

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Étude d'évolution dirigée portant sur l'acétyl xylane estérase de
*Streptomyces lividans***

Par
François-Xavier Lussier

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

Jury d'évaluation

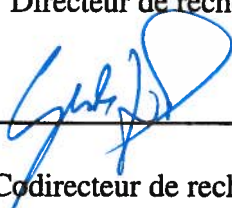
Examineur interne	Claude Guertin, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Carole Beaulieu, Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans* (AxeA) est une enzyme qui hydrolyse les liens esters des groupements acétyles du xylane. Il a été démontré que l'AxeA avait aussi la capacité de déacétyler des substrats chitineux. Cette enzyme pourrait donc être utilisée pour la production de chitosan. Cependant, l'activité enzymatique de l'AxeA envers les substrats chitineux est trop faible pour être industriellement viable. L'objectif de cette étude était d'augmenter l'activité de déacétylation de l'AxeA envers des oligomères de chitosan. L'approche expérimentale consistait à construire des bibliothèques d'*axeA_{tr}* mutés, puis à isoler les clones comportant des caractéristiques améliorées. Les bibliothèques ont été obtenues par mutagenèse de saturation de site. Pour le criblage, l'expression protéique et les essais enzymatiques ont été adaptés au format microplaque 96 puits. Une souche de *Streptomyces lividans* Δ *axeA* a été construite pour la production de l'AxeA_{tr}. Suite à différents essais, les oligomères de chitosan ont été retenus comme substrat de criblage. Afin d'identifier les clones les plus performants, l'acide acétique libéré par la réaction enzymatique devait être quantifié. La méthode la plus couramment utilisée dans la littérature ne pouvait être adaptée au criblage à haut débit. La quantification par HPLC a donc été envisagée. Des essais préliminaires ont permis de détecter l'acide acétique, mais des modifications au protocole doivent être apportées pour permettre une quantification précise.



Directeur de recherche



Codirecteur de recherche



Étudiant

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, François Shareck, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour l'encadrement, ainsi que pour l'aide financière apportée. Je désire également remercier mon codirecteur, Claude Dupont, pour ses nombreux conseils.

J'aimerais aussi remercier Liette Biron, pour son aide et ses conseils qui m'ont grandement aidé tout au long de ma maîtrise. Merci à Raymonde Jetté pour sa bonne humeur quotidienne. Je remercie également Julie Séguin et Amélie Côté pour l'ambiance dynamique créée dans le laboratoire.

Finalement, un grand merci à mes parents qui ont toujours été là pour moi. Merci pour vos encouragements et votre soutien, vous êtes à la base de ma réussite.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	ix
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Introduction.....	16
1. Revue bibliographique	18
1.1 Chitine et chitosan.....	19
1.1.1 Description.....	19
1.1.2 Propriétés physico-chimiques	21
1.1.3 Intérêts et applications	21
1.1.4 Production	23
1.2 La famille 4 des carbohydrates estérases	24
1.3 Les chitine déacétylases	25
1.4 Peptidoglycane acide <i>N</i> -acétylmuramique déacétylase de <i>Bacillus subtilis</i>	29
1.5 Peptidoglycane déacétylase de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
1.6 Acétyl xylane estérase de <i>Streptomyces lividans</i>	32
1.6.1 Caractéristiques et fonction.....	32
1.6.2 Structure.....	35
1.6.3 Spécificité et mécanisme d'action	35
1.7 Autres acétyl xylane estérases.....	36
1.8 Évolution dirigée.....	40
1.9 Création de bibliothèques.....	40
1.9.1 Méthodes aléatoires	41
1.9.2 Méthodes dirigées	43
1.9.3 Méthodes recombinatoires	50
1.10 Sélection et criblage	53

1.11 Détection de l'activité de déacétylation enzymatique.....	54
1.12 Dislocation génétique.....	58
1.12.1 Généralités	58
1.12.2 Dislocation génétique dirigée par PCR.....	61
2. Approche expérimentale	63
2.1 Souches bactériennes	64
2.2 Plasmides et cosmides.....	65
2.3 Amorces	66
2.4 Milieux de culture	67
2.4.1 Milieux solides pour <i>E. coli</i>	67
2.4.2 Milieux solides pour <i>S. lividans</i>	67
2.4.3 Milieux liquides pour <i>E. coli</i>	68
2.4.4 Milieux liquides pour <i>S. lividans</i>	68
2.5 Conditions de culture	69
2.6 Conservation des souches	70
2.6.1 <i>Streptomyces lividans</i>	70
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	70
2.7 Analyse et manipulation de l'ADN.....	71
2.7.1 Extraction et purification de plasmides chez <i>E. coli</i>	71
2.7.2 Extraction et purification de cosmides chez <i>E. coli</i>	71
2.7.3 Extraction et purification de plasmides chez <i>S. lividans</i>	72
2.7.4 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction.....	73
2.7.5 Amplification par PCR	73
2.7.6 Électrophorèse en gel d'agarose	75
2.7.7 Purification de fragments d'ADN	75
2.7.8 Ligation	75
2.8 Transformation bactérienne	76
2.8.1 Cellules électro-compétentes d' <i>E. coli</i>	76
2.8.2 Électro-transformation d' <i>E. coli</i>	76
2.8.3 Protoplastes de <i>S. lividans</i>	77
2.8.4 Transformation des protoplastes de <i>S. lividans</i>	78

2.9 Création de bibliothèques de gènes mutés	78
2.10 Préparation de spores de <i>S. lividans</i>	80
2.11 Dislocation génétique dirigée par PCR	80
2.11.1 Extraction de la cassette de résistance à l'apramycine	80
2.11.2 Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine	81
2.11.3 Introduction du cosmide ScC75A dans <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790	83
2.11.4 Introduction de la cassette dans <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790/ScC75A ..	83
2.11.5 Extraction et analyse du cosmide ScC75AII	83
2.12 Expression protéique	85
2.12.1 <i>E. coli</i>	85
2.12.2 <i>S. lividans</i>	85
2.13 Analyse des protéines	86
2.13.1 Préparation des échantillons	86
2.13.2 Dosage des protéines	86
2.13.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	87
2.13.4 Coloration au bleu de Coomassie	87
2.13.5 Coloration au nitrate d'argent	87
2.13.6 Immunobuvardage de type Western	88
2.13.7 Immunodétection avec l'appareil Slot Blot	89
2.14 Détection de l'activité de déacétylation sur milieu solide	89
2.14.1 Glycol chitine	89
2.14.2 <i>p</i> -Nitrophényl acétate	90
2.14.3 4-Méthylumbelliféryl acétate	90
2.15 Essais enzymatiques	90
2.15.1 <i>p</i> -Nitrophényl acétate	90
2.15.2 Oligomères de chitosan	91
2.16 Quantification de l'acide acétique	91
2.16.1 Trousse K-ACET (Megazyme)	91
2.16.2 HPLC	91
3. Résultats	93
3.1 Dislocation du gène <i>axeA</i>	94

3.1.1 Construction de la cassette de dislocation	94
3.1.2 Introduction du cosmide ScC75A dans <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790.....	97
3.1.3 Obtention du cosmide ScC75AII	97
3.1.4 Confirmation de la dislocation de <i>axeA</i>	101
3.2 Construction des librairies de mutants <i>AxeA_{tr}</i>	104
3.2.1 Sites de mutations	104
3.2.2 Mutagenèse	104
3.2.3 Clonage	108
3.2.4 Séquençage	108
3.3 Expression protéique.....	110
3.3.1 Profil d'expression de <i>S. lividans</i>	110
3.3.2 Profil d'expression d' <i>axeA_{tr}</i> chez <i>E. coli</i>	113
3.4 Détection de l'activité de déacétylation	116
3.4.1 Essais sur Pétri	116
3.4.2 Criblage en solution avec le pNPA	121
3.4.3 Essais enzymatiques avec des oligomères de chitine	123
3.5 Stratégie de criblage.....	125
3.5.1 Pré-criblage	127
3.5.2 Criblage de l'activité enzymatique de l' <i>AxeA_{tr}</i>	129
3.6 Dosage de l'acide acétique par HPLC	131
4. Discussion	133
4.1 Dislocation du gène <i>axeA</i>	134
4.2 Construction des librairies	134
4.2.1 Choix des sites de mutations.....	135
4.2.2 Méthode de mutagenèse.....	136
4.2.3 Caractéristiques des librairies	138
4.3 Expression protéique.....	139
4.3.1 <i>Streptomyces lividans</i>	139
4.3.2 <i>Escherichia coli</i>	141
4.3.3 <i>Streptomyces lividans</i> versus <i>Escherichia coli</i>	143
4.4 Détection de l'activité de déacétylation	144

4.4.1 Essais sur milieu solide	144
4.4.2 Essais en solution	145
4.5 Criblage	146
4.5.1 Approche expérimentale	146
4.5.2 Librairie SYT-V	147
5. Conclusion	149
Bibliographie.....	153
Annexe	168
Publication	168
Communication orale	168
Communications par affiche	168
Liste des produits chimiques utilisés	169

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la chitine et du chitosan.	20
Figure 2. Action catalytique des chitine déacétylases.....	26
Figure 3. Représentation des structures tridimensionnelles de la peptidoglycane acide <i>N</i> -acétylmuramique déacétylase de <i>Bacillus subtilis</i> , de la peptidoglycane déacétylase de <i>Streptococcus pneumoniae</i> et de l'acétyl xylane estérase de <i>Streptomyces lividans</i>	30
Figure 4. Alignement de séquences protéiques de la peptidoglycane acide <i>N</i> -acétylmuramique déacétylase de <i>Bacillus subtilis</i> (PdaA), de l'acétyl xylane estérase de <i>Streptomyces lividans</i> (AxeA), de la chitine déacétylase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (CDA1), de la chitine déacétylase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CDA2) et de la chitine déacétylase de <i>Mucor rouxii</i> (CDA3).	31
Figure 5. Action catalytique des acétyl xylane estérases.	34
Figure 6. Structure des acétyl xylane estérases de <i>Trichoderma reesei</i> et de <i>Penicillium purporogenum</i>	39
Figure 7. Approches dirigées permettant de générer de la diversité au sein d'une séquence nucléotidique.	46
Figure 8. Méthode d'élongation par chevauchement.....	47
Figure 9. Méthode d'introduction de mutations par méga-amorce.....	48
Figure 10. Méthode de mutagenèse par amplification plasmidique.	49
Figure 11. Méthodes recombinatoires homologie-dépendantes : <i>DNA shuffling</i> , StEP et RACHITT.	52
Figure 12. Réaction couplée de trois enzymes permettant la quantification de l'acide acétique.	57
Figure 13. Dislocation d'un gène par recombinaison homologue simple et double.	60
Figure 14. Ajout des séquences de recombinaison à la cassette de dislocation. ...	62

Figure 15. Composition des amorces utilisées pour l'amplification de la cassette de résistance à l'apramycine.	82
Figure 16. Digestion du plasmide pIJ773 avec les enzymes de restriction <i>EcoRI</i> et <i>HindIII</i> , analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v)... 95	95
Figure 17. Cassette de dislocation amplifiée par PCR à l'aide des amorces AxeA-1 et AxeA-2, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v).	96
Figure 18. Carte physique des cosmides ScC75A et ScC75AII.....	98
Figure 19. Électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v) montrant les cosmides ScC75A et ScC75AII digérés avec l'enzyme de restriction <i>SacI</i>	100
Figure 20. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v) des produits de PCR obtenus pour l'ADN chromosomique de quatre exconjugants apraR/kanaS amplifiés à l'aide des amorces C75ver-5 et C75ver-3. 102	102
Figure 21. Séquence du produit de PCR de 1701 pbs, obtenu par l'amplification de la région de recombinaison chromosomique.....	103
Figure 22. Alignement de séquences protéiques partielles de différents membres de la famille 4 des carbohydrates estérases ; acétyl xylane estérase de <i>Streptomyces lividans</i> (AxeA), peptidoglycan déacétylase de <i>Bacillus subtilis</i> (PdaA), chitine déacétylase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (CDA1), chitine déacétylase 2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CDA2) et chitine déacétylase de <i>Mucor rouxii</i> (CDA3).	105
Figure 23. Analyse du premier PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v).	106
Figure 24. Analyse du deuxième PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v).....	107
Figure 25. Séquences partielles de neuf clones provenant des bibliothèques SGS-V, SGS-Y et SYT-V	109
Figure 26. Analyse des différentes fractions protéiques de <i>S. lividans</i> cultivée en Erlenmeyer.	111
Figure 27. Analyse de la fraction extracellulaire de <i>S. lividans</i> cultivée en microplaque.....	112
Figure 28. Analyse des différentes fractions protéiques de <i>E. coli</i> cultivée en Erlenmeyer.....	114

Figure 29. Analyse de la fraction extracellulaire de <i>E. coli</i> cultivée en microplaque.....	115
Figure 30. Essais sur milieu Stewart/glycol chitine effectués avec les souches de <i>S. lividans</i> 10-164/pIAFC109, 10-164/pIAF933, 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935; en présence et en absence de CoCl_2	118
Figure 31. Essais effectués sur milieu 2xTY agar avec les souches d' <i>E. coli</i> BL21/pREP4 et BL21/pREP4/pIAF843.....	119
Figure 32. Essais sur milieu Stewart effectués avec les souches de <i>S. lividans</i> IAF45, 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935. Une solution de MUA a été pulvérisée sur les plaques de Pétri après croissance bactérienne.	120
Figure 33. Augmentation d'absorbance lors d'essais enzymatiques utilisant le pNPA comme substrat, pour les différentes fractions cellulaires d' <i>E. coli</i> BL21/pREP4, BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844.....	122
Figure 34. Stratégie de criblage.....	126
Figure 35. Analyse des surnageants de culture de clones de la librairie SYT-V par immunobuvardage.....	128
Figure 36. Quantité d'acide acétique libéré par les différentes réactions de déacétylation; enzyme pure en bleu (10 $\mu\text{g/ml}$), surnageant de culture de BL21/pREP4/pIAF844 en rouge, surnageant des clones en vert.	130
Figure 37. Chromatogrammes obtenus pour les essais enzymatiques effectués avec le surnageants de culture des souches BL21/pREP4/pIAF841 et BL21/pREP4/pIAF844.....	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Applications de la chitine et du chitosan.....	22
Tableau 2. Caractéristiques de chitine déacétylases provenant de différentes sources.....	28
Tableau 3. Acétyl xylane estérases de différents organismes.	38
Tableau 4. Souches bactériennes.	64
Tableau 5. Plasmides et cosmides.....	65
Tableau 6. Séquences des différentes amorces utilisées et leur application.	66
Tableau 7. Conditions d'amplification.....	74
Tableau 8. Combinaisons d'amorces utilisées lors de la première réaction d'amplification.	79
Tableau 9. Longueur (pbs) des fragments générés par la digestion des cosmides ScC75A et SCC75AII avec l'enzyme de restriction <i>SacI</i>	99
Tableau 10. Quantité d'acide acétique libérée par l'AxeA _{tr} (10 µg/ml) lors d'essais enzymatiques utilisant comme substrats les oligomères de chitosan DPM 6,4 et DPM 7,4.	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ω	Ohm
μF	Microfarad
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celcius
μg	Microgramme
μL	Microlitre
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine-5'-monophosphate
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
AxeA	Acétyle xylane estérase
AxeA _{tr}	Acétyle xylane estérase tronquée
BPC	Biphényles polychlorés
BSA	Albumine sérine bovine
CDA	Chitine déacétylase
CE4	Famille 4 des carbohydrates estérases
cell/mL	Cellules/millilitre
CS	Citrate synthase
Da	Dalton
DMSO	Diméthyle sulfoxide
dNTPs	Désoxyribonucléosides triphosphates
DO	Densité optique
DP	Degré de polymérisation
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
epPCR	<i>Error-prone</i> PCR
FID	Détecteur par ionisation de flamme
FRT	Site de reconnaissance pour la FLP-recombinase
g	Gramme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GlcNAc	<i>N</i> -acétyl-D-glucosamine

GlcNH ₂	<i>N</i> -glucosamine
HD	Homologie-dépendant
HI	Homologie-indépendant
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
ITCHY	Création d'enzymes hybrides par clivage incrémentielle
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilo Volt
L-MDH	L-malate déshydrogénase
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MU	4-méthylumbellifère
MUA	4-méthylumbelliféryl acétate
N	Normal
NAD ⁺	Nicotinamideadénine dinucléotide réduit
NADH	Nicotinamideadénine dinucléotide
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
nt	Nucléotide
<i>ori</i> T	Origine de transfert
p/v	Poids/volume
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pbs	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PdaA	Peptidoglycane acide <i>N</i> -acétylmuramique déacétylase
PdgA	Peptidoglycane déacétylase
PEG	Polyéthylène glycol

pmol/ μ L	Picomole/microlitre
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
pNP	<i>p</i> -nitrophénol
pNPA	<i>p</i> -nitrophényl acétate
RACHITT	Genèse aléatoire de chimères sur matrice transitoire
RID	Insertion et délétion aléatoires
rpm	Révolution par minute
SDS	Dodécyle sulphate de sodium
SeSaM	Mutagenèse par saturation de séquence
StEP	Processus d'élongation par étape
TBE	Tampon Tris borate EDTA
TBS	Tampon Tris salin
TES	Acide N-[tris(hydroxyméthyl)-méthyl]-2-aminoéthanesulfonique
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
U/ μ L	Unité enzymatique/microlitre
UV	Ultraviolets
V	Volt
v/v	Volume/volume
W	Watt
x g	Force centrifuge

INTRODUCTION

La chitine est un polysaccharide linéaire composé d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine. Après la cellulose, la chitine est le polymère naturel le plus abondant, se retrouvant chez de nombreux d'organismes, tels les arthropodes, les mollusques, les algues, les champignons et les levures. Le chitosan est la forme déacétylée de la chitine et est beaucoup moins répandu dans la biomasse. Dans le domaine industriel, l'utilisation des polymères de chitine est limitée par leur faible solubilité. À l'inverse, les oligomères de chitine et le chitosan comportent un vaste potentiel d'applications, allant du traitement des eaux usées au domaine pharmaceutique. Présentement, le chitosan est obtenu par traitement thermochimique. Les procédés thermochimiques, bien qu'efficaces, ont pour désavantage d'effectuer une déacétylation hétérogène et de fragmenter le polymère. De plus, la déacétylation thermochimique est un procédé polluant et énergivore. Comme alternative, la déacétylation enzymatique a été envisagée. Le procédé enzymatique a pour avantage, outre l'aspect environnemental, d'être facilement contrôlable, hautement reproductible et de ne pas briser les liens glycosidiques.

L'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans* (AxeA) est une enzyme qui a pour fonction d'hydrolyser les liens esters des groupements acétyles du xylane. L'AxeA est classée dans la famille 4 des carbohydrates estérases, dans laquelle on retrouve aussi des chitine déacétylases, des chitoooligosaccharides déacétylases et des peptidoglycane déacétylases. Il a été démontré récemment que l'AxeA avait aussi la capacité de déacétyler des substrats chitineux. De ce fait, cette enzyme pourrait être utilisée dans la production de dérivés de chitine. Cependant, l'AxeA a une activité de déacétylation envers les substrats chitineux trop faible pour avoir un intérêt industriel.

L'objectif de ce projet était d'augmenter l'activité de déacétylation de l'AxeA envers des oligomères de chitosan, par un processus d'évolution dirigée. L'approche expérimentale globale consistait à construire des bibliothèques de gènes *axeA* mutés et à identifier les mutations bénéfiques par criblage fonctionnel. Les bibliothèques ont été produites en mutant à saturation le gène *axeA*, en deux sites distincts. Afin de mettre au point une méthode de criblage efficace, différents essais ont été effectués au niveau de la production d'AxeA et de la détection de l'activité de déacétylation. Aussi, pour permettre la production et la purification d'AxeA mutées, une souche de *Streptomyces lividans* a été modifiée génétiquement.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Chitine et chitosan

1.1.1 Description

La chitine est un polysaccharide linéaire composé d'un nombre variable d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par des ponts glycosidiques β -(1-4) (figure 1A) (Tsigos *et al.*, 2000). Elle est également décrite comme un copolymère constitué d'unités GlcNAc et *N*-glucosamine (GlcNH₂) distribuées en bloc ou de façon aléatoire (Khor et Lim, 2003; Lamarque *et al.*, 2004). Après la cellulose, la chitine est le polymère naturel le plus abondant. Elle est présente chez un grand nombre d'organismes, tels les arthropodes, les mollusques, les algues, les champignons et les levures (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003; Muzzarelli, 1977). Les molécules de chitine varient grandement en longueur, pouvant aller de 8000 unités GlcNAc chez le crabe, à seulement 100 chez certaines levures (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). La chitine est utilisée principalement comme composante structurale dans la paroi cellulaire et dans l'exosquelette. Elle se présente généralement sous forme de microfibrilles incorporées dans une matrice de protéines ou de polysaccharides (Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999; Muzzarelli, 1977).

Le chitosan est la forme déacétylée de la chitine et fait référence à un ensemble de polymères possédant des degrés d'acétylation et des poids moléculaires variés (figure 1B) (Tsigos *et al.*, 2000; Singla et Chawla, 2001). Le terme chitosan est généralement utilisé lorsque le degré d'acétylation est inférieur à 50 % (Khor et Lim, 2003). Contrairement à la chitine, le chitosan est beaucoup moins répandu dans la biomasse. Il provient essentiellement de la déacétylation de la chitine et se retrouve presque exclusivement dans la paroi cellulaire de certains champignons (Kuhn *et al.*, 1990).

