dupont, C., Shareck, F., Centeno, M.S., Prates, J.A., Puchart, V., Ferreira, L.M., Fontes, C.M., Biely, P. et Davies, G.J. 2006. Structure and activity of two metal ion-dependent acetylxylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. The Journal of biological chemistry **281**, 10968-10975.
- Tharanathan, R.N. et Kittur, F.S. 2003. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. Critical reviews in food science and nutrition **43**, 61-87.
- Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K. et Mori, Y. 2000. Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. Biochemistry **39**, 8837-8843.
- Tremblay, H., Blanchard, J. et Brzezinski, R. 2000. A common molecular signature unifies the chitosanases belonging to families 46 and 80 of glycoside hydrolases. Canadian journal of microbiology **46**, 952-955.
- Tronsmo, A. et Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. Analytical biochemistry **208**, 74-79.

Tsigos, I. et Bouriotis, V. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. The Journal of biological chemistry **270**, 26286-26291.

Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. et Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Trends in biotechnology **18**, 305-312.

Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Domard, A. et Bouriotis, V. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on *N*-acetylchitooligosaccharides. European journal of biochemistry / FEBS **261**, 698-705.

Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R. et Withers, S.G. 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. Nature **412**, 835-838.

Watanabe, T., Uchida, M., Kobori, K. et Tanaka, H. 1994. Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **58**, 2283-2285.

White, A. et Rose, D.R. 1997. Mechanism of catalysis by retaining beta-glycosyl hydrolases. Current opinion in structural biology **7**, 645-651.