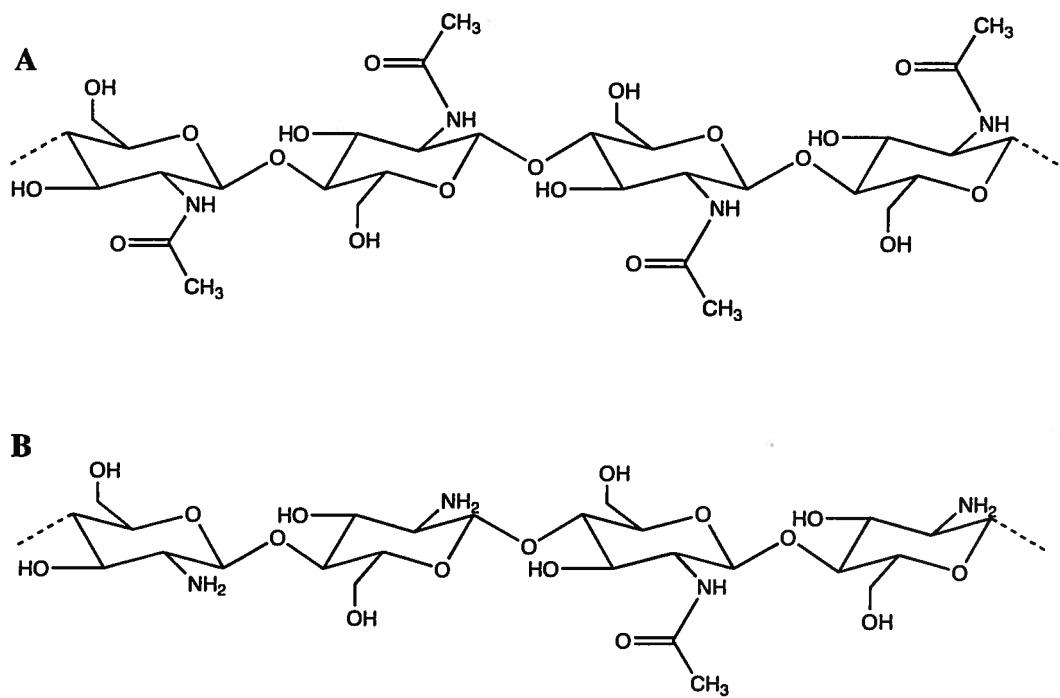


Figure 1. Structure de la chitine (A) et du chitosan (B) (Muzzarelli, 1977).

1.1.2 Propriétés physico-chimiques

Sous sa forme native, la chitine est cristalline et insoluble dans presque tous les solvants, à l'exception de certains acides concentrés (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Elle peut toutefois être rendue soluble par des traitements chimiques qui brisent les liens hydrogène intra- et intermoléculaires (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003).

Contrairement à la chitine, le chitosan se dissout aisément en solutions aqueuses d'acides organiques et inorganiques (Ogawa *et al.*, 2004). La solubilité du chitosan résulte de la disponibilité de groupements amine qui se protonent en solutions acides (Schatz *et al.*, 2003). La présence de groupements amine a aussi pour effet de rendre le chitosan plus réactif que la chitine (Ogawa *et al.*, 2004). Ces dernières caractéristiques font du chitosan un biopolymère de choix pour de nombreuses applications.

1.1.3 Intérêts et applications

Depuis une dizaine d'années, un intérêt grandissant est accordé à la chitine et au chitosan. Aujourd'hui, plusieurs compagnies de différentes parties du monde produisent de la chitine et du chitosan à l'échelle commerciale (Singla et Chawla, 2001). La grande majorité des industries sont cependant situées au Japon, où plus de 100 millions de tonnes de chitosan sont manufacturées chaque année (Tsigos *et al.*, 2000). Dans le domaine industriel, l'utilisation des polymères de chitines est limitée par leurs faibles solubilité et réactivité. À l'inverse, les oligomères de chitine et le chitosan comportent un vaste potentiel d'applications en raison de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, ils possèdent des applications dans les domaines du traitement des eaux usées, de l'agro-alimentation, de la santé et de la cosmétologie (tableau 1) (Tsigos *et al.*, 2000).

Tableau 1. Applications de la chitine et du chitosan.

Applications	Exemples	Références
Traitement des eaux	Récupération d'ions métalliques, de pesticides et de matières organiques; élimination de phénols, de protéines, de radio-isotopes et de BPC.	Hirano, 1996; Shahidi <i>et al.</i> , 1999; Bailey <i>et al.</i> , 1999
Agriculture	Enrobage de semences, de fruits et de légumes; fertilisant et fongicide.	Hirano, 1996; Illum, 1998
Alimentation	Éclaircissement et déacidification de jus, stabilisateur de couleur, réduction de l'adsorption des lipides, prolongement de la saveur, préservatif, antioxydant, émulsifiant, agent d'épaississement, additif et préparation de fibres diététiques.	Hirano, 1996; Dodane et Vilivalam, 1998
Domaine biomédical et pharmaceutique	Traitement de brûlures, préparation de peau artificielle, sutures chirurgicales, lentilles de contact, membranes de dialyse pour le sang, vaisseaux sanguins artificiels, anti-tumorigène, anticoagulant sanguin, anti-gastrite, hémostatique, hypocholestérolémique, anti-thrombogénique, vecteurs pour médicaments et gènes, antibactériens, immunomodulateur, adjuvant, traitement anti-viral et thérapie dentaire.	Dodane et Vilivalam, 1998; Kas, 1997; Felt <i>et al.</i> , 1998; Madihally et Matthew, 1999; Vasudev <i>et al.</i> , 1997; Shigemasa et Minami, 1996; Thacharodi et Rao, 1995; Koide, 1998
Produits cosmétiques	Produits de soins pour la peau et les cheveux.	Hirano, 1996
Chromatographie et réactifs analytiques	Immobilisation d'enzymes, matrice dans les chromatographies et substrat pour les enzymes.	Hirano, 1996; Dodane et Vilivalam, 1998; Tokuyasu <i>et al.</i> , 1999a; Tokuyasu <i>et al.</i> , 1999b; Honda <i>et al.</i> , 1999; Tokuyasu <i>et al.</i> , 2000
Autres	Fibres synthétiques, papier, fibre, coton, film et éponges.	Hirano, 1996

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

1.1.4 Production

Généralement, la chitine est obtenue à partir de carapaces de crustacés en raison de leur grande disponibilité (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). La chitine est isolée par un procédé en trois étapes qui consiste en la déminéralisation, la déprotéination et le blanchiment. Le chitosan est ensuite obtenu en déacétylant la chitine (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). À l'heure actuelle, la déacétylation est effectuée par des procédés thermochimiques. Une des méthodes consiste à traiter la chitine avec une solution concentrée de NaOH à des températures élevées, produisant du chitosan sous forme de précipité insoluble (Tsigos *et al.*, 2000). Dans une autre méthode, le NaOH est utilisé dans des conditions moins extrêmes qui permettent d'obtenir du chitosan soluble. Ces méthodes thermochimiques produisent un chitosan de degré d'acétylation variant entre 48 % et 93 % (Tsigos *et al.*, 2000). La température et la concentration de NaOH sont les deux facteurs qui influencent le taux de déacétylation (Chang *et al.*, 1997). Les procédés thermochimiques, bien qu'efficaces, ont pour désavantage d'effectuer une déacétylation hétérogène et de fragmenter le polymère en clivant les unités glycosidiques. Pour ces raisons, le chitosan ainsi produit est généralement hétérogène, ce qui limite son utilisation. De plus, la déacétylation thermochimique est un procédé polluant, qui consomme une grande quantité d'énergie (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003).

En considérant les nombreux inconvénients liés aux procédés thermochimiques, la déacétylation enzymatique a été envisagée comme alternative (Tsigos *et al.*, 2000). L'efficacité de déacétylation a été évaluée pour différentes chitine déacétylases (CDA) provenant de mycètes (Gao *et al.*, 1995; Shrestha *et al.*, 2004; Tokuyasu *et al.*, 1997; Tsigos et Bouriotis, 1995; Alfonso *et al.*, 1995; Martinou *et al.*, 2002; Aye *et al.*, 2006; Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Différents taux de déacétylation ont été obtenus en fonction des substrats utilisés. Pour des substrats insolubles, comme la chitine sous sa forme native, les taux de déacétylation étaient généralement faibles (0,5 % - 9,5 %) (Tsigos *et al.*, 2000;

Tsigos et Bouriotis, 1995). Ceci s'expliquerait par le fait que les CDA ne peuvent pénétrer les microfibrilles de chitine et que seuls les groupements *N*-acétyles externes sont disponibles pour la déacétylation (Aye *et al.*, 2006). Par contre, dans le cas de la chitine partiellement déacétylée et d'oligomères, les taux de déacétylation augmentaient considérablement, variant entre 17 % et 100 % (Tsigos et Bouriotis, 1995; Tsigos *et al.*, 2000; Martinou *et al.*, 2002; Tokuyasu *et al.*, 1997; Win et Stevens, 2001). Le procédé de déacétylation enzymatique a pour avantage, outre l'aspect environnemental, d'être facilement contrôlable, hautement reproductible et de ne pas briser les liens glycosidiques. De plus, il permet de produire des polymères et des oligomères de chitosan impossible à obtenir par les méthodes thermochimiques (Tsigos *et al.*, 2000; Tokuyasu *et al.*, 1997; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Cependant, il existe certains inconvénients à utiliser le procédé enzymatique au niveau industriel, comme la faible activité de déacétylation envers les substrats insolubles, la grande spécificité des enzymes et leur coût de production. D'autres études doivent donc être menées pour rendre ce procédé applicable à grande échelle.

1.2 La famille 4 des carbohydrates estérases

La famille 4 des carbohydrates estérases (CE4) est un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des groupements *O*-acétyle ou *N*-acétyle de poly/oligosaccharides substitués. La famille des CE4 regroupe des acétyl xylane estérases (EC 3.1.1.72), des chitine déacétylases (EC 3.5.1.41), des chitooligosaccharide déacétylases (EC 3.5.1.-), des peptidoglycane *N*-acétylglucosamine déacétylases (EC 3.5.1.-) et des peptidoglycane acide *N*-acétylmuramique déacétylases (EC 3.5.1.-) (Coutinho et Henrissat, 2002; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Les enzymes de la famille des CE4 ont en commun une région désignée comme le domaine d'homologie NodB, en raison de sa ressemblance avec les protéines NodB (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Ces dernières sont des chitooligosaccharide déacétylases impliquées dans la production de signaux de nodulation bactériens (Kafetzopoulos *et al.*, 1993).

Plusieurs membres des CE4 ont déjà été exprimés, purifiés et caractérisés. La caractérisation des CE4 a principalement été effectuée au niveau cinétique et spécificité de substrats. À ce jour, quatre structures tridimensionnelles ont été publiées, soit celles de la peptidoglycane acide *N*-acétylmuramique déacétylase de *Bacillus subtilis* (PdaA), de la peptidoglycane déacétylase de *Streptococcus pneumoniae* (PdgA), du domaine C-terminal de la xylanase U de *Clostridium thermocellum* (XylU) et du domaine catalytique de l'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans* (AxeA_{tr}) (Blair et van Aalten, 2004; Blair *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006).

1.3 Les chitine déacétylases

Les chitine déacétylases (CDA) catalysent la déacétylation des résidus GlcNAc de la chitine (figure 2). Elles sont regroupées exclusivement dans la famille 4 des carbohydrates estérases. Les CDA ont été observées pour la première fois chez le champignon *Mucor rouxii* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Depuis, ces enzymes ont été répertoriées chez plusieurs autres champignons (Gao *et al.*, 1995; Alfonso *et al.*, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996; Tsigos et Bouriotis, 1995; Christodoulidou *et al.*, 1996). Des activités de CDA ont aussi été observées chez des bactéries et des insectes (Natsir *et al.*, 2002; Arachami *et al.*, 1986). Chez les champignons, les CDA sont impliquées dans la formation de la paroi cellulaire, ainsi que dans les interactions avec les plantes et les insectes (Christodoulidou *et al.*, 1999; Davis et Bartnicki-Garcia, 1984; Nahar *et al.*, 2004; Tsigos et Bouriotis, 1995).

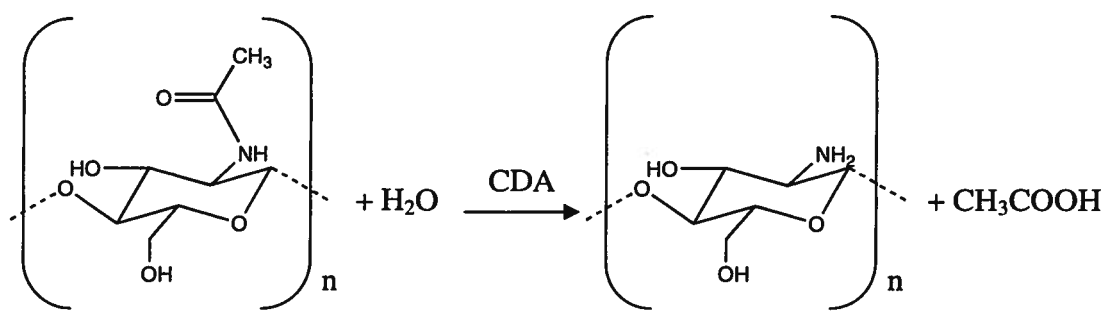


Figure 2. Action catalytique des chitine déacétylases.

Les chitine déacétylases caractérisées à ce jour, proviennent toutes de champignons (tableau 2). Ce sont des glycoprotéines qui sont périplasmiques ou extracellulaires. Parmi les CDA caractérisées, les poids moléculaires et les pH optimums sont variables, mais elles possèdent toutes une température optimale de 50 °C. Les trois CDA extracellulaires, soit celles d'*Aspergillus nidulans* et de *Colletotrichum lindemuthianum* ne sont pas inhibées par l'acétate contrairement aux trois autres CDA périplasmiques. Selon le degré de polymérisation du substrat (DP), l'efficacité de déacétylation varie et un DP minimal est nécessaire pour qu'il y ait catalyse (2 ou 3).

On dénote une régiosélectivité variable parmi les CDA. Chez *M. rouxii*, le mode d'action est de type exo-, effectuant la déacétylation à partir de l'extrémité non réductrice de la chitine. L'hydrolyse des groupements acétyl est effectuée selon un mécanisme d'attaques multiples. L'enzyme forme un complexe enzyme-polymère et catalyse l'hydrolyse de trois groupements avant de se dissocier (Martinou *et al.*, 1998; Tsigos *et al.*, 1999). À l'inverse, on observe un mode d'action de type endo- chez *C. lindemuthianum*, avec un patron de déacétylation spécifique ou aléatoire dépendamment du substrat (Hekmat *et al.*, 2003).

Tableau 2. Caractéristiques de chitine déacétylases provenant de différentes sources.

Sources	Poids moléculaire (kDa)	pH optimal	Température optimale (°C)	Inhibition par l'acétate	DP minimal*	Références
<i>Absidia coerulea</i>	75	5,0	50	oui	3	Gao <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus nidulans</i>	27	7,0	50	non	2	Alfonso <i>et al.</i> , 1995
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	25,8	11,5	50	non	2	Tokuyasu <i>et al.</i> , 1996
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (DSM 63144)	150	8,5	50	non	2	Tsigos et Bouriotis, 1995
<i>Mucor rouxii</i>	75	4,5	50	oui	3	Kafetzopoulos <i>et al.</i> , 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cda2p)	43	8,0	50	oui	2	Martinou <i>et al.</i> , 2002

* Degré de polymérisation minimal du substrat nécessaire à la déacétylation.

1.4 Peptidoglycane acide *N*-acétylmuramique déacétylase de *Bacillus subtilis*

La peptidoglycane acide *N*-acétylmuramique déacétylase de *Bacillus subtilis* (PdaA) agit sur le peptidoglycane en déacétylant les résidus acide *N*-acétylmuramiques. Avec l'action combinée d'une muramoyl L-alanine amidase, la PdaA permet la formation de résidus muramiques δ -lactame nécessaires à la germination des spores (Fukushima *et al.*, 2005).

La structure de la PdaA est apparentée aux protéines de type $(\beta/\alpha)_8$ (figure 3A). Elle comporte huit hélices α et onze brins β . À la différence des protéines $(\beta/\alpha)_8$ classiques, la PdaA possède deux brins β additionnels à l'extrémité *N*-terminale, formant un petit feuillet β . Aussi, l'extrémité *C*-terminale comporte un brin β et une hélice α supplémentaires (Blair et van Aalten, 2004).

La PdaA possède un sillon à sa surface, dans lequel se retrouvent des résidus hautement conservés parmi les membres des CE4. Ces résidus créent un espace suffisant pour accommoder au moins trois monosaccharides (Blair et van Aalten, 2004). Ceci est en accord avec le fait que les membres de la famille des CE4 reconnaissent tous des substrats multimériques. Un complexe enzyme-GlcNAc a démontré que le sucre s'insérait bien dans le sillon, qui a donc été désigné comme le site actif (Blair et van Aalten, 2004). Fait intéressant, le substrat interagit principalement avec des résidus qui sont hautement conservés parmi les CE4 (figure 4).

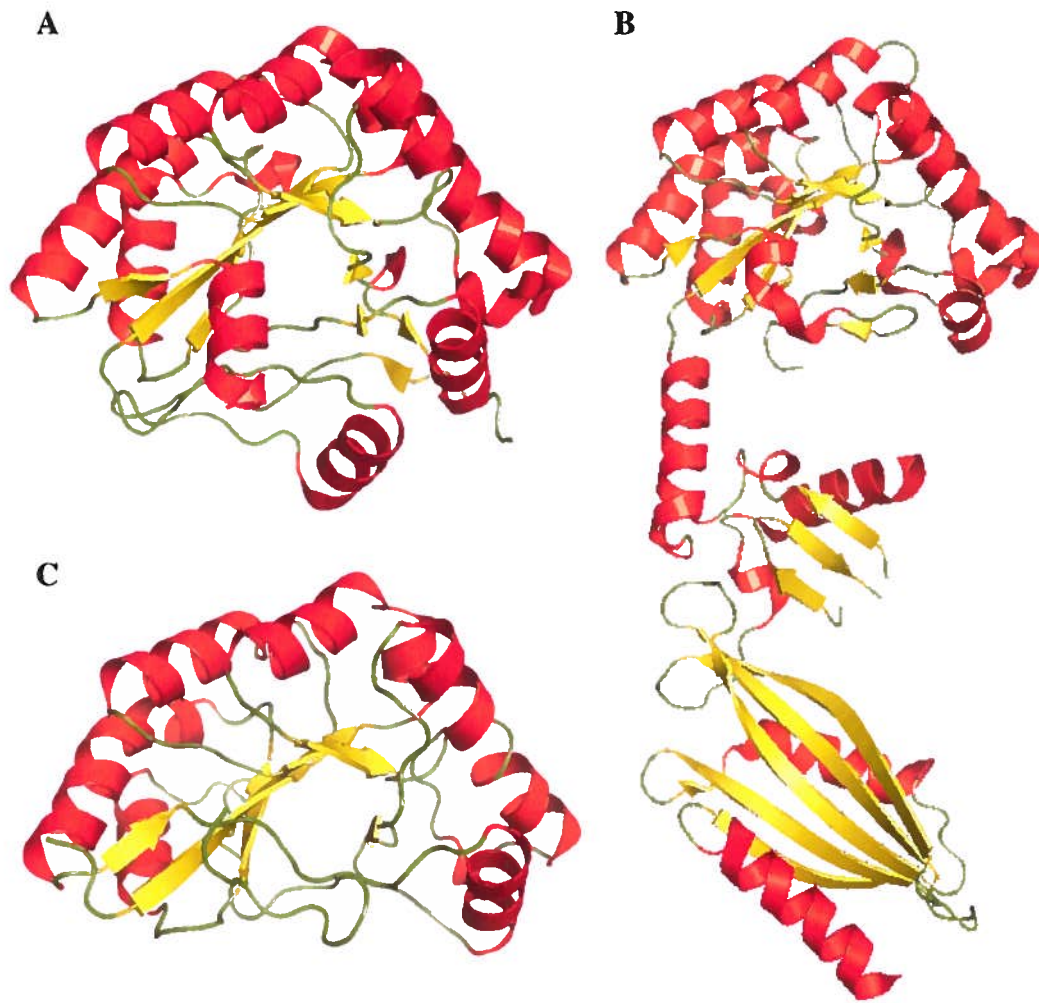
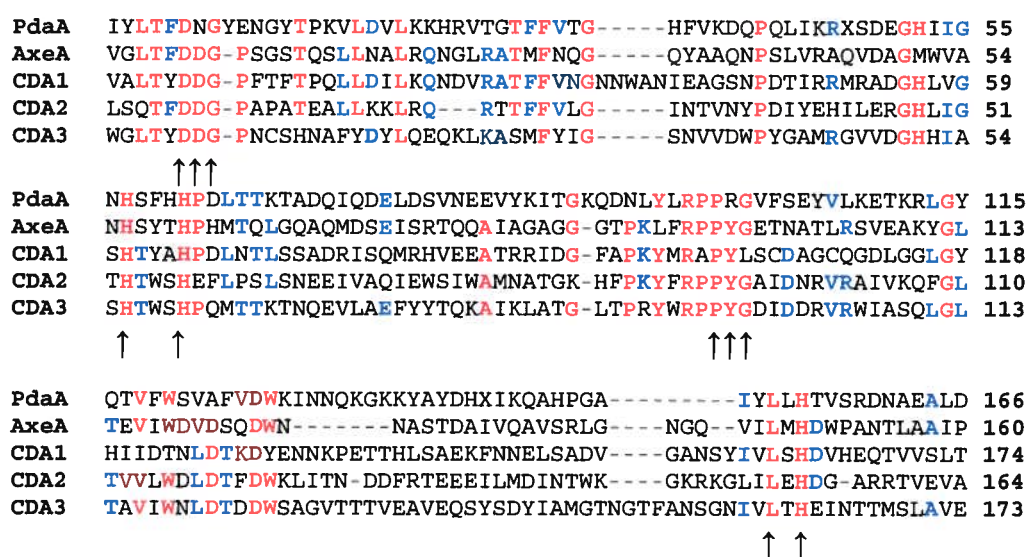


Figure 3. Représentation des structures tridimensionnelles de la peptidoglycane acide *N*-acétylmuramique déacétylase de *Bacillus subtilis* (A), de la peptidoglycane déacétylase de *Streptococcus pneumoniae* (B) et de l'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans* (C) (Blair et van Aalten, 2004; Blair *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006).



1.5 Peptidoglycane déacétylase de *Streptococcus pneumoniae*

La peptidoglycane déacétylase de *Streptococcus pneumoniae* (PdgA) permet à la bactérie, en déacétylant la paroi de peptidoglycane, de résister aux lysozymes de l'hôte (Vollmer et Tomasz, 2002).

La PdgA comporte trois domaines séparés, soit un domaine N-terminal, un domaine central et un domaine catalytique C-terminal (figure 3B) (Blair *et al.*, 2005). Le domaine catalytique comprend le domaine NodB, caractéristique des CE4. La structure du domaine catalytique est très similaire à celle de la PdaA de *Bacillus subtilis*.

Il a été démontré par Blair *et al.* (2005) que la PdgA est une métalloenzyme, liant l'ion métallique grâce à une triade His-His-Asp. La triade est à proximité d'une histidine et d'un acide aspartique agissant respectivement comme acide et base catalytiques. Ainsi, la PdgA effectue une catalyse acide-base utilisant une molécule ion métallique- H_2O comme groupe nucléophile. Le Co^{2+} était l'ion métallique qui permettait la plus grande activité. Les résidus impliqués dans la liaison de l'ion métallique et dans la catalyse sont tous conservés parmi les CE4. Le mécanisme d'action de la PdgA pourrait donc être une caractéristique générique de cette famille d'enzyme.

1.6 Acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans*

1.6.1 Caractéristiques et fonction

L'acétyl xylane estérase produite par *Streptomyces lividans* (AxeA) est une enzyme extracellulaire qui catalyse l'hydrolyse des liens ester des groupements acétyl du xylane (figure 5) (Dupont *et al.*, 1996). Elle fait partie du système xylanolytique, un groupe d'enzymes impliqués dans la dégradation du xylane. L'AxeA, par son activité de déacétylation, rend le xylane plus accessible aux xylanases (Dupont *et al.*, 1996). L'AxeA possède un domaine catalytique N-

terminal et un domaine de fixation au substrat C-terminal, séparés par une région riche en glycine. Le domaine de fixation au substrat possède une grande similarité avec celui de la xylanase B de *Streptomyces lividans* et est spécifique au xylane (Dupont *et al.*, 1996). Le domaine catalytique comprend un domaine d'homologie NodB, classant AxeA parmi la famille des CE4 (Coutinho et Henrissat, 2002; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). La caractérisation de l'AxeA a démontré que l'activité maximale envers le xylane de bouleau était obtenue à une température de 70 °C. L'enzyme conservait 75 % de son activité à 95 °C. L'AxeA était active sur une large gamme de pH, avec une activité maximale à pH 7,5 (Dupont *et al.*, 1996).

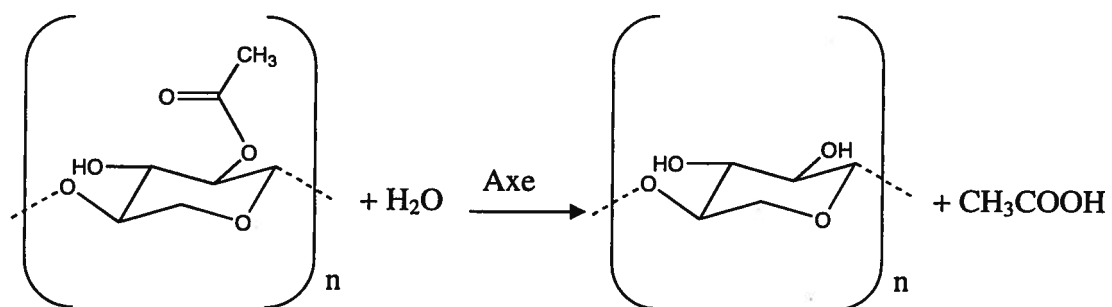


Figure 5. Action catalytique des acétyl xylane estérases.

1.6.2 Structure

Dernièrement, la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de l'AxeA (AxeA_{tr}) a été résolue (Taylor *et al.*, 2006). L'AxeA_{tr} possède une structure très similaire à celle de la PdaA de *Bacillus subtilis* et celle du domaine catalytique de la PdgA de *Streptococcus pneumoniae* (figure 3C). Tout comme ces dernières enzymes, l'AxeA_{tr} présente un sillon à sa surface, dans lequel se situe le site actif.

1.6.3 Spécificité et mécanisme d'action

Lors de la caractérisation de l'AxeA par Dupont *et al.* (1996), des essais enzymatiques ont été effectués avec du xylane acétylé, de la chitine, du *N*-acétyl-D-glucosamine, du glucose penta-acétate, du xylose tétra-acétate, du 4-méthylumbelliféryl acétate et du *p*-nitrophényl acétate. La plus grande activité a été observée avec le xylane acétylé, suivit du xylose tétra-acétate et du glucose penta-acétate. Aucune activité n'a été détectée envers les autres substrats.

Dans une étude portant sur la spécificité de substrat de la CDA de *M. rouxii* et de l'AxeA de *S. lividans*, des essais ont été effectués avec de la glycol chitine, de la chitine 50 (60 % acétylée, 160 000 Da) et du *N*-acétylchitotétraose, (Caufrier *et al.*, 2003). Contrairement aux résultats obtenus par Dupont *et al.* (1996), il s'est avéré que l'AxeA avait la capacité de déacétyler les substrats chitineux. D'autres études corroborent ce fait et permettent de conclure que cette enzyme peut hydrolyser des groupements *O*- et *N*-acétyle (Nisole *et al.*, 2006; Puchart *et al.*, 2006).

Dans des études portant sur le mode d'action, il a été établi que l'AxeA hydrolysait spécifiquement les groupements 2- et 3-*O*-acétyle de substrats méthyle β-D-glycopyranosides acétylés (Biely *et al.*, 1996; Biely *et al.*, 2003). Il a aussi été démontré que le groupement hydroxyle adjacent au groupement acétyle jouait un rôle important dans le mécanisme de déacétylation (Biely *et al.*, 2003).

Ainsi, l'enzyme requiert un arrangement *trans* des groupements hydroxyle libres et acétylés en positions 2 et 3, pour une action efficace.

Taylor *et al.* (2006) ont démontré que l'AxeA est une métalloenzyme, tout comme la PdgA de *Streptococcus pneumoniae* et la xylanase U *Clostridium thermocellum*. Dans cette même étude, l'AxeA_{tr} atteignait son activité maximale en présence de Co²⁺, lorsque le 2-*O*-acétyl-4-nitrophényl β-D-xylopyranoside était utilisé comme substrat. D'autres études ont aussi montré que la présence de cet ion métallique augmentait l'activité de déacétylation de l'AxeA envers des substrats chitineux. Cependant, dans le cas du xylane acétylé et du 2,3,4-tri-*O*-acétyl-β-D-xylopyranoside, le Co²⁺ n'influçait pas l'activité de l'enzyme (Caufrier *et al.*, 2003; Puchart *et al.*, 2006).

Basé sur le mécanisme d'action proposé pour la PdgA de *Streptococcus pneumoniae*, il a été suggéré que l'AxeA effectue une catalyse acide-base. Tout comme la PdgA, l'acide catalytique serait une histidine (His66), la base catalytique un acide aspartique (Asp13) et l'ion métallique formerait le groupe nucléophile (Taylor *et al.*, 2006).

1.7 Autres acétyle xylane estérases

Selon la classification basée sur la similarité de séquences, les acétyle xylane estérases (Axe) sont classées dans les familles 1 à 7 des carbohydrates estérases (Coutinho et Henrissat, 2002; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Des Axe ont été identifiées et caractérisées chez de nombreux microorganismes, incluant des bactéries et des champignons (tableau 3). En plus des structures de l'AxeA_{tr} de *S. lividans* et du domaine C-terminal de l'enzyme bifonctionnelle XylU de *Clostridium thermocellum*, deux autres structures tridimensionnelles d'Axe ont été publiées, soit celles de *Trichoderma reesei* et de *Penicillium purporogenum* (figure 6) (Hakulinen *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001). Ces deux Axe sont classées dans la famille 5 des carbohydrates estérases (CE5) et possèdent une

structure très similaire, sans lien avec celle des CE4. L'étude des Axe de *T. reesei* et de *P. purporogenum* a permis d'élucider leur mécanisme d'action. Ainsi, pour les Axe de la famille CE5, la catalyse s'effectue grâce à une triade Ser90-His187-Asp175 (Hakulinen *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001). Ces résidus catalytiques ne sont pas présents chez les membres des CE4.

Tableau 3. Acétyle xylane estérases de différents organismes.

Sources	# CE	Masse moléculaire (kDa)	pH optimal	Température optimale (°C)	Références
<i>Aspergillus awamori</i>	1	32,6	7,0	-	Koseki <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus ficuum</i>	1	29,5	7,0	37	Chung <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus pumilus</i>	7	36,1	8,0	55	Degrassi <i>et al.</i> , 1998
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	-	30,6	6,0	70-75	Luthi <i>et al.</i> , 1990
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	6	55	7,0	45	McDermid <i>et al.</i> , 1990
<i>Neocallimastix patriciarum</i> (BnaA)	6	40,5	5,5	35	Cybinski <i>et al.</i> , 1999
<i>Neocallimastix patriciarum</i> (BnaB)	2	43,0	-	-	Dalrymple <i>et al.</i> , 1997
<i>Neocallimastix patriciarum</i> (BnaC)	3	39,5	-	-	Dalrymple <i>et al.</i> , 1997
<i>Orpinomyces</i> sp. souche PC-2	6	34,8	9,0	30	Blum <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium purpurogenum</i> (AXEI)	1	48,0	5,3	50	Egana <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium purpurogenum</i> (AXEII)	5	23,0	6,0	60	Egana <i>et al.</i> , 1996
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3	-	-	-	Zhang <i>et al.</i> , 1994
<i>Schizophyllum commune</i>	1	31	7,7	30-45	Halgasova <i>et al.</i> , 1994
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	4	34,3	-	-	Tsujibo <i>et al.</i> , 1997
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. souche JW/SL YS485 (AXEI)	7	32	7,0	80	Shao et Wiegel, 1995
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. souche JW/SL YS485 (AXEII)	-	26	7,5	84	Shao et Wiegel, 1995
<i>Trichoderma reesei</i>	5	34	7,0	5,0-6,0	Sundberg et Poutanen, 1991

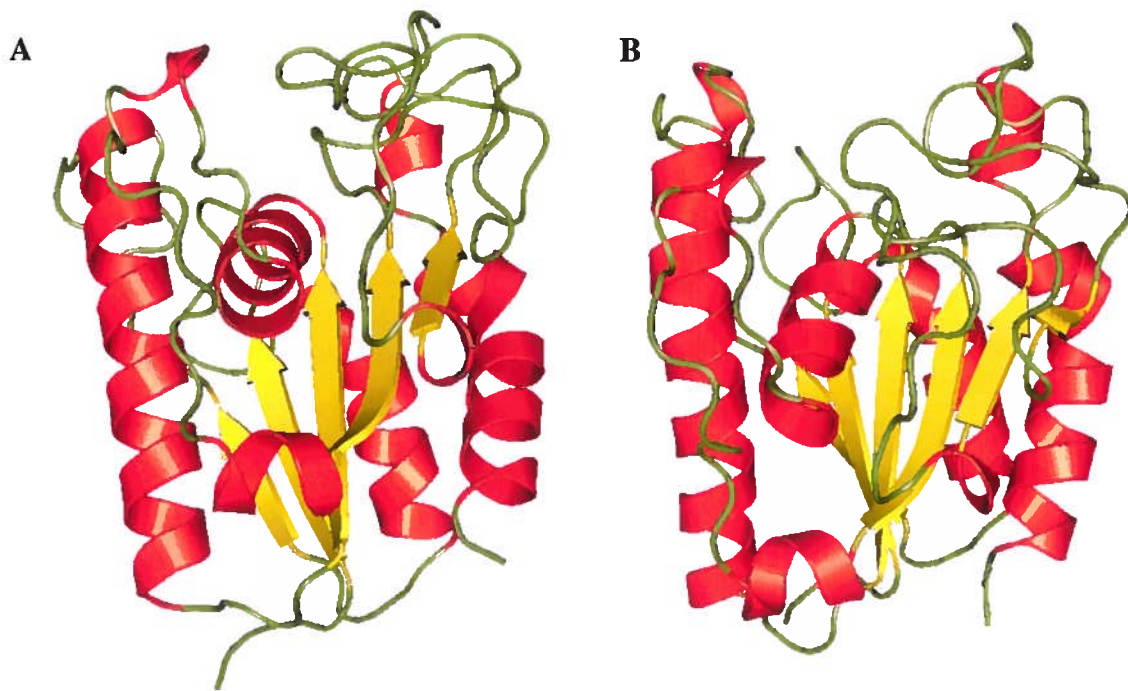


Figure 6. Structure des acétyl xylane estérases de *Trichoderma reesei* (A) et de *Penicillium purporogenum* (B) (Hakulinen *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001).

1.8 Évolution dirigée

Les techniques d'évolution dirigée miment le processus d'évolution naturelle de façon accélérée. Par l'introduction de mutations, les différentes techniques visent à modifier la ou les propriétés d'une protéine donnée dans un dessein précis (Chirumamilla *et al.*, 2001). Contrairement à l'ingénierie protéique traditionnelle, impliquant la modélisation par ordinateur et la mutagenèse dirigée, l'approche de l'évolution dirigée ne nécessite pas de connaissances structurales ou mécanistiques de la protéine d'intérêt (Chirumamilla *et al.*, 2001). Globalement, l'évolution dirigée consiste en la création de bibliothèques de gènes mutés et en l'identification des protéines mutantes possédant les propriétés désirées par sélection ou criblage (Aharoni *et al.*, 2005). Une approche sélective peut être utilisée lorsque que l'activité désirée est reliée à la survie cellulaire. Dans le cas contraire, différentes méthodes de criblages reliées à la propriété recherchée doivent être utilisées. Les protéines mutées possédant l'activité désirée peuvent subir d'autres cycles de mutagenèse et sélection/criblage pour ainsi accumuler des mutations bénéfiques (Aharoni *et al.*, 2005).

Les possibilités de variations pour une protéine donnée sont en lien avec sa taille et le nombre d'acides aminés visés. Ainsi, un nombre important de variants peut être créé lorsque de multiples mutations sont introduites. Parce que la majorité des mutations sont néfastes, un grand nombre de mutants doivent être analysés pour espérer identifier une protéine possédant des caractéristiques améliorées. La sélection/criblage est donc souvent l'étape limitante d'une étude d'évolution dirigée (Aharoni *et al.*, 2005).

1.9 Création de bibliothèques

La création de bibliothèques de gènes mutés est la première étape d'une étude d'évolution dirigée. Les méthodes pour générer ces bibliothèques peuvent être classées en trois catégories, soit aléatoires, dirigées et recombinatoires (Neylon,

2004). Dans les méthodes aléatoires et dirigées, la diversité est générée directement à partir de la séquence du gène d'intérêt par mutations, insertions ou délétions. L'approche aléatoire comprend l'utilisation d'agents mutagènes, de souches mutatrices et de diverses techniques d'amplification par PCR. Dans le cas de l'approche dirigée, l'introduction de variations est contrôlée et vise des régions spécifiques du gène. Ceci est généralement effectué par PCR à l'aide d'amorces dégénérées ou de cassettes. À l'inverse, les méthodes recombinatoires n'introduisent pas directement de mutations, mais génèrent la diversité en combinant les séquences d'un ou de plusieurs gènes (Neylon, 2004).

1.9.1 Méthodes aléatoires

Les agents mutagènes chimiques et physiques ont longtemps été utilisés dans l'étude des systèmes biologiques. Le principe repose sur le fait que l'ADN endommagé par irradiation ou alkylation est incorrectement répliqué ou réparé, menant à l'introduction de mutations (Neylon, 2004). L'utilisation de souches bactériennes mutatrices est une autre façon simple de muter un gène. Les souches mutatrices comportent des déficiences au niveau de leurs systèmes de correction et/ou réparation de l'ADN. Généralement, ces déficiences sont causées par des mutations dans les gènes *mutD*, *mutS* et *mutT* (Nguyen et Daugherty, 2003). Les agents mutagènes et les souches mutatrices ont comme désavantage commun d'affecter le vecteur et l'ADN chromosomique de la souche lors du processus de mutation, ce qui est peu souhaitable pour la construction de bibliothèques. De plus, le changement d'un ou deux nucléotides par gènes peut nécessiter de nombreux passages dans les souches mutatrices (Neylon, 2004; Greener *et al.*, 1996).

L'*error-prone* PCR (epPCR) est la méthode aléatoire la plus utilisée pour la création de bibliothèques (Cirino *et al.*, 2003). L'epPCR est une adaptation de la méthode de PCR classique, modifiée pour augmenter le taux d'erreurs de l'ADN polymérase. Ceci est obtenu le plus souvent en incorporant une concentration non optimale de Mn^{2+} et en modifiant le ratio des différents nucléotides (Cadwell et

Joyce, 1994; Cirino *et al.*, 2003). Dépendamment des conditions utilisées, les taux de mutations peuvent varier de 1 à 20 nucléotides par kilobase. Il est possible de moduler le nombre de gènes mutés en variant le nombre de cycles d'amplification et/ou la concentration initiale de la matrice (Cirino *et al.*, 2003). Les nucléotides traditionnels peuvent aussi être substitués par des bases modifiées, permettant ainsi d'obtenir des taux de mutations allant jusqu'à 200 nucléotides par kilobase (Zaccolo *et al.*, 1996). Bien que l'epPCR soit une méthode très utilisée, elle comporte tout de même des défauts. Statistiquement, les mutations sont rarement introduites l'une à côté de l'autre, biaisant la variation des acides aminés par le fait que certains changements seront plus fréquents que d'autres (Neylon, 2004). De plus, avec les polymérases couramment utilisées, les transitions $AT \rightarrow GC$ et les transversions $AT \rightarrow TA$ sont surreprésentées. Conséquemment, tous les types de mutations ne sont pas également représentés et un contenu en GC élevé peut réduire significativement le taux de mutations (Vanhercke *et al.*, 2005; Moore et Maranas, 2000).

Récemment, de nouvelles méthodes ont été mises au point pour obtenir des remplacements aléatoires d'acides aminés non-biaisés. La méthode d'insertion et délétion aléatoires (RID) permet le remplacement d'un nombre arbitraire de bases consécutives à des positions aléatoires par un processus de délétion/insertion (Murakami *et al.*, 2002; Neylon, 2004). Les bases délétées peuvent être remplacées par une séquence spécifique ou aléatoire. Cependant, cette méthode demeure complexe et requiert un investissement de temps important (Neylon, 2004). Une autre méthode, la mutagenèse par saturation de séquence (SeSaM), permet aussi d'éviter les biais de l'epPCR. Cette méthode se divise en quatre grandes étapes, soit la création d'une banque de fragments d'ADN de longueurs variables, l'ajout d'une queue de bases universelles à l'extrémité 3', l'élongation des fragments par PCR et le remplacement des bases universelles par des nucléotides standards. La méthode SeSaM permet la création de bibliothèques dans lesquelles chacune des bases est mutée à saturation (Wong *et al.*,

2004). Bien que les méthodes RID et SeSaM présentent de nombreux avantages, elles semblent rarement utilisées dans les études d'évolution dirigée.

1.9.2 Méthodes dirigées

Les méthodes dirigées de création de bibliothèques consistent en l'introduction d'un oligonucléotide à l'intérieur d'un gène d'intérêt, à une position spécifique. Ce sont les oligonucléotides qui portent les mutations. Ainsi, les deux éléments clés des méthodes dirigées sont la diversification et l'incorporation des séquences synthétiques (Neylon, 2004).

La synthèse d'oligonucléotides dégénérés est couramment utilisée pour obtenir des banques d'ADN synthétiques diversifiés (Neylon, 2004). Les oligonucléotides dégénérés comportent plusieurs bases à une position donnée, permettant ainsi l'introduction de différents codons. Pour qu'un codon puisse coder pour les 20 acides aminés, les quatre bases sont requises à la première et deuxième position, et au moins deux bases à la troisième position. Lorsque les quatre bases sont présentes aux trois positions, trois codons d'arrêt peuvent être introduits (figure 7A). Ceci peut être évité en n'utilisant pas de thymine en première position, ou d'adénine et de guanine en troisième position (figures 7B et 7C) (Neylon, 2004). Par contre, cette dernière stratégie a pour effet de réduire la diversité d'acides aminés. Un compromis est d'exclure l'adénine et/ou la cytosine en position trois, permettant alors l'introduction d'un seul codon d'arrêt sans affecter la diversité des acides aminés (figures 7D et 7E) (Neylon, 2004). L'utilisation d'oligonucléotides dégénérés possède bien évidemment un biais quant à la probabilité d'introduction de chacun des acides aminés, dû à la redondance des codons. Il est possible d'éliminer ce biais en synthétisant des oligonucléotides pour chacun des acides aminés à introduire, pouvant ensuite être mélangés pour la construction de bibliothèques (figure 7F). Cependant, le nombre d'oligonucléotides nécessaire peut être considérable lorsque la région visée comporte un grand nombre de codons (Neylon, 2004).

Indépendamment de la technique de diversification, les oligonucléotides doivent être incorporés au gène d'intérêt. Pour ce faire, il existe de nombreuses techniques basées sur l'amplification par PCR, les plus populaires étant l'élongation par chevauchement, l'utilisation d'une méga-amorce et la mutagenèse par amplification plasmidique (Neylon, 2004).

L'élongation par chevauchement est une technique utilisée depuis longtemps pour l'introduction de mutations (Higuchi *et al.*, 1988). Cette technique nécessite l'utilisation de deux amorces externes (a et b) ainsi que deux amorces internes complémentaires portant les mutations (c et d) (figure 8). Premièrement, deux réactions de PCR séparées sont effectuées en utilisant les groupes d'amorces a/c et d/b. Deux fragments de gènes comportant les mutations sont ainsi obtenus. Ces fragments sont ensuite combinés et amplifiés avec les amorces externes (a et b) pour reconstituer le gène complet.

La méthode de la méga-amorce utilise deux amorces externes et une amorce interne pour l'incorporation des mutations (figure 9) (Sarkar et Sommer, 1990). Un premier PCR est effectué avec l'amorce interne et une des amorces externes, créant ainsi la méga-amorce double brin. Dans la méthode originale de Sarkar et Sommer (1990), la méga-amorce est ensuite purifiée et utilisée avec la deuxième amorce externe pour amplifier le gène natif. Dans une méthode modifiée plus récente, la méga-amorce non-purifiée est allongée en utilisant le gène natif. Seul un brin de la méga-amorce est alors allongé pour former une séquence simple brin correspondant au gène muté complet. Cet ADN simple brin est ensuite amplifié avec les amorces externes pour obtenir l'ADN mutant double brin (Marini *et al.*, 1993).

La mutagenèse par amplification plasmidique, commercialisée par Stratagene sous le nom de QuickChange System, utilise un plasmide double brin contenant le gène d'intérêt et deux amorces complémentaires portant les mutations (figure 10). Les amorces s'hybrident au plasmide et sont allongées par

PCR, générant un plasmide complet avec un insert muté. Le produit de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *DpnI*, spécifique à l'ADN méthylé et hémiméthylé. Le plasmide parental non-muté isolé d'*Escherichia coli* est dam méthylé et est donc susceptible à la digestion par *DpnI*. Ce dernier plasmide est ainsi éliminé et le produit de PCR peut alors être introduit directement dans l'hôte bactérien. La mutagenèse par amplification plasmidique peut aussi être combinée à la méthode de méga-amorce, ne nécessitant alors qu'une seule amorce (Sawano et Miyawaki, 2000).

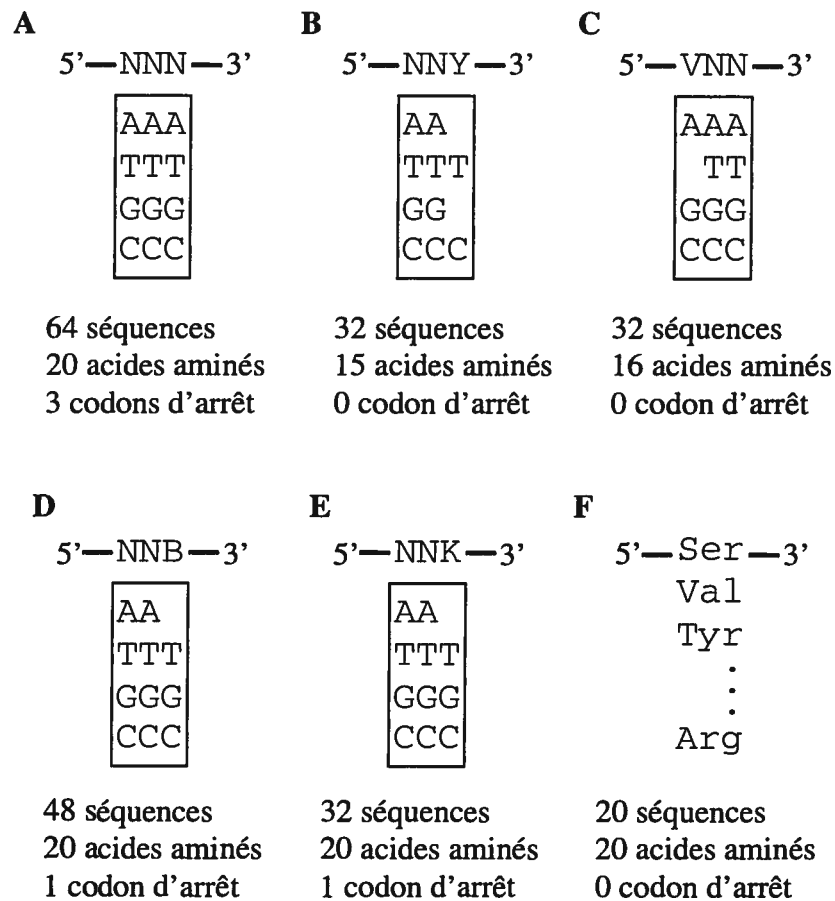


Figure 7. Approches dirigées permettant de générer de la diversité au sein d'une séquence nucléotidique (Neylon, 2004).

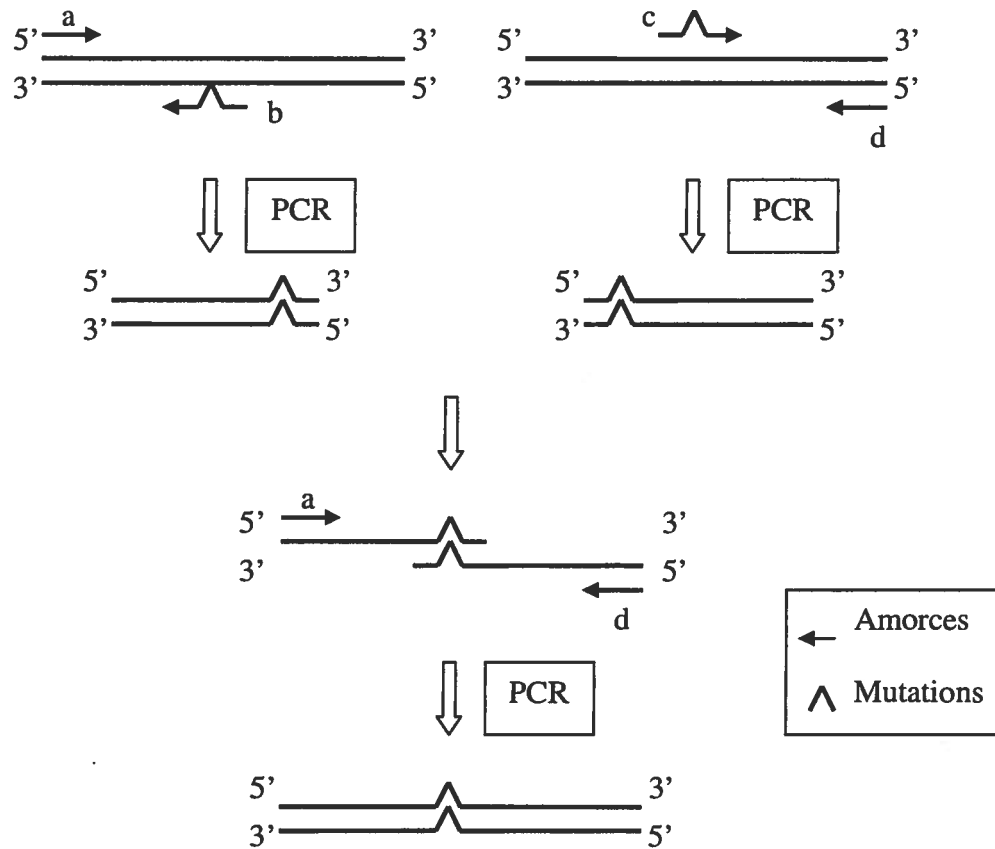


Figure 8. Méthode d'élongation par chevauchement (Higuchi *et al.*, 1988). Amorces externes (a et d); amorces internes portant les mutations (b et c).

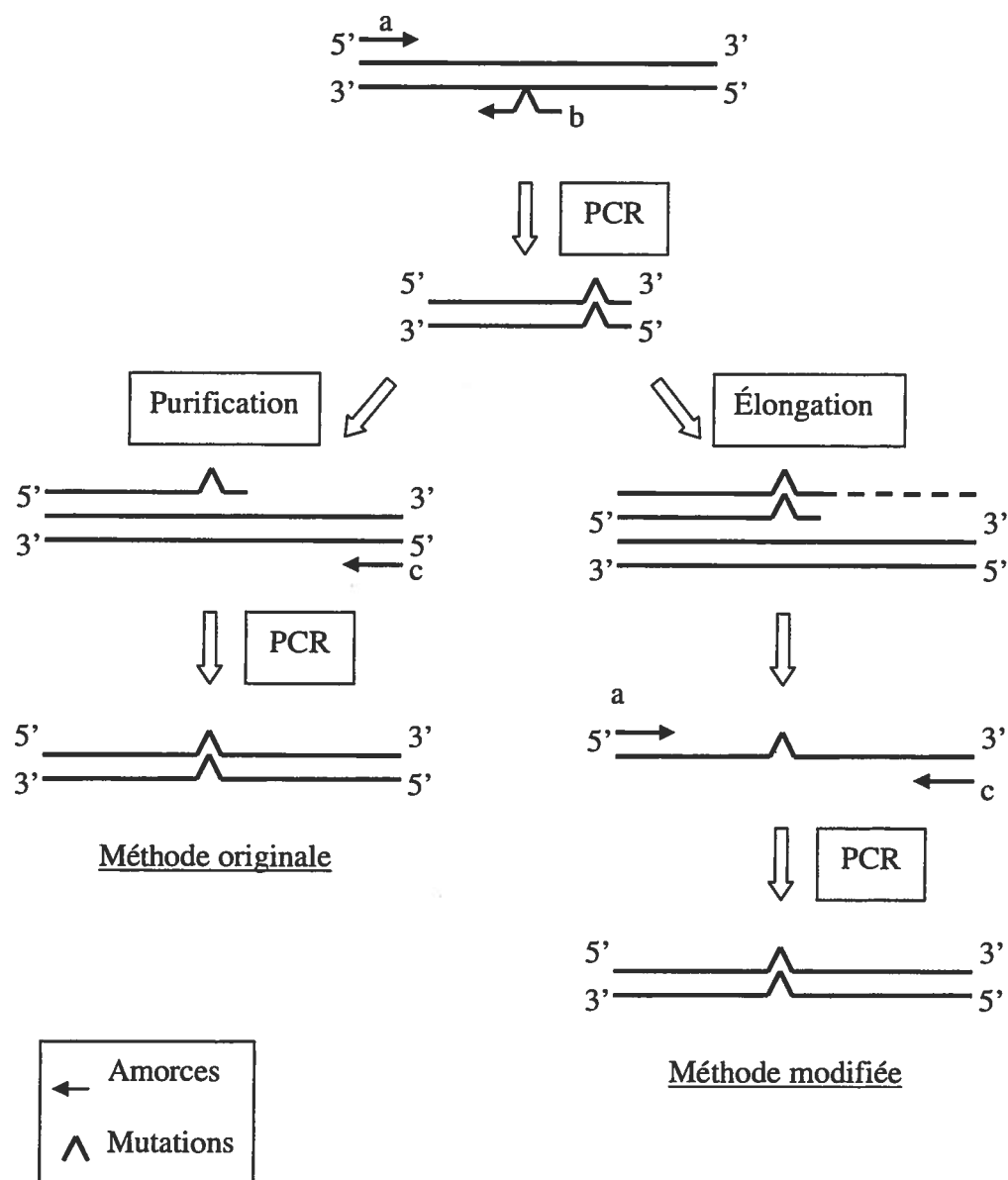


Figure 9. Méthode d'introduction de mutations par méga-amorce (Sarkar et Sommer, 1990). Amorce externes (a et c); méga-amorce portant les mutations (b).

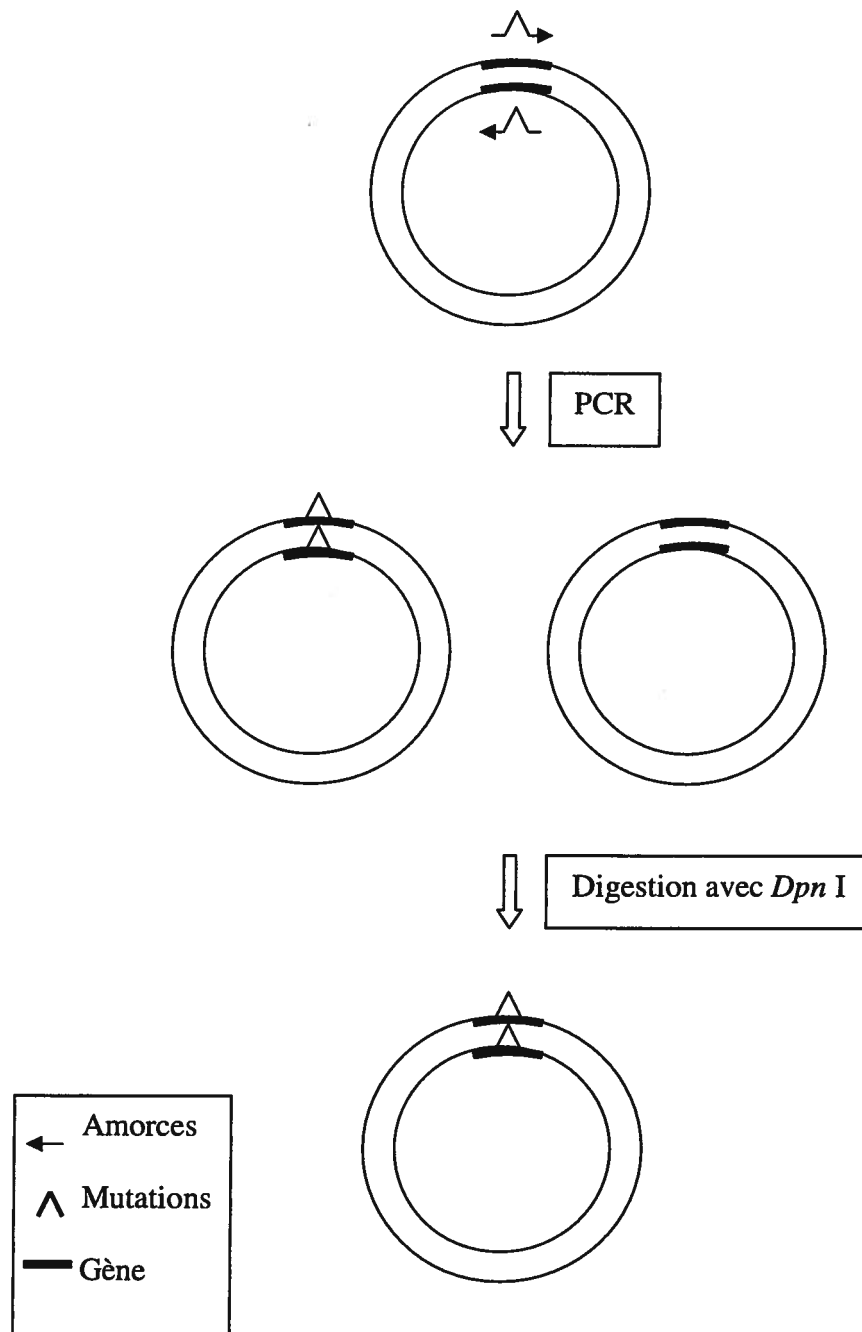


Figure 10. Méthode de mutagenèse par amplification plasmidique (Stratagene). Les mutations sont introduites grâce à deux amorces internes complémentaires. Le plasmide parental non muté est éliminé par digestion avec l'endonucléase *Dpn*I.

1.9.3 Méthodes recombinatoires

Les bibliothèques construites par recombinaison ne résultent pas de l'introduction de mutations, mais du remaniement de séquences existantes. Les diverses techniques recombinatoires peuvent être classées en deux grands groupes, soit homologie-dépendantes (HD) et homologie-indépendantes (HI). Les techniques HD permettent la recombinaison de séquences provenant d'un même gène ou de différents gènes homologues. À l'inverse, les techniques HI sont utilisées pour générer des hybrides de gènes ne comportant que peu ou pas de similitudes (Neylon, 2004).

Le *DNA shuffling* est la technique recombinatoire la plus couramment utilisée (figure 11A) (Stemmer, 1994; Neylon, 2004). Le gène est tout d'abord fragmenté aléatoirement à l'aide de la DNase I. Ces fragments sont ensuite purifiés, puis soumis à des cycles répétés d'amplification par PCR sans utiliser d'amorces. Les fragments peuvent alors s'hybrider les uns aux autres selon leur homologie. Le gène complet est finalement reconstitué et amplifié à l'aide d'amorces externes.

Le processus d'élongation par étape (StEP) est une autre technique recombinatoire homologie-dépendante (figure 11B). Le StEP consiste en l'amplification par PCR d'un mélange de gènes homologues, en utilisant des temps d'élongation très courts. Durant chacun des cycles, les fragments générés à partir des amorces s'allongent et vont s'hybrider à un nouveau brin matrice. Des séquences chimériques sont donc créées par la permutation de matrice durant le processus d'amplification (Aguinaldo et Arnold, 2003). Contrairement au *DNA shuffling*, le StEP ne nécessite pas d'étapes de fragmentation et purification, simplifiant de beaucoup le procédé.

La genèse aléatoire de chimères sur matrice transitoire (RACHITT) est semblable aux techniques de *DNA shuffling* et de StEP, mais permet d'obtenir un plus grand nombre de recombinaisons (figure 11C) (Coco *et al.*, 2001). Dans la

technique RACHITT, les gènes chimériques sont créés par l'hybridation de fragments de gènes à une matrice. Parmi un groupe de gènes homologues, un est utilisé comme matrice et les autres sont fragmentés à l'aide de la DNase I. Après l'étape d'hybridation entre les fragments et la matrice, les segments non-hybridés sont clivés, les vides sont comblés et le tout est ligué. Finalement, le brin matrice est éliminé et les brins chimériques sont convertis en ADN double brin. Bien que la technique RACHITT soit très efficace à générer des recombinaisons, elle demeure plus complexe d'exécution que le *DNA shuffling* et le StEP (Coco, 2003).

À la différence des techniques décrites précédemment, les méthodes homologie-indépendantes ne nécessitent pas d'élongation ou d'hybridation de fragments. Ces méthodes ne permettent pas la recombinaison de mutations ponctuelles, mais sont utiles pour générer des hybrides de gènes non-homologues. La création d'enzymes hybrides par clivage incrémentielle (ITCHY) est la première technique homologie-indépendante à avoir été décrite (Ostermeier *et al.*, 1999). La technique ITCHY est basée sur la ligation de librairies de fragments, générées par le clivage de deux gènes à des extrémités opposées. Les fragments digérés par l'exonucléase III à partir de l'extrémité 5' sont ligués aux fragments digérés à partir de l'extrémité 3', créant ainsi une librairie de gènes hybrides (Ostermeier *et al.*, 1999). Les hybrides obtenus, ne comportent donc qu'une recombinaison. La technique ITCHY peut être combinée au *DNA shuffling* pour ainsi augmenter le nombre de recombinaison. La combinaison de ces deux techniques est nommée SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001).

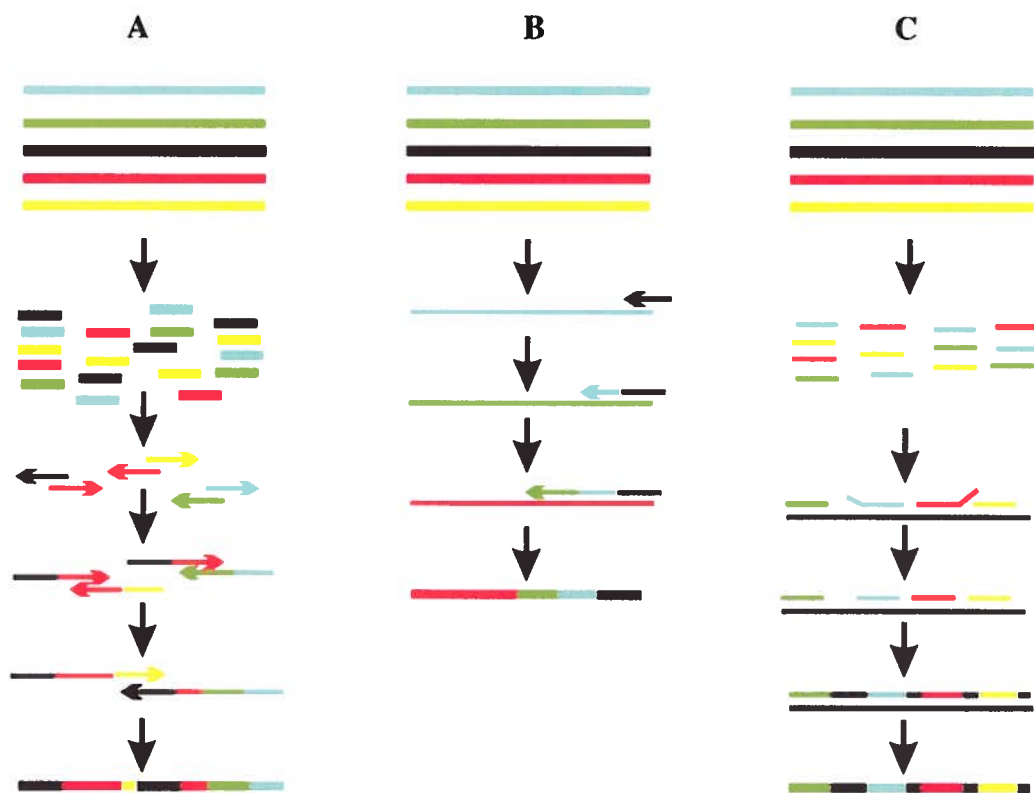


Figure 11. Méthodes recombatoires homologie-dépendantes : *DNA shuffling* (A), StEP (B) et RACHITT (C) (Stemmer, 1994; Aguinaldo et Arnold, 2003; Coco *et al.*, 2001).

1.10 Sélection et criblage

Un des principaux défis d'une étude d'évolution dirigée est de mettre au point une méthode de sélection ou criblage. Idéalement, la méthode doit viser directement la propriété recherchée. Dans le cas d'études portant sur des enzymes, le substrat utilisé pour la sélection/criblage doit être identique ou le plus prêt possible du substrat visé. Aussi, les conditions dans lesquelles la réaction catalytique est conduite doivent se rapprocher des conditions d'application. De plus, la sensibilité de la technique doit être adaptée à la grandeur de la librairie. Finalement, la procédure devrait pouvoir s'appliquer à un format haut débit (Aharoni *et al.*, 2005).

La sélection, dans laquelle seuls les clones comportant les caractéristiques désirées survivent ou croissent plus rapidement, peut rarement être utilisée dans les études d'évolution dirigée. Par contre, lorsque cela est possible, les méthodes de sélection s'avèrent très efficaces (Arnold et Volkov, 1999). Une de ces méthodes est d'utiliser une souche bactérienne déficiente en l'activité recherchée. La sensibilité ou la stringence de la sélection peuvent être ajustées en variant la quantité de substrat ou de produit dans le milieu de culture (Yano *et al.*, 1998; Martineau *et al.*, 1998). La complémentation génétique peut aussi être un moyen efficace de sélection. Elle permet l'identification rapide de clones ayant conservé un certain niveau d'activité. La complémentation est particulièrement utile pour identifier les séquences fonctionnelles dans le cas de librairies de gènes hautement mutés (Christians et Loeb, 1996; MacBeath *et al.*, 1998).

Le criblage est utilisé lorsque la caractéristique ou l'activité désirée ne peut être reliée à la survie cellulaire. Dans ce cas, chacun des clones est analysé pour ainsi identifier les plus performants. De nombreux essais permettent de détecter l'activité enzymatique de colonies sur agar, de cultures en microplaque ou de lysats. La détection peut s'effectuer grâce à des fluorophores ou des chromophores (Leemhuis *et al.*, 2003; Goddard et Reymond, 2004). Ce type

d'essais permet un criblage rapide avec généralement peu de manipulations. La détection sur agar permet d'analyser plus de 10^4 clones par jour, mais est souvent peu sensible. Les produits solubles peuvent diffuser et la détection se limite généralement aux clones très actifs. Un plus grand nombre d'essais s'appliquent aux cultures ou lysats en microplaques, mais nécessitent l'apport de la robotisation pour être efficaces (Aharoni *et al.*, 2005).

1.11 Détection de l'activité de déacétylation enzymatique

La réaction de déacétylation enzymatique consiste en l'hydrolyse d'un groupement acétyl. La détection de l'activité de déacétylation peut se faire en mesurant la disparition du substrat ou la formation des produits. Dans le cas de chitine déacétylases et d'acétyl xylane estérases, le moyen de détection le plus répandu est basé sur la méthode de Bergmeyer (1974) qui permet de quantifier la formation de l'acide acétique (Nisole *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2005; Shrestha *et al.*, 2004; Caufrier *et al.*, 2003; Martinou *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 1997; Tsigos et Bouriotis, 1995; Kafetzopoulos *et al.*, 1993). La méthode de Bergmeyer (1974) est basée sur une réaction couplée de trois enzymes (figure 12). L'acétyl-coenzyme A synthétase (ACS), en présence d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et de coenzyme A (CoA), convertit l'acide acétique en acétyl-CoA, avec formation d'adénosine-5'-monophosphate (AMP) et de pyrophosphate. Ensuite, la citrate synthase (CS), en présence d'acétyl-CoA, convertit l'oxaloacétate en citrate. L'oxaloacétate requis dans la deuxième réaction est produit à partir du L-malate et du nicotinamideadénine dinucléotide (NAD^+), en présence de la L-malate déshydrogénase (L-MDH). Dans cette dernière réaction, le NAD^+ est réduit en NADH. Ainsi, le dosage de l'acide acétique repose sur la formation de NADH, qui est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

L'acide acétique peut aussi être quantifié par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Aye *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 1999; Biely *et al.*, 1996; Dupont *et al.*, 1996). Dans la méthode

HPLC l'acide acétique est mesuré à l'aide d'un détecteur UV à 210 nm. Dans le cas de la méthode GC, la quantification s'effectue à l'aide d'un détecteur par ionisation de flamme (FID).

La réaction de déacétylation peut être suivie par radiométrie en marquant les groupements acétyle avec un isotope hydrogène (^3H) (Araki et Ito, 1975). Ainsi, après extraction des groupements acétyle, la déacétylation est quantifiée en mesurant la radioactivité de l'échantillon (Araki et Ito, 1975; Martinou *et al.*, 2002; Kafetzopoulos *et al.*, 1993; Tsigos et Bouriotis, 1995).

L'activité de déacétylation peut aussi être détectée sur gel de polyacrylamide, suite à une électrophorèse en conditions natives (Trudel et Asselin, 1990; Nahar *et al.*, 2004). Après la migration des échantillons, le gel de polyacrylamide est recouvert d'un autre gel contenant de la chitine soluble (glycol chitine). Suite à une coloration dans une solution de calcofluor, l'activité de déacétylation des différentes protéines est observée à l'aide d'ultraviolets. Le produit de déacétylation, le chitosan, apparaît plus fluorescent que la chitine.

En utilisant des substrats artificiels, tels le 4-méthylumbelliféryl acétate (MUA) et le *p*-nitrophényl acétate (pNPA), l'activité de déacétylation peut être quantifiée en mesurant la formation de produits autres que l'acide acétique (Shao et Wiegel, 1995; Degrassi *et al.*, 1998). La déacétylation du MUA et du pNPA produit respectivement du 4-méthylumbellifère (MU) et du *p*-nitrophénol (pNP). Le MU est un fluorophore qui émet à 440 nm lorsqu'il est excité à 360 nm, et le pNP est un chromophore dont l'absorbance maximale est obtenue à 410 nm. Ainsi, il est possible de quantifier la déacétylation du MUA par spectrofluorométrie et celle du pNPA par spectrophotométrie. Le MUA et le pNPA peuvent aussi être utilisés dans des essais qualitatifs, en les incluant dans le milieu de culture. De cette façon, il est possible de visualiser directement l'activité de déacétylation des différents clones (Howard *et al.*, 2003).

Par spectrophotométrie, la disparition du substrat peut être évaluée en mesurant l'absorbance en fonction du temps (Hekmat *et al.*, 2003). La méthode est basée sur le fait que l'absorbance d'oligomères de chitine diminue lorsque les groupements acétyle sont hydrolysés. Le taux de déacétylation d'un échantillon peut donc être calculé en comparant la variation d'absorbance obtenue à celle attendue pour une déacétylation complète.

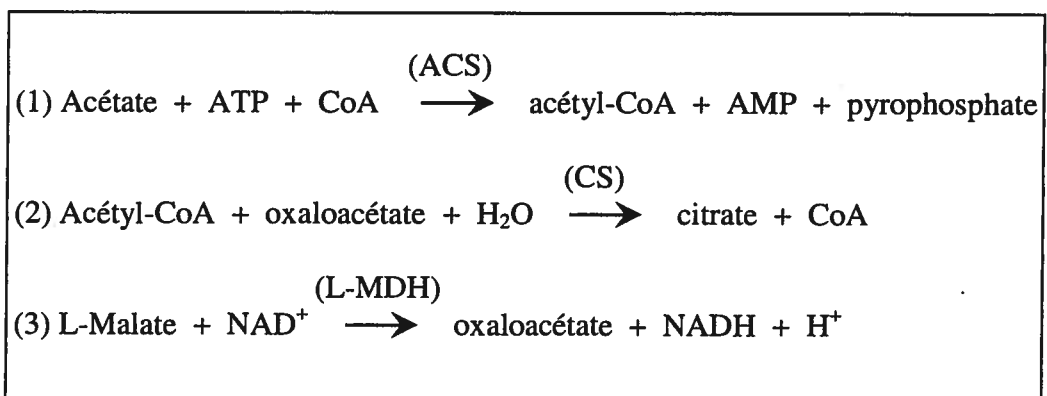


Figure 12. Réaction couplée de trois enzymes permettant la quantification de l'acide acétique. Acétyl-coenzyme A synthétase (ACS), citrate synthase (CS) et L-malate déshydrogénase (L-MDH) (Bergmeyer, 1974).

1.12 Dislocation génétique

1.12.1 Généralités

La dislocation génétique consiste en l'interruption ou la délétion d'un gène pour en empêcher son expression. Cette méthode trouve son utilité en génomique fonctionnelle et en ingénierie cellulaire. Par dislocation génétique, il est possible d'étudier la fonction d'un gène en comparant le phénotype de la souche disloquée avec celui de la souche sauvage. Le génotype d'un organisme peut aussi être modifié à des fins diverses lorsque la fonction du gène est connue. La dislocation génétique peut s'effectuer par simple ou double recombinaison entre le gène d'intérêt et une séquence homologue (Kieser *et al.*, 2000).

Lors d'une simple recombinaison homologue, le gène est interrompu par l'intégration complète du vecteur portant la séquence homologue (figure 13A). Avec cette approche, il est essentiel de s'assurer que le gène interrompu est non-fonctionnel, car plusieurs exemples ont démontré que la séquence partielle d'un gène peut conserver une ou plusieurs activités. La portion du gène interrompu en aval du vecteur, peut aussi être exprimée grâce aux signaux de transcription et traduction contenus dans le vecteur. Bien que la simple recombinaison homologue permette d'obtenir rapidement une souche mutante, il y a toujours possibilité de réversion par excision du vecteur via une seconde recombinaison (Kieser *et al.*, 2000).

Dans le cas d'une double recombinaison homologue, le gène est remplacé en partie ou en totalité par un fragment flanqué de régions homologues (figure 13B). Cette méthode permet le remplacement de la région chromosomique comprise entre les sites de recombinaisons, sans qu'il y ait intégration du vecteur. Par double recombinaison homologue, il est possible d'obtenir des mutants stables et d'exciser précisément le gène d'intérêt sans effet polaire (Kieser *et al.*, 2000).

Ainsi, cette dernière méthode est généralement préférable à la simple recombinaison homologue.

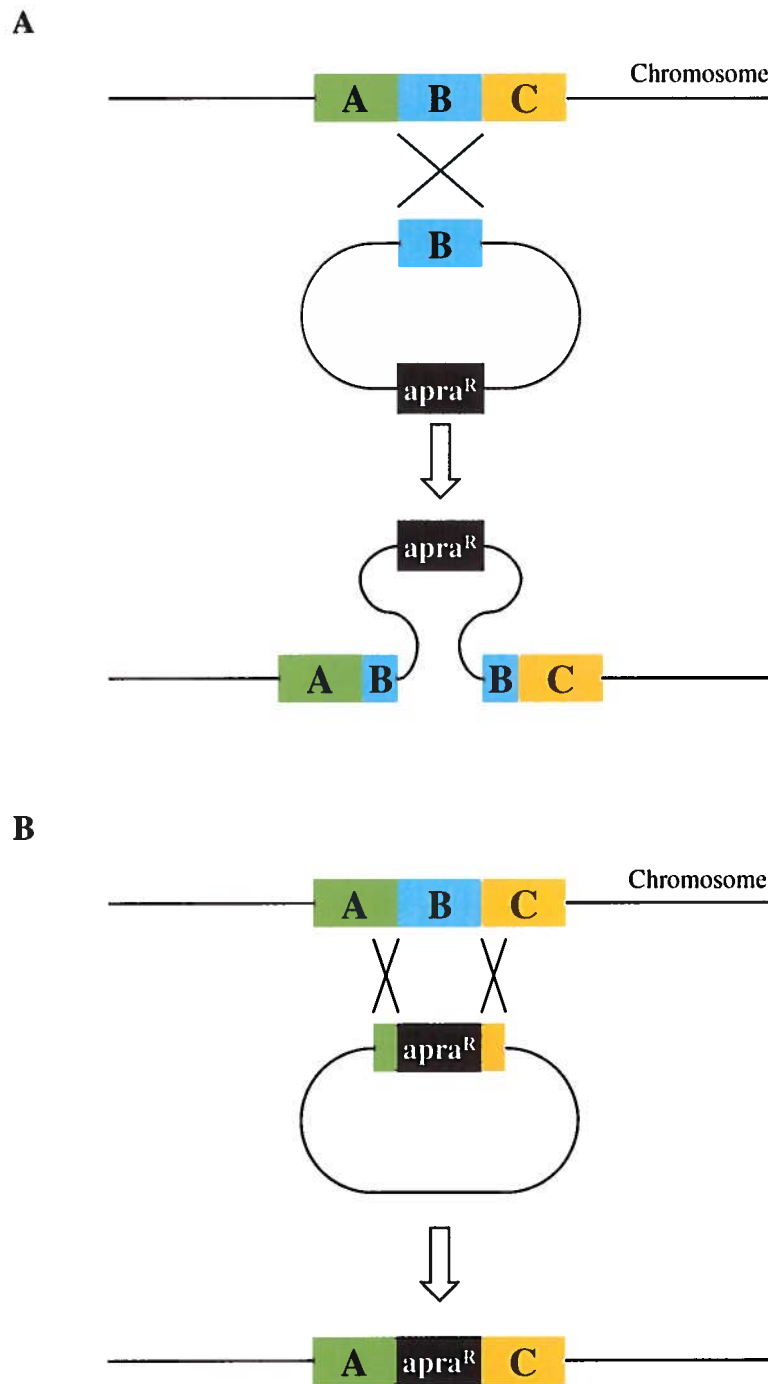


Figure 13. Dislocation d'un gène par recombinaison homologue simple (A) et double (B) (Kieser *et al.*, 2000).

1.12.2 Dislocation génétique dirigée par PCR

Il a été démontré que l'expression des gènes *gam*, *bet*, et *exo*, du bactériophage λ , favorisait grandement la recombinaison homologe d'ADN linéaire chez *Escherichia coli* (Murphy, 1998). Partant de ce fait, Datsenko et Wanner (2000) ont mis au point une technique de dislocation génétique dirigée par PCR, dans laquelle le gène visé est remplacé par une cassette. Gust *et al.* (2003) ont ensuite adapté cette dernière technique aux *Streptomyces*.

La cassette de dislocation se compose d'un gène de résistance à un antibiotique, comme marqueur de sélection, et de sites de reconnaissance pour la FLP-recombinase (FRT). Les séquences FRT permettent l'excision de la cassette par la FLP-recombinase (Datsenko et Wanner, 2000). Dans la technique de Gust *et al.* (2003), la cassette contient en plus une origine de transfert (*oriT*). Des séquences de recombinaison, correspondant aux régions bordant le gène visé, sont ajoutées par PCR à chaque extrémité de la cassette (figure 14). Les amorces utilisées se composent donc d'une séquence de recombinaison en 5' et d'une séquence complémentaire à la cassette en 3'.

Dans la technique de Gust *et al.* (2003), le remplacement du gène d'intérêt, cloné dans un cosmide, est effectué dans une souche d'*E. coli* exprimant les gènes *gam*, *bet* et *exo*. Le cosmide recombinant est ensuite transféré à *Streptomyces* par conjugaison, grâce à l'*oriT* contenue dans la cassette (Gust *et al.*, 2003). Le gène chromosomique est finalement remplacé par la cassette, par double recombinaison homologue. La dislocation dirigée par PCR permet ainsi d'obtenir une souche stable sans effet polaire.

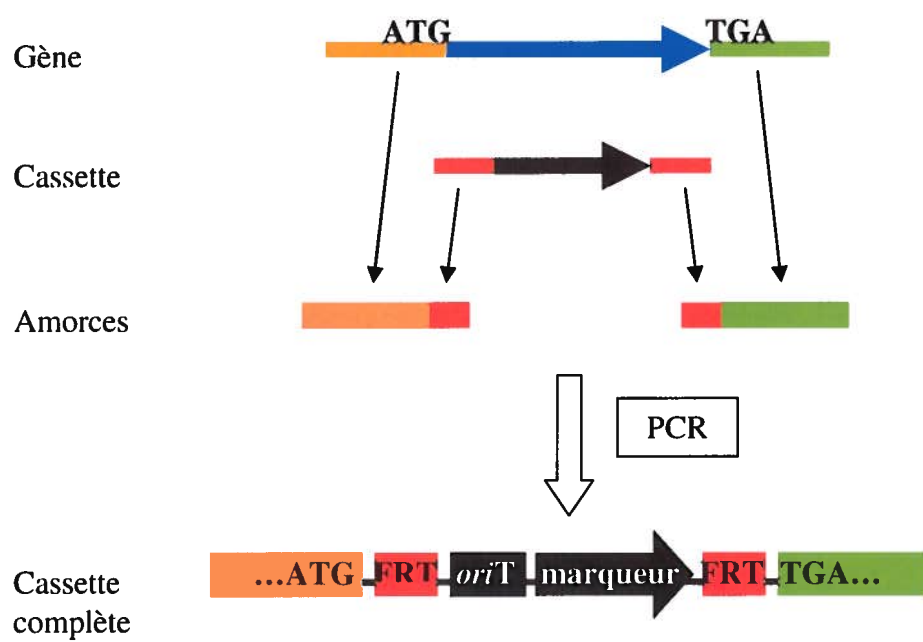


Figure 14. Ajout des séquences de recombinaison à la cassette de dislocation.

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes utilisées pour la dislocation génétique et l'expression protéique sont décrites dans le tableau 4.

Tableau 4. Souches bactériennes.

Souches	Génotypes	Sources/références
<i>E. coli</i>		
DH5 α /pIJ773	F, ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ^- Plasmide : Dérivé de pBluescript KS(+), <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> (RK2), sites FRT	John Innes Centre/ Gust <i>et al.</i> , 2003
BW25113/pIJ790	Dérivée d' <i>E. coli</i> K12, <i>lacI^f</i> , <i>rrnB</i> _{T14} , Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} , <i>hsdR514</i> , Δ <i>araBAD</i> _{AH33} , Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} Plasmide : λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>repA101</i> (Ts)	John Innes Centre/ Datsenko et Wanner, 2000
ET12567/pUZ800 2	F ⁻ <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj-202::Tn10</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtl-1</i> , <i>glnV44</i> Plasmide : <i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4	John Innes Centre/ Paget <i>et al.</i> , 1999
BL21/pREP4	Dérivée d' <i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r_B^- , m_B^-), <i>gal</i> Plasmide : <i>lacI^f</i> , <i>neo</i>	Invitrogen
<i>S. lividans</i>		
1326	Souche sauvage	John Innes Centre
IAF10-164	Dérivée de 1326, <i>msiK</i> ⁻	Hurtubise <i>et al.</i> , 1995
IAF45	Dérivée de 1326, Δ <i>axeA</i>	Ce travail

2.2 Plasmides et cosmides

Le tableau 5 présente les vecteurs plasmidiques et cosmidiqes utilisés.

Tableau 5. Plasmides et cosmides.

Plasmides/cosmides	Description	Sources/références
ScC75A	Dérivé de Supercos-1, contient l'insert C75A	John Innes Centre/ Redenbach <i>et al.</i> , 1996
ScC75AII	Dérivé de ScC75A, Δ <i>axeA</i> , <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> (RK2), sites FRT	Ce travail
pIAF841	Dérivé de pTZ19U, contient la séquence codant pour le peptide signal d' <i>AxeA</i> .	INRS-Institut Armand-Frappier/ Nisole <i>et al.</i> , 2006
pIAF843	Dérivé de pIAF841, <i>axeA</i> _{tr}	INRS-Institut Armand-Frappier/ Nisole <i>et al.</i> , 2006
pIAF844	Dérivé de pIAF841, contient la séquence codant pour le peptide signal de <i>OmpA</i> , fusionnée à la séquence codant pour l' <i>AxeA</i> _{tr} mature	INRS-Institut Armand-Frappier/ Nisole <i>et al.</i> , 2006
pIAFC109	Dérivé de pIJ702, <i>xlnC</i> _{pC109}	INRS-Institut Armand-Frappier
pIAF933	Dérivé de pIAFC109, <i>axeA</i>	INRS-Institut Armand-Frappier
pIAF934	Dérivé de pIAFC109, <i>axeA</i> _{tr}	INRS-Institut Armand-Frappier
pIAF550	Dérivé de pIAF55, <i>tsr</i>	INRS-Institut Armand-Frappier
pIAF935	Dérivé de pIAF550, <i>axeA</i> _{tr}	INRS-Institut Armand-Frappier

2.3 Amorces

Les amorces utilisées lors des différentes réactions de PCR sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6. Séquences des différentes amorces utilisées et leur application.

Nom	Séquence (5'→3')	Sources
Dislocation du gène <i>axeA</i>		
axeA-1	gacccaccccaccagcggagaggaggaatca ctcgcattgattccggggatccgtcgacc	Ce travail
axeA-2	cgtccacgggtacggacccgaggggtccggg ctcggtcattgtaggctggagctgcttc	Ce travail
Confirmation de la dislocation		
c75ver-5	tcaacgccagctatcccagt	Ce travail
c75ver-3	atcacggcgatgggtggccct	Ce travail
Mutagenèse		
CD202	cactcgcattgctaccagtaccgga <i>Sph I</i>	Ce travail
CD201	aaagagctctcaactgccgtcgggagcga <i>Sac I</i>	Ce travail
SGS-V5	ttcgacgacggccccvnnvnnvnnacccagt ccctgctc	Ce travail
SGS-V3	gagcagggactgggtnnbnnbnnbgtgggccc tcgtcgaa	Ce travail
SGS-Y5	ttcgacgacggccccnnynnnynnyacccagt ccctgctc	Ce travail
SGS-Y3	gagcagggactgggttrnnrnnrnnngggccc tcgtcgaa	Ce travail
SYT-V5	tgggtcgccaaccacvnnvnnvnnacccgc acatgacc	Ce travail
SYT-V3	ggatcatgtgcgggtggnbnnbnnbgtggttg gcgaccca	Ce travail
SYT-Y5	tgggtcgccaaccacnnynnnynnyacccgc acatgacc	Ce travail
SYT-Y3	ggatcatgtgcgggtgrnnrnnrnnngtgggtg gcgaccca	Ce travail
Séquençage		
M13for	gtaaaacgacggccagt	Génome Québec
M13rev	ggaaacagctatgaccatg	Génome Québec

2.4 Milieux de culture

2.4.1 Milieux solides pour *E. coli*

Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées sur les milieux 2xTY agar et LB agar. Le milieu 2xTY est composé de 16 g de tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée. Le milieu LB est constitué de 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée. Ces deux milieux contiennent 20 g d'agar par litre et étaient autoclavés à 121 °C durant 20 minutes.

2.4.2 Milieux solides pour *S. lividans*

Le milieu Bennett a été utilisé pour la conservation des souches de *S. lividans*. Il est composé de 1 g d'extrait de levure, 1 g d'extrait de boeuf, 2 g de NZ amine A, 10 g de maltose et 20 g d'agar par litre d'eau distillée. Le pH était ajusté à 7,3 à l'aide de NaOH. Le milieu était stérilisé à l'autoclave durant 20 minutes à 121 °C.

Les protoplastes de *S. lividans* étaient régénérés sur milieu R5 agar lors du processus de transformation. Le milieu R5 est composé de 103 g de saccharose, 250 mg de K₂SO₄, 10,12 g de MgCl₂•6H₂O, 10 g de glucose, 100 mg de Casamino Acid, 5 g d'extrait de levure, 5,73 g d'acide N-tris(hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique (TES) et 2 mL de solution d'éléments traces par litre d'eau distillée. La solution d'éléments traces contient 40 mg de ZnCl₂, 200 mg de FeCl₃•6H₂O, 10 mg de CuCl₂•2H₂O, 10mg MnCl₂•4H₂O, 10 mg de Na₂B₄O₇•10H₂O et 10 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O par litre d'eau distillée. Après la stérilisation du milieu à 121 °C durant 20 minutes, les solutions stériles suivantes étaient ajoutées : 10 mL de KH₂PO₄ 0,5 % (p/v), 4 mL de CaCl₂•2H₂O, 15 mL de L-proline 20 % (p/v), 1 mL de CuSO₄ 5 mg/mL, 10 mL de méthionine 1 % (p/v) et 400 mg de tyrosine préalablement dissous dans 5 mL de NaOH 1N.

Après répartition dans les boîtes de Pétri, le milieu était conservé à température pièce durant environ 5 jours, pour ainsi obtenir une perte de poids d'environ 15 %.

Les essais pour détecter l'activité de déacétylation ont été effectués sur milieu Stewart. Ce dernier est composé de 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g de KH_2PO_4 , 5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de KCl, 1 mL de sels de Mandels (140 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 160 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 200 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pour 100 ml d'eau distillée) (Mandels et Reese, 1957) et 17 g d'agar par litre d'eau distillée. Des milieux Stewart-glycol chitine ont aussi été préparés en ajoutant 1 % (p/v) de glycol chitine (acétylée à 80 %). Du CoCl_2 a aussi été ajouté lors de certains essais, à une concentration finale de 1 mM. Le milieu était autoclavé durant 20 minutes à 121 °C.

Lors de la conjugaison entre *E. coli* et *S. lividans*, les suspensions bactériennes étaient étalées sur milieu MS. Le milieu MS était constitué de 20 g d'agar, 20 g de mannitol et 20 g de farine de soya pour un litre d'eau du robinet. Le milieu était stérilisé à l'autoclave deux fois 15 minutes à 115 °C.

2.4.3 Milieux liquides pour *E. coli*

Les milieux 2xTY et LB ont été utilisés pour la croissance d'*E. coli*. Ces milieux étaient préparés comme dans la section 2.6.1, mais sans l'ajout d'agar. Pour la préparation de cellules électrocompétentes utilisées lors de la dislocation génétique, le milieu SOB a été utilisé. Ce milieu était préparé en additionnant 20 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 0,58 g de NaCl et 0,19 g de KCl à un litre d'eau distillée. Le pH était ajusté à 7,0 à l'aide de HCl. La stérilisation était effectuée à 121 °C durant 20 minutes.

2.4.4 Milieux liquides pour *S. lividans*

Le milieu TSB a été utilisé pour la croissance bactérienne. Il était composé de 27,5 g de poudre de soja tryptique par litre d'eau distillée et était stérilisé à 121 °C durant 20 minutes.

Lors de la préparation des protoplastes, le milieu R5 a été utilisé pour la culture du mycélium. Il était préparé comme à la section 2.6.2, mais était additionné de 2,5 mL de glycine 20 % (p/v) après stérilisation et ne contenait pas d'agar.

Pour l'expression protéique, *S. lividans* a été cultivé en milieu minimal M14. Ce dernier était préparé en ajoutant 5 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , 1,4 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2 mL de Tween 80 et 1 mL de sels de Mandels (Mandels et Reese, 1957) à un litre d'eau distillée. Après dissolution, le pH était ajusté à 7,4. La stérilisation était effectuée à 121 °C durant 20 minutes. Avant l'utilisation, le milieu était complété par l'addition de 6 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 % (p/v), 10 mL de $CaCl_2 \cdot H_2O$ 3 % (p/v) et 50 mL de xylose 25 % (p/v), tous préalablement stérilisés.

2.5 Conditions de culture

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37 °C, à l'exception de la souche BW25113/pIJ790 qui a été cultivée à 30 °C. Les souches de *S. lividans* ont été cultivées à 34 °C. Les différents milieux contenaient les antibiotiques nécessaires à la conservation des souches.

Les fioles Erlenmeyer contenaient un volume de milieu de culture équivalant à 1/5 de leur volume total. Les microplaques à 96 puits (Corning) comportaient des puits carrés de 2 mL et étaient scellées avec une membrane perméable au gaz (Sigma). Les fioles Erlenmeyer étaient agitées à 240 rpm et les microplaques à 800 rpm à l'aide d'un agitateur à microplaques (Lab-Line Instruments).

2.6 Conservation des souches

2.6.1 *Streptomyces lividans*

Les différentes souches de *S. lividans* ont été lyophilisées pour être conservées à long terme. Pour ce faire, les souches étaient cultivées environ sept jours sur milieu Bennett à 34 °C. Le mycélium était gratté afin de récupérer les spores, qui étaient suspendues dans une solution de lait écrémé 10 % (v/v) stérile. Les suspensions étaient distribuées dans des ampoules de verre (Wheaton), puis congelées dans un mélange de méthanol et de glace sèche. Par la suite, les ampoules étaient lyophilisées pendant 16 heures et scellées sous vide à la flamme. À moyen terme, le mycélium obtenu de cultures liquides peut être conservé à – 80 °C dans une solution de glycérol 20 % (v/v) stérile. Sur milieu solide, les souches peuvent être conservées à 4 °C pour une période d'environ un mois.

2.6.2 *Escherichia coli*

Tout comme *S. lividans*, les souches d'*E. coli* ont été lyophilisées pour être conservées à long terme. Les souches étaient cultivées en milieu 2xTY liquide pour une période de 16 heures à 30 °C ou 37 °C. Les cultures étaient ensuite centrifugées et les culots resuspendus dans une solution de lait écrémé 10 % (v/v) stérile. La suite de la lyophilisation était identique à la méthode décrite précédemment pour *S. lividans*. Les cellules pouvaient aussi être resuspendues dans une solution de glycérol 20 % (v/v) stérile, pour être conservées à – 80 °C à moyen terme. Sur milieu solide, les souches pouvaient être maintenues à 4 °C pour quelques semaines.

2.7 Analyse et manipulation de l'ADN

2.7.1 Extraction et purification de plasmides chez *E. coli*

L'extraction et la purification de plasmides chez *E. coli* a été effectuée à l'aide de la trousse QIAprep de Qiagen. Pour ce faire, 2 mL de milieu 2xTY étaientensemencés et incubés 16 heures à 37 °C. De cette culture, 1 mL était prélevé et centrifugé. Le culot était ensuite resuspendu et les cellules étaient lysées par traitement alcalin. L'ADN était récupéré par adsorption sur une colonne de silice (Qiaprep Spin Column) en présence de sels chaotropiques concentrés. Suite à un lavage, l'ADN était élué à l'aide d'une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5. Les plasmides purifiés étaient conservés à – 20 °C.

2.7.2 Extraction et purification de cosmides chez *E. coli*

Les cosmides ont été isolés à l'aide d'une lyse alcaline, suivie d'une purification au phénol/chloroforme. L'isolement était effectué à partir d'une culture de 5 mL en milieu 2xTY, incubée 16 heures à 37 °C. De cette culture, 1 mL était prélevé et centrifugé pendant 30 secondes dans un microtube de 1,5 mL. Le culot était resuspendu dans 100 µL de solution I (Tris-HCl 50 mM à pH 8 et EDTA 10 mM). Par la suite, 200 µL de solution II (NaOH 0,2 M et SDS 1% p/v) étaient ajoutés et mélangés par inversion. Le mélange était ensuite neutralisé par l'ajout de 150 µL de solution III (acétate de potassium 3 M à pH 5,5). Le tout était centrifugé 5 minutes et le surnageant était transféré dans un microtube. Pour la purification, 400 µL d'un mélange phénol/chloroforme (1:1) étaient ajoutés au surnageant. Après avoir été vortexé durant 2 minutes, le mélange était centrifugé 5 minutes. La phase supérieure était transférée dans un microtube et 600 µL d'isopropanol étaient ajoutés. Le tube était placé 10 minutes sur glace, puis centrifugé 5 minutes. Le culot obtenu était resuspendu dans 200 µL d'éthanol 70 % (v/v). Suite à une centrifugation de 5 minutes, le surnageant était éliminé et le

tube était asséché. Finalement, le culot était resuspendu dans 50 µL de Tris-HCl 10 mM à pH 8,0. Les cosmides étaient conservés à – 20 °C.

2.7.3 Extraction et purification de plasmides chez *S. lividans*

Une culture de 5 mL en milieu TSB était préalablement préparée. Suite à une incubation de 24 à 48 heures à 34 °C, environ 100 mg de mycélium étaient récupérés par centrifugation dans un microtube. Le mycélium était ensuite resuspendu dans 500 µL de solution I (Tris-HCl 25 mM à pH 8,0, saccharose 10,3 % (p/v) et EDTA 25 mM), puis centrifugé 30 secondes. Le culot était resuspendu dans 400 µL de solution I contenant 2 mg/mL de lysozyme, puis incubé 30 minutes à 37 °C. Suite à l'incubation, 250 µL de solution II (NaOH 0,3 M et SDS 2 % p/v) étaient ajoutés. Le tout était immédiatement vortexé durant 10 secondes, puis incubé 15 minutes à 70 °C. Ensuite, 100 µL de solution III (5 g de phénol, 5 mL de chloroforme, 1 mL d'eau et 5 mg d'hydroxyquinoline) étaient ajoutés et mélangés par vortex. Après une centrifugation de 10 minutes, le surnageant était récupéré et transféré dans un microtube contenant 50 µL d'une solution de sodium-acétate 3 M. À cela étaient ajoutés 450 µL d'isopropanol et le tout était mélangé par inversion. Suite à une autre centrifugation de 10 minutes, le surnageant était éliminé et le culot était asséché à l'air libre. Une fois sec, le culot était resuspendu dans 50 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM à pH 8,0 et EDTA 1mM). Ensuite, 25 µL de phénol étaient ajoutés et le mélange était vortexé immédiatement durant 5 secondes. Suite à une centrifugation de 3 minutes, la phase supérieure était transférée dans un autre microtube et 50 µL d'isopropanol étaient ajoutés. Le tout était mélangé par inversion, puis incubé 5 minutes à température pièce. Le microtube était centrifugé 5 minutes et le surnageant était éliminé. Une fois le microtube asséché, l'ADN était resuspendu dans 50 µL de tampon TE ou de Tris-HCl 10 mM à pH 8,0. Les plasmides étaient conservés à – 20 °C.

2.7.4 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

L'ADN était digéré dans un volume réactionnel de 20 μL , pour un maximum de 17 μL d'ADN. Différents tampons étaient utilisés selon les enzymes de restriction : le tampon L 10x (Tris-HCl 100 mM à pH 7.5, MgCl_2 100 mM et dithiothréitol 10 mM), le tampon M 10x (Tris-HCl 100 mM à pH 7.5, MgCl_2 100 mM, dithiothréitol 10 mM et NaCl 500 mM), le tampon H 10x (Tris-HCl 100 mM à pH 7.5, MgCl_2 100 mM, dithiothréitol 10 mM et NaCl 1 M) et le tampon K 10x (Tris-HCl 200 mM à pH 8.5, MgCl_2 100 mM, dithiothréitol 10 mM et KCl 1 M). Les tampons L, M, H et K étaient utilisés à une concentration finale de 1x. Lorsqu'une digestion double était effectuée, le tampon One-Phor-All PLUS 10x (Tris-acétate 100 mM à pH 7.5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM) (GE Healthcare) était utilisé à une concentration finale de 1x ou 2x, dépendamment des enzymes de restrictions. Les digestions étaient effectuées en utilisant 0,5 μL d'enzyme (4–12 U/ μL). Le mélange réactionnel était incubé à 37 °C durant 3 heures. Si nécessaire, 1 μL d'une solution d'ARNase (1mg/mL) était ajouté au mélange, suivi d'une autre incubation de 15 minutes à 37 °C. Les enzymes de restriction pouvaient ensuite être inactivées en incubant le mélange à 65 °C ou 85 °C durant 30 minutes.

2.7.5 Amplification par PCR

L'ADN était amplifié par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Les réactions étaient effectuées dans des microtubes de 500 μL à paroi mince, dans un volume réactionnel de 50 μL . Dans ces tubes, étaient ajoutés 5 μL de tampon 10x (Roche), 4 μL de MgSO_4 25 mM (Roche), 10 μL de dNTPs 10 mM, 5 μL de chacune des amorces diluées à 10 pmol/ μL , 50 ng d'ADN, 2,5 μL de DMSO, 22 μL d'eau ultra pure et 0,5 μL d'ADN polymérase PWO (5U/ μL) (Roche). La polymérase était ajoutée à la toute fin. Les conditions d'amplification sont décrites dans le tableau 7. Après amplification, l'ADN était conservé à – 20 °C.

Tableau 7. Conditions d'amplification.

Étapes	Température et temps	
1. Dénaturation	94 °C, 2 min	} 10 cycles
2. Dénaturation	94 °C, 45 sec	
3. Hybridation	50 °C, 45 sec	
4. Élongation	72 °C, 90 sec	} 15 cycles
5. Dénaturation	94 °C, 45 sec	
6. Hybridation	55 °C, 45 sec	
7. Élongation	72 °C, 90 sec	
8. Élongation finale	72 °C, 5 min	

2.7.6 Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose était utilisée pour analyser et purifier l'ADN. La migration était effectuée dans une cuve DNA Sub Cell de BioRad contenant du tampon TBE (Tris 89 mM, EDTA 20 mM et acide borique 89 mM; ajusté à pH 8,0). Le gel de 15 x 20 cm était préparé en dissolvant entre 0,7 et 2 % (p/v) d'agarose dans le tampon TBE. Le tout était chauffé jusqu'à complète dissolution de l'agarose. La solution était ensuite refroidie jusqu'à environ 50 °C. Une solution de bromure d'éthidium était alors ajoutée à une concentration finale de 0,5 µg/mL. Lorsque solidifié, le gel était placé dans la cuve.

Aux solutions d'ADN était ajouté le tampon d'échantillon 6x (bleu bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v) et Ficoll 400 15 % (p/v)) afin d'obtenir une concentration finale de 1x. Les échantillons étaient déposés dans les puits du gel et la migration était effectuée à 30 V pendant 16 heures ou à 120 V durant 2 heures. Le marqueur de poids moléculaire 1 kb PLUS DNA ladder (Invitrogen) a été utilisé. L'ADN était visualisé sous ultraviolets.

2.7.7 Purification de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ayant migré dans un gel d'agarose ont été extraits et purifiés à l'aide de la trousse QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Les bandes visualisées aux ultraviolets étaient découpées avec un scalpel, puis transférées dans un microtube. Les bandes d'agarose étaient solubilisées dans une solution contenant du thiocyanate de guanidine, à 50 °C. L'ADN était ensuite purifié sur une colonne de silice (QIAquick spin column), puis élué à l'aide d'une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5. L'ADN était conservé à – 20 °C.

2.7.8 Ligation

Le gène amplifié par PCR et le vecteur étaient tout d'abord digérés avec les enzymes de restriction appropriées. Après inactivation, 400 à 600 ng de

vecteur, 600 ng d'insert, 2 μL d'ATP 10 mM, 2 μL de tampon One-Phor-All PLUS 10x (Tris-acétate 100 mM à pH 7.5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM) (GE Healthcare) et 1 μL de T4 ligase (3,5 U/ μL) (GE Healthcare) étaient ajoutés dans un microtube. Le volume était ajusté à 20 μL avec de l'eau distillée. Le mélange était incubé à température pièce entre 4 et 16 heures.

2.8 Transformation bactérienne

2.8.1 Cellules électro-compétentes d'*E. coli*

Une pré-culture était préparée en inoculant une colonie isolée dans 10 mL de milieu 2xTY. Après une incubation de 16 heures à 37 °C, 5 mL étaient prélevés pour ensemer 500 mL de 2xTY frais. Cette culture était incubée à 37 °C jusqu'à une DO_{600} entre 0,5 et 0,8, puis refroidie sur glace durant 15 minutes. La culture était ensuite centrifugée à 4000 x g durant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant était éliminé et le culot était resuspendu délicatement dans 500 mL d'eau distillée stérile à 4 °C. Une centrifugation était effectuée comme précédemment et le culot était resuspendu dans 250 mL d'eau. Après une autre centrifugation, le culot était resuspendu dans 20 mL de glycérol 10 % (v/v) stérile à 4 °C. Une dernière centrifugation était effectuée et le culot était resuspendu dans le volume résiduel pour obtenir un volume de 1,5 mL. Une concentration cellulaire d'environ 1×10^{10} cell/mL était ainsi obtenue. Le tout était réparti dans des microtubes, puis conservé à - 80 °C.

2.8.2 Électro-transformation d'*E. coli*

Un volume de 40 μL de cellules électrocompétentes était mélangé à 2-5 μL d'ADN (≈ 100 ng). Le mélange était ensuite transféré dans une cuvette d'électroporation froide de 0,2 cm (Biorad). L'électroporation était effectuée avec l'appareil GenePulser (Biorad). La résistance utilisée était de 200 Ω , la

capacitance de 25 μF et le voltage de 1,6 kV. Immédiatement après électroporation, 1 mL de milieu 2x TY froid était ajouté à la cuvette. Le tout était ensuite transféré dans un tube de 10 mL et incubé 1 heure à 37 °C. La suspension était finalement étalée à l'aide de billes de verre sur milieu 2xTY agar et incubée 16 heures à 30 ou 37 °C.

Lorsque l'ADN était un produit de ligation, il devait préalablement être traité afin d'éliminer les sels. Pour ce faire, il était tout d'abord incubé à 65 °C durant 10 minutes, pour dénaturer la ligase. Le produit de ligation était complété à 50 μl avec de l'eau distillée et 500 μl de *n*-butanol étaient ajoutés. Le tout était mélangé et centrifugé à 13000 rpm dans une centrifugeuse de table durant 10 minutes. Le surnageant était éliminé et le culot, une fois asséché, était resuspendu dans 5 μL de Tris-HCl 10 mM à pH 8,0.

2.8.3 Protoplastes de *S. lividans*

Tout d'abord, 12 mL de milieu TSB étaientensemencés avec du mycélium sporulé. Cette pré-culture était incubée de 24 à 48 heures à 34 °C. Environ 5 mL de cette pré-culture étaient ensuite centrifugés pour récupérer le mycélium, qui était utilisé pour ensemencer 100 mL de milieu R5. Après une incubation de 24 à 48 heures à 34 °C, le mycélium était récupéré à l'aide d'une centrifugation de 15 minutes à environ 15000 x g et lavé deux fois dans une solution de saccharose 10,3 % (p/v). Après centrifugation, le mycélium était resuspendu délicatement dans 40 mL de tampon P contenant 1 mg/mL de lysozyme et incubé 30 minutes à 37 °C. Le tampon P était composé de 103 g de saccharose, 250 mg de K_2SO_4 , 2 mL d'éléments traces, 2,02 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et complété à 800 mL avec de l'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation, les protoplastes ainsi générés étaient filtrés sur laine de verre pour éliminer le mycélium restant. La suspension de protoplastes était ensuite centrifugée durant 7 minutes à 5000 x g. Le surnageant était éliminé et le culot était resuspendu délicatement dans le volume résiduel, auquel étaient ajoutés 40 mL de tampon P. Le tout était centrifugé 7 minutes à 5000 x g et le culot était resuspendu comme précédemment dans 40 mL de

tampon P. Suite à une autre centrifugation, le culot était resuspendu dans le volume résiduel, puis du tampon P était ajouté pour obtenir une concentration entre 10^8 et 10^9 protoplastes/mL. La concentration de protoplastes était estimée à partir de la DO_{600} . La suspension de protoplastes était répartie dans des microtubes et ils étaient conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.8.4 Transformation des protoplastes de *S. lividans*

Dans un microtube stérile, 5 à 10 μL d'ADN étaient mélangés à 50 μL de protoplastes. Par la suite, 200 μL d'une solution de PEG6000 25 % (v/v) étaient ajoutés et le tout était mélangé. Après une incubation de 90 secondes à température pièce, la suspension était étalée sur milieu R5 agar à l'aide de billes. Suite à une incubation de 16 heures à $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, le milieu était recouvert de 1,5 mL d'eau contenant 0,5 mg de thiostreptone. Une fois asséché, le milieu était de nouveau incubé à $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une période de 3 à 4 jours.

2.9 Création de librairies de gènes mutés

Les différentes librairies ont été obtenues par la mutation du gène *axeA_{tr}*. Les mutations ont été introduites par PCR grâce à la méthode d'élongation par chevauchement. Cette méthode nécessitait l'utilisation de deux amorces externes, ainsi que deux amorces internes complémentaires comportant des séquences dégénérées (tableau 6). Premièrement, deux réactions d'amplification étaient effectuées simultanément avec les groupements d'amorces internes et externes, en utilisant le gène *axeA_{tr}* comme matrice (tableau 8). Les deux fragments de gènes ainsi obtenus, subissaient ensuite une électrophorèse sur gel d'agarose et étaient purifiés comme décrit précédemment. Les deux produits de PCR purifiés étaient ensuite mélangés pour servir de matrice dans une deuxième amplification, effectuée avec les amorces externes CD201 et CD202. Les produits de PCR étaient encore une fois déposés sur gel d'agarose et purifiés. Les librairies ainsi obtenues ont été conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tableau 8. Combinaisons d'amorces utilisées lors de la première réaction d'amplification.

Librairies	Groupes d'amorces
SGS-V	CD202 / SGS-V3 SGS-V5 / CD201
SGS-Y	CD202 / SGS-Y3 SGS-Y5 / CD201
SYT-V	CD202 / SYT-V3 SYT-V5 / CD202
SYT-Y	CD202 / SYT-Y3 SYT-Y5 / CD202

2.10 Préparation de spores de *S. lividans*

Quinze plats de Pétri contenant du milieu Bennett ont été ensemencés et incubés entre 7 à 10 jours à 34 °C, jusqu'à sporulation du mycélium. Les spores ont ensuite été récupérées en ajoutant du glycérol 20 % (v/v) stérile dans les plats de Pétri et en grattant le mycélium délicatement. Le volume final de 10 mL a été transféré dans un Erlenmeyer contenant une barre magnétique et des billes, puis agité à vitesse moyenne durant 10 minutes. La suspension de spores a ensuite été filtrée sur laine de verre stérile. Avant la filtration, la laine a été mouillée avec du glycérol 20 % (v/v) jusqu'à saturation. Après avoir déposé la suspension sur la laine, du glycérol 20 % (v/v) a été ajouté jusqu'à ce que le liquide passant à travers la laine soit clair. Par la suite, le filtrat a été centrifugé à 3000 x g durant 10 minutes à 4 °C. Le culot de spores a ensuite été resuspendu dans le volume résiduel. Si nécessaire, la concentration était ajustée avec du glycérol 20 % (v/v) pour obtenir une concentration de 10^8 spores/ml. La suspension de spores a été répartie dans des microtubes et conservée à - 80 °C.

2.11 Dislocation génétique dirigée par PCR

2.11.1 Extraction de la cassette de résistance à l'apramycine

Le plasmide pIJ773 a tout d'abord été extrait de la souche d'*E. coli* DH5α. La cassette de résistance à l'apramycine a ensuite été purifiée par la digestion du plasmide avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Le produit de digestion a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et la bande correspondant à la cassette a été découpée et purifiée avec la trousse QIAquick Gel Extraction (Qiagen), comme décrit à la section 2.7.7.

2.11.2 Amplification de la cassette de résistance à l'apramycine

La cassette a été amplifiée par PCR à l'aide de deux amorces de 59 nt et 58 nt (axeA-1 et axeA-2). Chacune des amorces comportaient une extrémité 5' de 39 nucléotides complémentaires aux séquences bordant le gène *axeA* (figure 15). À l'extrémité 3', les amorces étaient composées d'une séquence de 19 ou 20 nucléotides spécifique à la cassette. Le produit de PCR a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose, puis purifié à l'aide de la trousse QIAquick Gel Extraction (Qiagen), tel que décrit à la section 2.7.7.

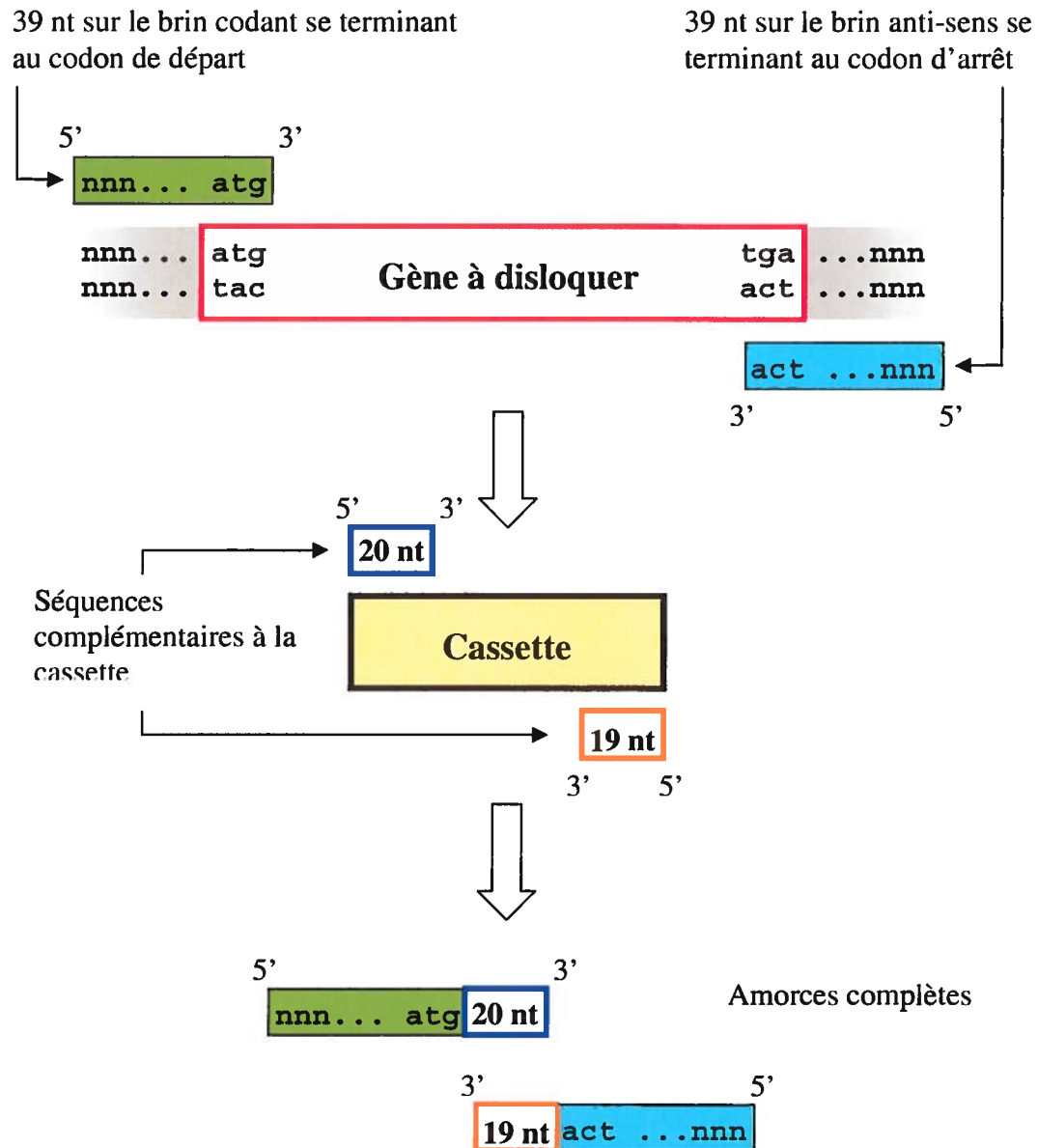


Figure 15. Composition des amorces utilisées pour l'amplification de la cassette de résistance à l'apramycine.

2.11.3 Introduction du cosmide ScC75A dans *E. coli* BW25113/pIJ790

Une pré-culture d'*E. coli* BW25113/pIJ790 a été préparée en inoculant une colonie isolée dans 5 mL de milieu 2xTY. Suite à une incubation de 16 heures à 30 °C, 1 % (v/v) de la pré-culture a été prélevé pour ensemer 50 mL de milieu SOB contenant 20 mM de MgSO₄. Cette dernière culture a été incubée à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,6, puis centrifugée à 2000 x g durant 5 minutes à 4 °C. Le culot a été resuspendu délicatement dans 35 mL de glycérol 10 % (v/v) stérile à 4 °C. Suite à un deuxième lavage, les cellules ont été centrifugées comme précédemment et resuspendues dans le volume résiduel d'environ 100 µL. De cette suspension cellulaire, 40 µL ont été prélevés pour être électro-transformés avec 2 µL d'ADN cosmique. De cette façon, la souche BW25113/pIJ790/ScC75A a été obtenue.

2.11.4 Introduction de la cassette dans *E. coli* BW25113/pIJ790/ScC75A

Avec la souche BW25113/pIJ790/ScC75A, une culture de 50 mL en milieu SOB-MgSO₄ a été préparée comme en section 2.12.3. Les gènes *red*, contenus dans le plasmide pIJ790, ont été induits par l'ajout de 100 µL de L-arabinose 1 M. La culture a ensuite été incubée jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,6. Les cellules électro-compétentes ont été obtenues de la même façon que dans la section 2.12.3. Les cellules ont été électro-transformées avec 2 µL de la cassette de dislocation préparée en section 2.12.2. Les transformants, dans lesquels l'événement de double recombinaison s'est produit, ont été sélectionnés en présence d'apramycine. Les plaques de Pétri ont été incubées à 37 °C pour éliminer le plasmide thermosensible pIJ790.

2.11.5 Extraction et analyse du cosmide ScC75AII

La souche BW25113/ScC75AII a été ensemencée dans 5 mL de 2xTY et le cosmide ScC75AII a été extrait par la méthode décrite en section 2.7.2. Le

remplacement du gène *axeA* par la cassette de dislocation a été confirmé en analysant le patron de digestion obtenu avec l'enzyme de restriction *SacI*.

2.11.6 Transfert du cosmide ScC75AII à *S. lividans* par conjugaison

Tout d'abord, le cosmide ScC75AII a été introduit dans la souche d'*E. coli* ET12567/pUZ8002 par électroporation, comme décrit dans la section 2.12.3. Avec la souche ET12567/pUZ8002/ScC75AII ainsi obtenue, 5 mL de 2XTY ont étéensemencés et incubés 16 heures à 37 °C. De cette culture, 100 µL ont été prélevés pour inoculer 10 mL de 2xTY qui ont été incubés à 37 °C jusqu'à une DO₆₀₀ d'environ 0,6. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du milieu 2xTY afin d'éliminer les antibiotiques, puis resuspendues dans 1 mL de ce même milieu. Afin d'induire la germination des spores de *S. lividans*, 10 µL de suspension (10⁸) ont été dilués dans 500 µL de 2xTY et incubés à 50 °C durant 10 minutes. Une fois refroidi, les spores ont été mélangées à 500 µL de la suspension d'*E. coli* ET12567/pUZ8002/ScC75AII. Le tout a été centrifugé brièvement et resuspendu dans le volume résiduel. Des dilutions de 10⁰ à 10⁻⁴ dans 100 µL d'eau stérile ont été préparées et étalées sur milieu MS sans antibiotique contenant 10 mM de MgCl₂. Les milieux ont été incubés 16 heures à 30 °C puis ont été recouverts avec 1 mL d'eau stérile contenant 0,5 mg d'acide nalidixique et 1,25 mg d'apramycine. L'incubation s'est poursuivie à 34 °C durant 3 à 4 jours. Les exconjugants ayant subi une double recombinaison homologue (Kana^S et Apra^R) ont été sélectionnés à l'aide de milieux Bennett contenant de l'acide nalidixique et de l'apramycine, et de milieux avec acide nalidixique, apramycine et kanamycine. Les exconjugants sensibles à la kanamycine et résistant à l'apramycine ont été repiqués sur des milieux Bennett contenant de l'apramycine pour obtenir des colonies isolées. Afin de confirmer la sensibilité à la kanamycine, ces derniers exconjugants ont été repiqués de nouveau sur des milieux Bennett avec et sans kanamycine.

2.11.8 Confirmation de la dislocation

Dans le but de confirmer la dislocation du gène *axeA*, une amplification par PCR a été effectuée directement sur une colonie de *S. lividans* (Kana^S et Apra^R). Pour ce faire, une colonie a été prélevée et déposée dans le tube à PCR, la suite de la procédure était identique à celle de la section 2.8.5. Les amorces utilisées pour cette amplification, c75ver-5 et c75ver-3, s'hybridaient à environ 150 nucléotides en aval et en amont des régions de recombinaison. Le produit de PCR a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande correspondant à la cassette de dislocation a été extraite et séquencée en utilisant les mêmes amorces.

2.12 Expression protéique

2.12.1 *E. coli*

La souche BL21/pREP4 a été utilisée pour la production de protéine. Une pré-culture en milieu LB était tout d'abord incubée 16 heures à 37 °C. Un milieu LB était ensuite inoculé avec 5 % (v/v) de cette pré-culture et incubé à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,6. À ce moment, l'expression était induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 0,1 mM. La culture était ré-incubée pour une période de 6 heures.

2.12.2 *S. lividans*

Pour l'expression de protéines, la souche IAF45/pIAF935 a été utilisée. Un milieu TSB étaitensemencé et incubé de 24 à 48 heures à 34 °C. Le mycélium était récupéré par centrifugation et lavé avec du milieu M14. Une fois complété, le milieu M14 était inoculé avec le mycélium obtenu à partir de 8 % (v/v) de pré-culture. Lorsque l'expression était effectuée en microplaques à 96

puits, le milieu M14 était inoculé directement avec 8 % (v/v) de pré-culture. La culture était ensuite incubée pour une période de 72 heures à 34 °C.

2.13 Analyse des protéines

2.13.1 Préparation des échantillons

Une fois l'expression protéique terminée, la culture était centrifugée et le surnageant, correspondant à la fraction protéique extracellulaire, était récupéré. Pour obtenir les fractions intracellulaires, le culot était tout d'abord lavé deux fois avec du tampon sodium-phosphate 0,1 M à pH 7,0, puis resuspendu dans un volume minimal du même tampon contenant 0,1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). La suspension était ensuite traitée aux ultrasons afin de lyser les cellules. Les cellules d'*E. coli* étaient soumises à 6 impulsions de 55 W de 10 secondes, avec des pauses de 10 secondes. Pour *S. lividans*, la même intensité était utilisée, mais le mycélium était soumis à 7 impulsions d'une minute avec des pauses d'une minute. Le lysat était ensuite centrifugé à 20000 x g durant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu correspondait à la fraction intracellulaire soluble. Le culot, correspondant à la fraction intracellulaire insoluble, était resuspendu dans un tampon sodium-phosphate 0,1 M à pH 7,0 contenant 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Les différentes fractions étaient conservées à - 20 °C.

2.13.2 Dosage des protéines

La concentration protéique des fractions a été déterminée en utilisant la solution Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), basé sur la méthode de Bradford (1976). Pour ce faire, une courbe standard a été préparée en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard. Suite à l'ajout de la solution Bio-Rad Protein Assay (1:4), le mélange était incubé 15 minutes et la DO était prise à une longueur d'onde de 595 nm.

2.13.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les différents échantillons protéiques ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), basé sur technique décrite par Laemmli *et al.* (1970). Ainsi, à 15 μL d'échantillons étaient ajoutés 5 μL de tampon d'échantillon 4x. Ce dernier était composé de 1,2 mL d'eau distillée, 2,0 mL de Tris·HCl 0,5 M à pH 6,8, 3,2 mL de glycérol, 0,64 g de SDS, 1,6 mL de β -mercaptoéthanol et de 2 grains de bleu de bromophénol. Les échantillons étaient ensuite dénaturés à 100 °C durant 7 minutes. Une fois refroidis, les échantillons étaient déposés sur le gel de polyacrylamide 15 %. La migration était effectuée à 120 V, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

2.13.4 Coloration au bleu de Coomassie

La coloration au bleu de Coomassie a été utilisée pour visualiser les protéines sur gel de polyacrylamide. Pour ce faire, le gel était immergé dans la solution de coloration (1,25 g de bleu de Coomassie, 227 mL de méthanol, 46 mL d'acide acétique et 227 mL d'eau distillée) pour une période de 30 minutes. Les protéines étaient ensuite révélées en transférant le gel dans la solution de décoloration (70 mL d'acide acétique, 300 mL de méthanol et 630 mL d'eau distillée).

2.13.5 Coloration au nitrate d'argent

Lorsqu'une plus grande sensibilité était nécessaire, le gel de polyacrylamide était coloré au nitrate d'argent. Les protéines étaient tout d'abord fixées en incubant le gel dans une solution de méthanol 50 % /acide acétique 5 % (v/v) durant 1 heure, puis dans une solution de méthanol 50 % (v/v) pour 10 minutes. Le gel était ensuite rincé deux fois dans de l'eau déionisée durant 10 minutes et transféré dans une solution fraîche de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02 % (p/v)

pour 1 minute. Suite à deux rinçages d'une minute dans de l'eau déionisée, le gel était coloré dans une solution fraîche de AgNO_3 0,2 % (p/v). Deux autres rinçages étaient effectués et les protéines étaient révélées dans une solution fraîche de Na_2CO_3 2 % (p/v) additionnée de 0,1 % (v/v) de formaldéhyde 37 %. La réaction était stoppée en déposant le gel dans une solution d'acide acétique 5 % (v/v).

2.13.6 Immunobuvardage de type Western

Une fois la migration des protéines terminée, le gel était équilibré dans le tampon de transfert (48 mM de Tris, 39 mM de glycine et 0,375 g/L de SDS) durant 20 minutes. La membrane de nitrocellulose et les papiers buvards ont été trempés dans le même tampon de transfert. Le montage a été réalisé en déposant dans l'ordre : papier buvard, membrane de nitrocellulose, gel et papier buvard. Le transfert a été réalisé dans l'appareil Trans-Blot de Biorad durant 15 minutes à 20 V.

Suite au transfert, la membrane était incubée 30 minutes dans la solution de blocage. La solution de blocage était composée de 1 % de lait écrémé (p/v) dans un tampon TBS pH 7,5 (20 mM de Tris et 500 mM de NaCl). La membrane était ensuite lavée trois fois 5 minutes dans la solution de lavage (0,05 % (v/v) de Tween80 dans du TBS pH 7,5), puis incubée dans la solution d'anticorps primaires (70 μL d'anticorps polyclonaux anti-AxeA provenant de lapin, 29 mL de solution de lavage et 1 mL de solution de blocage) durant 1 heure sous agitation légère. Après trois lavages, la membrane était incubée dans la solution d'anticorps secondaire (7,5 μL d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) et 15 mL de solution de blocage) pendant 1 heure avec une légère agitation. Par la suite, la membrane était lavée trois fois dans la solution de lavage et une fois 5 minutes dans le tampon TBS pH7,5. Finalement, la membrane était incubée dans la solution de développement jusqu'à l'apparition des bandes. La solution de développement était composée de 15 μL de solution NBT (Boehringer Mannheim) et 10 mL de solution de

coloration (50 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mM de Tris-HCl pH 9,5 et 100 mM de NaCl). La réaction était arrêtée par deux lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée.

2.13.7 Immunodétection avec l'appareil Slot Blot

L'appareil Slot Blot de Biorad a été utilisé pour déposer directement des surnageants de cultures sur membrane de nitrocellulose, pour ensuite effectuer une immunodétection. La membrane était tout d'abord équilibrée dans un tampon TBS pH 7,5. La membrane était déposée sur un papier buvard humecté avec du tampon TBS et le tout était placé dans l'appareil Slot Blot. Le vide était alors appliqué et les quatre vis de l'appareil étaient serrées pour que le tout soit étanche. Le vide était ensuite brisé et 200 μL de tampon TBS étaient déposés dans chaque puits. Le vide était appliqué jusqu'à ce que les puits soient vides. Par la suite, 50 μL de surnageant étaient déposés dans les puits et le vide était de nouveau appliqué jusqu'à ce que les puits se vident complètement. Un lavage était effectué en déposant 200 μL de tampon TBS par puits et en appliquant le vide. L'immunodétection était ensuite effectuée de la façon décrite dans la section 2.14.6.

2.14 Détection de l'activité de déacétylation sur milieu solide

2.14.1 Glycol chitine

Des milieux Stewart ont été préparés en incorporant 1 % (p/v) de glycol chitine acétylée à 80 %. Différentes souches de *S. lividans* ont été repiquées sur ce milieu et ont été incubées 3 jours à 34 °C. Les géloses ont ensuite été recouvertes d'une solution de rouge Congo 0,1 % (p/v) durant 15 minutes. Le surplus de colorant a été éliminé, puis les géloses ont été lavées avec une solution de NaCl 5M.

2.14.2 *p*-Nitrophényl acétate

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées sur milieu 2xTY agar et les souches de *S. lividans* sur milieu Stewart. Après croissance bactérienne, une solution de *p*-nitrophényl acétate (pNPA) (1 mM de pNPA dans du tampon sodium-phosphate 0,1 M pH7,0) a été pulvérisée sur les géloses et ces dernières ont été incubées 30 minutes à 37 °C.

2.14.3 4-Méthylumbelliféryl acétate

Des cultures sur Pétri ont été préparées comme en section 2.15.2. Une solution de 4-méthylumbelliféryl acétate (MUA) (1 mM de MUA dans du tampon sodium-phosphate 0,1 M pH7,0) a été pulvérisée sur les milieux. Suite à une incubation de 30 minutes à 37 °C, la fluorescence a été visualisée sous les ultraviolets.

2.15 Essais enzymatiques

2.15.1 *p*-Nitrophényl acétate

Les essais ont été effectués en mélangeant 50 µL de fraction protéique à 100 µL de solution de pNPA. Une première prise de DO₄₀₅ a été effectuée au temps zéro, puis le mélange a été incubé à 50 °C durant 30 minutes. Par la suite, une deuxième lecture a été prise et l'augmentation de la DO₄₀₅ a été calculée. La solution de pNPA était composée de 11,11 mL de tampon sodium-phosphate 0,1 M pH7,0, de 870 µL d'acétonitrile et de 20 µL d'une solution de pNPA 200 mM préparée dans l'acétonitrile.

2.15.2 Oligomères de chitosan

Les essais ont été effectués avec des oligomères de chitosan de degré de polymérisation moyen de 6,4 et de 7,4, acétylés à 20 %. Les essais ont été effectués avec l'AxeA_{tr} pure et des surnageants de cultures d'*E. coli*. Dans les essais effectués avec l'enzyme pure, le mélange réactionnel était composé de 20 μ L d'AxeA_{tr} (0,1 mg/mL), de 20 μ L d'oligomères de chitosan (50 mg/mL), de 10 μ L de CoCl₂ 10 mM et de 50 μ L de tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. Le mélange réactionnel des essais effectués avec les surnageants de cultures avait la même composition, mais 65 μ L de surnageant et 5 μ L de tampon Tris-HCl 0,5 M à pH 7,5 ont été utilisés. Les réactions étaient effectuées à 50 °C durant une période de 24 heures.

2.16 Quantification de l'acide acétique

2.16.1 Trousse K-ACET (Megazyme)

Suite aux essais enzymatiques avec les oligomères de chitosan, l'activité de déacétylation était évaluée en mesurant la quantité d'acide acétique libérée par la réaction. Pour ce faire, la trousse K-ACET de Megazyme a été utilisée. Cette trousse est basée sur la méthode développée par Bergmeyer (1974), décrite à la section 1.12. La quantification était effectuée dans des microplaques à 96 puits en acrylique, à partir de 10 μ L de milieu réactionnel. Le protocole du fournisseur a été adapté à la quantification en microplaques en divisant les volumes des différentes solutions par un facteur de 10.

2.16.2 HPLC

Une méthode de dosage d'acide acétique par HPLC, mise au point par Dupont *et al.* (1996), a aussi été utilisée. Une fois la réaction enzymatique avec les oligomères de chitosan terminée, les échantillons étaient placés dans

l'autoéchantillonneur (Spectra Physics SP8880) à une température de 15 °C. Un volume d'échantillon de 100 µL était injecté sur la colonne HPX-87H (Biorad) maintenue à 60 °C. L'acide acétique était ensuite détecté par la mesure de l'absorbance à 210 nm, à l'aide d'un détecteur UV (Waters 484). La phase mobile utilisée était de l'acide sulfurique 33 mM avec un débit de 0,6 mL/min.

3. RÉSULTATS

3.1 Dislocation du gène *axeA*

3.1.1 Construction de la cassette de dislocation

La cassette de dislocation a été obtenue par la digestion du plasmide pIJ773 avec les enzymes de restrictions *EcoRI* et *HindIII*. Le produit de digestion a subi une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v). Ainsi, des fragments de 2952 pbs et 1384 pbs ont été observés, correspondant respectivement au vecteur linéaire et à la cassette de résistance à l'apramycine (figure 16). Celle-ci a été extraite du gel d'agarose et purifiée à l'aide de la trousse QIAquick de Qiagen. La cassette a ensuite été amplifiée par PCR à l'aide des amorces AxeA-1 et AxeA-2, pour ainsi ajouter les séquences de recombinaisons à chaque extrémité. L'analyse du produit de PCR, par électrophorèse sur gel d'agarose, a permis de visualiser une bande correspondant à la cassette de dislocation (1448 pbs), qui a été extraite et purifiée comme précédemment (figure 17).

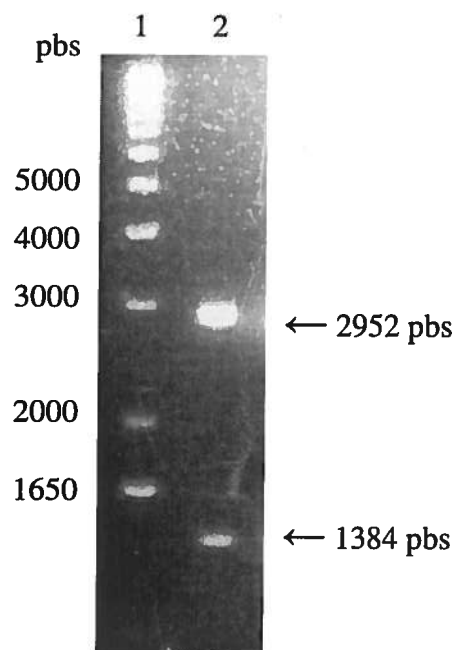


Figure 16. Digestion du plasmide pIJ773 avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v). (1) Marqueur de poids moléculaire et (2) 5 μ L de produit de digestion.

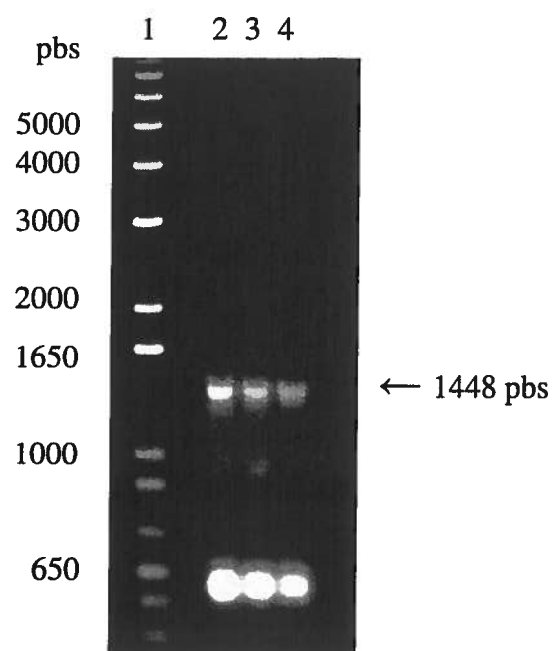


Figure 17. Cassette de dislocation amplifiée par PCR à l'aide des amorces AxeA-1 et AxeA-2, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v). (1) Marqueur de poids moléculaire et (2-4) produit de PCR.

3.1.2 Introduction du cosmide ScC75A dans *E. coli* BW25113/pIJ790

Le cosmide ScC75A, contenant le gène *axeA*, a été introduit dans la souche *E. coli* BW25113/pIJ790 par électro-transformation. Les transformants ont été sélectionnés à l'aide d'ampicilline et de kanamycine, les gènes de résistance à ces antibiotiques étant compris dans le cosmide. La souche BW25113/pIJ790/ScC75A ainsi obtenue, a ensuite été utilisée pour obtenir le cosmide ScC75AII.

3.1.3 Obtention du cosmide ScC75AII

La cassette de dislocation a été introduite dans la souche d'*E. coli* BW25113/pIJ790/ScC75A par électro-transformation. Par double recombinaison homologue, la cassette a remplacé le gène *axeA* contenu dans le cosmide ScC75A, créant ainsi le cosmide ScC75AII (figure 18). Les transformants comportant le cosmide mutant ont été sélectionnés à l'aide d'apramycine. Parmi les transformants résistant à l'apramycine, trois ont été mis en culture afin d'extraire et de purifier leurs cosmides. Pour confirmer le remplacement du gène *axeA* par la cassette, les cosmides ont été digérés avec l'enzyme de restriction *SacI*. De cette digestion, trois fragments étaient attendus pour ScC75A et cinq pour ScC75AII (tableau 9). Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 19). L'analyse a montré la présence des fragments 751 pbs, 8810 pbs et 8966 pbs pour les cosmides ScC75AII, confirmant le remplacement d'*axeA* par la cassette.

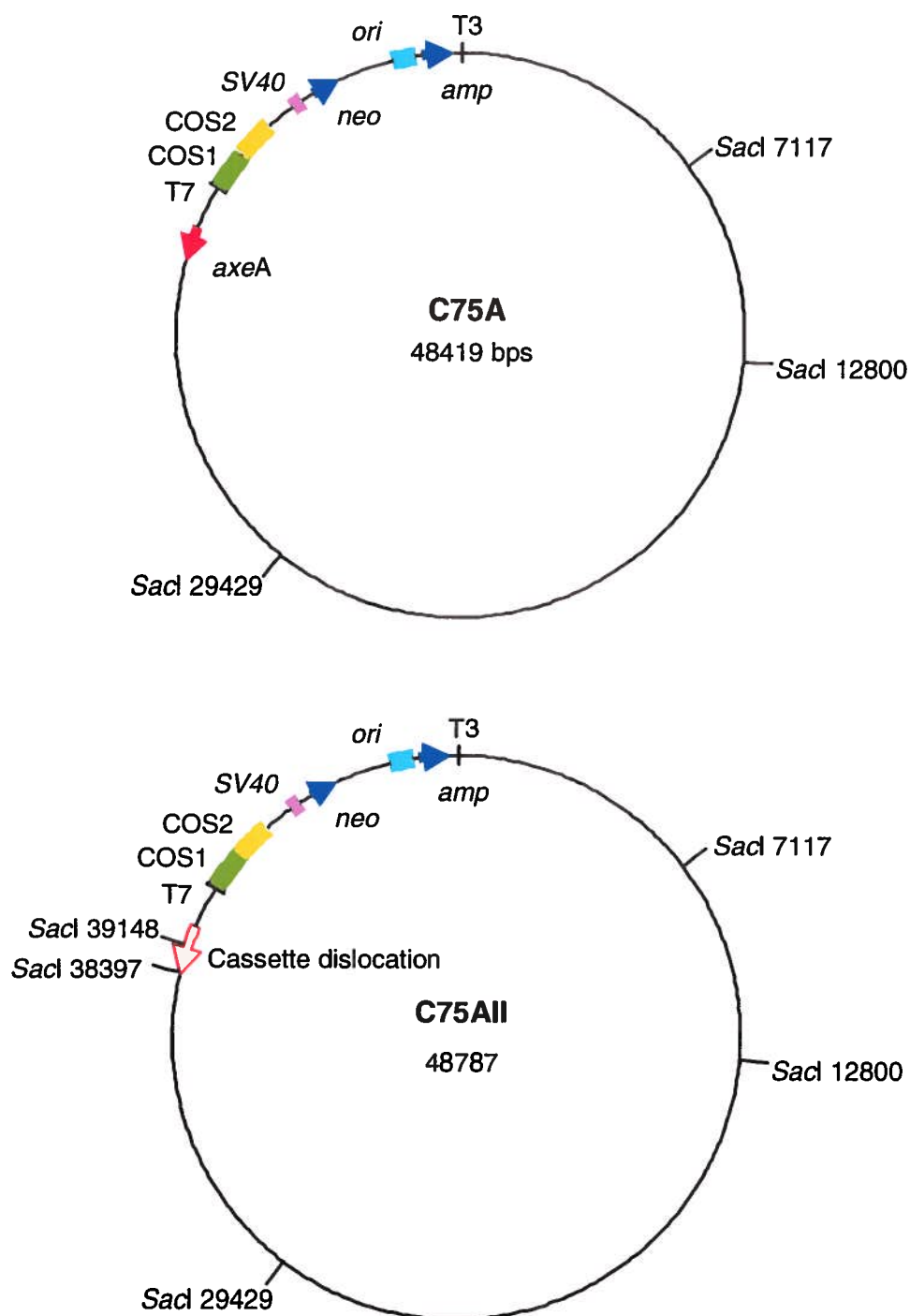


Figure 18. Carte physique des cosmides ScC75A et ScC75AII. Origine de réplication (*ori*), gène de résistance à l'ampicilline (*amp*), gène de résistance à la kanamycine (*neo*), origine de réplication de cellules eucaryotes (*SV40*), séquences nécessaires à l'encapsulation (COS1 et COS2), promoteurs d'ARN polymérases phagiques (T3 et T7) et gène de l'acétyl xylane estérase (*axeA*).

Tableau 9. Longueur (pbs) des fragments générés par la digestion des cosmides ScC75A et SCC75AII avec l'enzyme de restriction *SacI*.

ScC75A	ScC75AII
5683	751
16629	5683
18167	8810
	8966
	16629

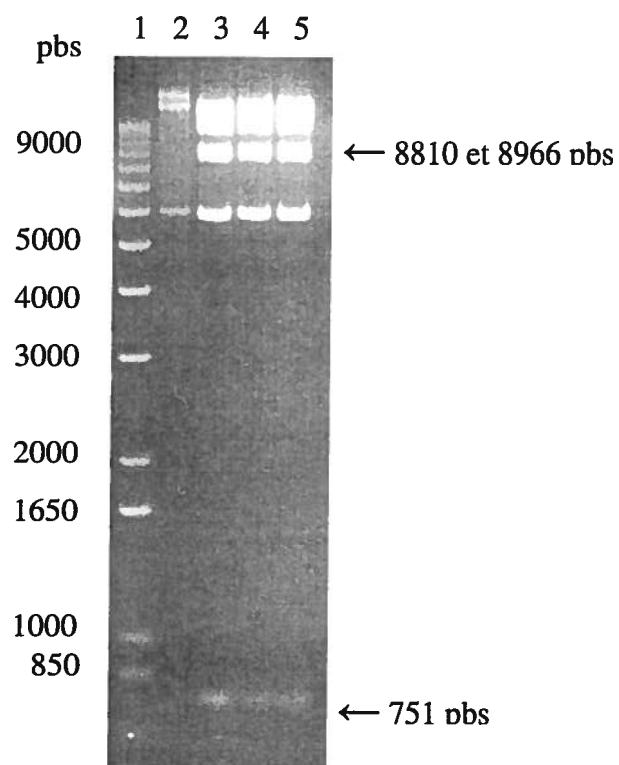


Figure 19. Électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v) montrant les cosmides ScC75A et ScC75AII digérés avec l'enzyme de restriction *SacI*. (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) produit de digestion de ScC75A et (3-5) de ScC75AII.

3.1.4 Confirmation de la dislocation de *axeA*

Le cosmide ScC75AII a été introduit dans *E. coli* ET12567/pUZ8002 et transféré à *S. lividans* par conjugaison. Les exconjugants ont été sélectionnés en présence d'apramycine. Ainsi, seuls les exconjugants ayant intégré la cassette de dislocation dans leur génome ont pu croître. Les colonies ont ensuite été repiquées sur milieu apramycine et apramycine/kanamycine. Les exconjugants résistants à l'apramycine (*apraR*) et sensibles à la kanamycine (*kanaS*) ont été retenus, excluant de cette façon les événements de simple recombinaison homologue.

Pour confirmer la dislocation d'*axeA*, l'ADN chromosomique des exconjugants *apraR/kanaS* a été isolé et la région voisine du gène *axeA* a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces C75ver-5 et C75ver-3. Les amorces ont été construites afin qu'elles s'hybrident à environ 150 pbs en amont et en aval de la région de recombinaison. Les longueurs de fragments attendues sont de 1701 pbs pour la souche ayant intégré la cassette de dislocation et de 1333 pbs pour l'amplification du gène *axeA*. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v). Les quatre exconjugants analysés ont présenté une bande à 1701 pbs, démontrant le remplacement du gène *axeA* par la cassette de dislocation (figure 20).

Le produit de PCR de 1701 pbs a été séquencé en utilisant les amorces C75ver-5 et C75ver-3. Le résultat a démontré que le gène *axeA* a bien été disloqué précisément en laissant les codons ATG et TGA (figure 21). Entre ces deux codons, la séquence complète de la cassette de dislocation était présente.

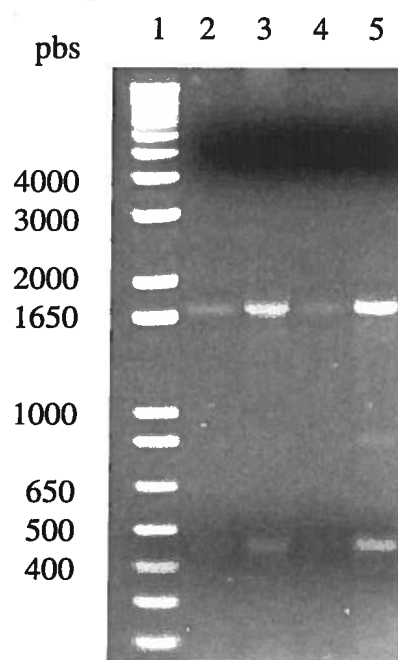


Figure 20. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % (p/v) des produits de PCR obtenus pour l'ADN chromosomique de quatre exconjugants *apraR/kanaS* amplifiés à l'aide des amorces C75ver-5 et C75ver-3. (1) Marqueur de poids moléculaires et (2-5) produits de PCR.

```

1      tcaacgccag ctatcccagt gcgcagacgc tgaccgccag gtcgaacggc
51     agcggcaaca actggggcgc caccatccag gccaacggca actggacctg
101    gccagcgtg tcctgcagcg cgggctgacc caccacacca gcggagagga
151    ggaatcactc gcatgattcc ggggatccgt cgacctgcag ttctgaagtcc
201    ctattctcta gaaagtatag gaacttcgaa gttcccgcca gcctcgcaga
251    gcaggattcc cgttgagcac cgccagggtgc gaataaggga cagtgaagaa
301    ggaacacccg ctgcggggtg ggcctacttc acctatcctg cccggctgac
351    gccgttggtg acaccaagga aagtctacac gaaccctttg gcaaaatcct
401    gtatatcgtg cgaaaaagga tggatatacc gaaaaaatcg ctataatgac
451    cccgaagcag ggttatgcag cggaaaatgc agctcacggg aactgatgcc
501    gtatttgcag taccagcgta cggccacag aatgatgtca cgctgaaaat
551    gccggccttt gaatgggttc atgtgcagct ccatcagcaa aaggggatga
601    taagtttatc accaccgact atttgcaaca gtgccgttga tcgtgctatg
651    atcgactgat gtcacagcg gtggagtgc atgtcgtgca atacgaatgg
701    cgaaaagccg agctcatcg tcagcttctc aacctggggg ttacccccgg
751    cgggtgtgctg ctgggtccaca gctccttcg tagcgtccgg cccctcgaag
801    atgggccact tggactgatc gagggcctgc gtgctgcgct ggggtccggga
851    gggacgctcg tcatgccctc gtggtcaggt ctggacgacg agccgttcga
901    tcctgccacg tcgcccgtta caccggacct tggagttgtc tctgacacat
951    tctggcgctt gccaaatgta aagcgcagcg cccatccatt tgcctttgcg
1001   gcagcggggc cacaggcaga gcagatcatc tctgatccat tgcccctgcc
1051   acctcactcg cctgcaagcc cggtcgcccg tgtccatgaa ctcgatgggc
1101   aggtacttct cctcggcgtg ggacacgatg ccaacacgac gctgcattct
1151   gccgagttga tggcaaaggt tccctatggg gtgccgagac actgcaccat
1201   tcttcaggat ggcaagttgg tacgcgtcga ttatctcgag aatgaccact
1251   gctgtgagcg ctttgccttg gcggacaggt ggctcaagga gaagagcctt
1301   cagaaggaag gtccagtcgg tcatgccttt gctcggttga tccgtcccg
1351   cgacattgtg gcgacagccc tgggtcaact gggccgagat ccgttgatct
1401   tcctgcatcc gccagaggcg ggatgcgaag aatgcgatgc cgctcgccag
1451   tcgattggct gagctcatga agttcctatt ccgaagttcc tattctctag
1501   aaagtatagg aacttcgaag cagctccagc ctacatgacc gagcccggac
1551   ccctcgggtc cgtaccggtg gacgaggccc acgggtacgg accttcggtc
1601   actcactcac ccagcgaccg ccccgccacc cgcgccagat gccgcccga
1651   cacctcgcgc gcctcgggtg tcagcgtccg cagggccacc atcgccgtga

```

Figure 21. Séquence du produit de PCR de 1701 pbs obtenu par l'amplification de la région de recombinaison chromosomique. Le codon de départ du gène axeA est indiqué en vert et le codon de terminaison en rouge. La zone grise correspond à la séquence de la cassette de dislocation et les régions d'hybridation des amorces C75ver-5 et C75ver-3 sont soulignées.

3.2 Construction des librairies de mutants $AxeA_{tr}$

3.2.1 Sites de mutations

Le choix des sites de mutations a été basé sur un alignement de séquences protéiques de divers membres de la famille 4 des carbohydrates estérases (CE4) (figure 22). Les résidus visés se devaient d'être non-conservés parmi les CE4, afin d'éviter de modifier des résidus essentiels à l'activité de déacétylation. Ainsi, les sites Ser16-Gly17-Ser18 et Ser63-Tyr64-Thr65 ont été retenus.

3.2.2 Mutagenèse

Le gène codant pour l' $AxeA_{tr}$ a été muté par PCR à l'aide d'amorces dégénérées. Un premier PCR a été effectué en combinant les amorces internes (SGS-V5, SGS-V3, SGS-Y5, SGS-Y3, SYT-V5, SYT-V3, SYT-Y5 et SYT-Y3) et externes (CD202 et CD201), générant deux portions de gènes (5' et 3'). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v) (figure 23). Les longueurs de fragments attendus étaient de 567 pbs et 205 pbs pour le site SGS, ainsi que de 426 pbs et 346 pbs pour le site SYT. Les bandes correspondantes ont été découpées et purifiées avec la trousse QIAquick (Qiagen), pour être ensuite utilisées dans un deuxième PCR.

Les fragments de 567 pbs et 205 pbs ont été combinés, ainsi que les fragments de 426 pbs et 346 pbs. Dans un deuxième PCR, les mélanges de fragments ont été amplifiés à l'aide des amorces externes CD201 et CD202, pour ainsi reconstituer la séquence complète du gène. Comme précédemment, les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (p/v) (figure 24). Des fragments de longueurs correspondant à l' $axeA_{tr}$ (733 pbs) ont été observés pour l'ensemble des réactions. Les fragments de 733 pbs ont été découpés et purifiés comme précédemment. Quatre librairies ont donc été obtenues, soit SGS-V, SGS-Y, SYT-V et SYT-Y.

AxeA	VGLTFDDG-P SGS TQSLLNALRQNGLRATMFNQG-----QYAAQN	39
PdaA	IYLTFDNGYENGYTPKVLDVLKKHRVTGTFFVTG-----HFVKDQ	40
CDA1	VALTYDDG-PFTFTPQLLDILKQNDVRATFFVNGNNWANIEAGSN	44
CDA2	LSQTFDDG-PAPATEALLKKLRQ---RTTFFVLG-----INTVNY	36
CDA3	WGLTYDDG-PNCSHNAFYDYLQEQLKASMFYIG-----SNVVDW	39
AxeA	PSLVRAQVDAGMWVANH SYT HPHMTQLGQAQMDSEISRTQQAIAG	84
PdaA	PQLIKRXSDEGHIIGNHSFHHPDLTTKTADQIQDELDSVNEEVYK	85
CDA1	PDTIRRMRADGHLVGSHTYAHPDLNTLSSADRISQMRHVEEATRR	89
CDA2	PDIYEHILERGH LIG HTWSHEFLPSLSNEEIVAQIEWSIWAMNA	81
CDA3	PYGAMRGVVDGHHIASHTWSHPQMTTKTNQEVLAEFYYTQKAIKL	84
AxeA	AGG-GTPKLFRPPYGETNATLRSVEAKYGLTEVIWDVDSQDWN--	126
PdaA	ITGKQDNLYLRPPRGVFSEYVLKETKRLGYQTVFWSVAFVDWKIN	130
CDA1	IDG-FAPKYMRAPYLSCDAGCQGD LGGLGYHIIDTNLDTKDYENN	133
CDA2	TGK-HFPKYFRPPYGAIDNRVRAIVKQFGLTVVLWDLDTFDWKLI	125
CDA3	ATG-LTPRYWRPPYGDIDDRVRWIASQLGLTVVLWDLDTFDWKLI	128
AxeA	-----NASTDAIVQAVSRLG----NGQ-VILMHDWPANTLAAIP	160
PdaA	NQKGKKYAYDHXIKQAHPGA-----IYLLHTVSRDNAEALD	166
CDA1	KPETTHLSAEKFNNELSADV----GANSYIVLSHDVHEQTVVSLT	174
CDA2	TN-DDFRTEEEILMDINTWK----GKRKGLILEHDG-ARRTVEVA	164
CDA3	VTTTVEAVEQSYSDYIAMGTNGTFANSIGNIVLTHEINTTMSLAVE	173

Figure 22. Alignement de séquences protéiques partielles de différents membres de la famille 4 des carbohydrates estérases ; acétyle xylane estérase de *Streptomyces lividans* (AxeA), peptidoglycan déacétylase de *Bacillus subtilis* (PdaA), chitine déacétylase de *Colletotrichum lindemuthianum* (CDA1), chitine déacétylase 2 de *Saccharomyces cerevisiae* (CDA2) et chitine déacétylase de *Mucor rouxii* (CDA3). Le site de mutations SGS est surligné en vert et le site SYT en bleu.

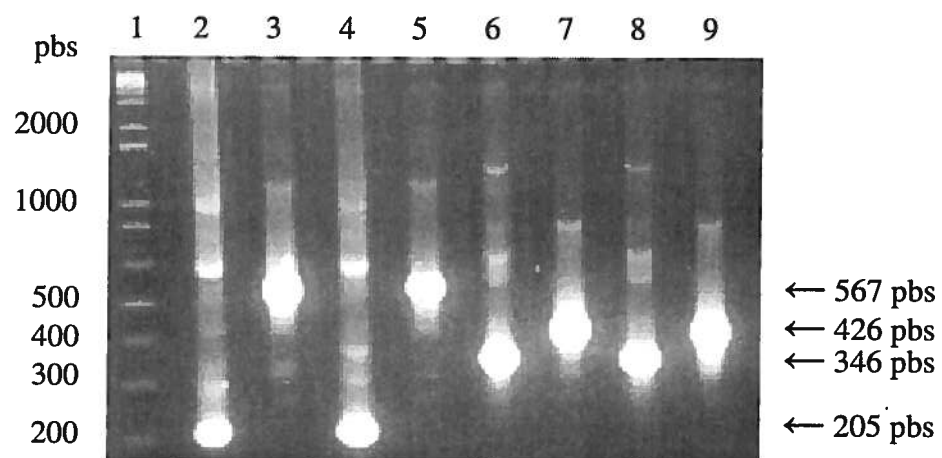


Figure 23. Analyse du premier PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v). (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) SGS-V 5', (3) SGS-V 3', (4) SGS-Y 5', (5) SGS-Y 3', (6) SYT-V 5', (7) SYT-V 3', (8) SYT-Y 5' et (9) SYT-Y3'.

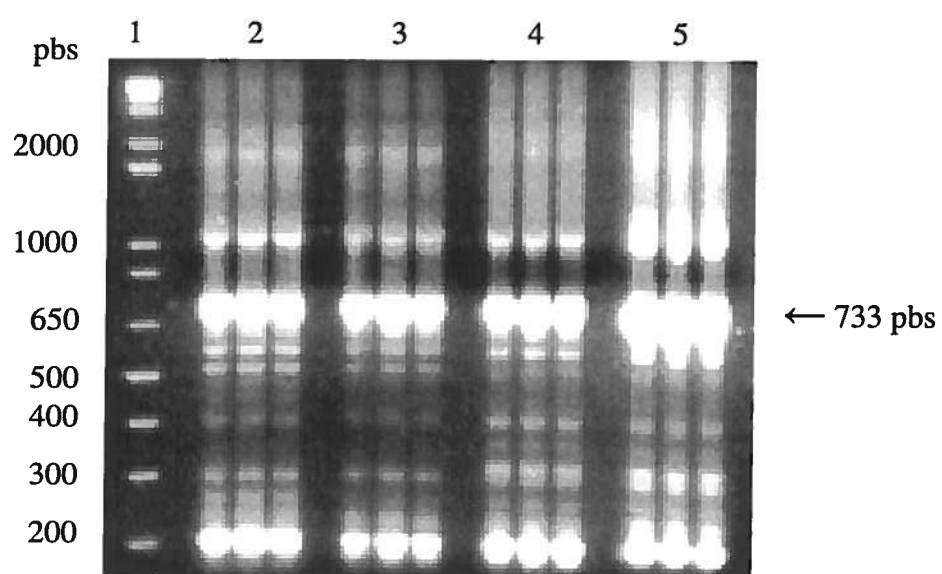


Figure 24. Analyse du deuxième PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (p/v). (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) SGS-V, (3) SGS-Y, (4) S SYT-V et (5) SYT-Y.

3.2.3 Clonage

Les bibliothèques de gènes mutés et le plasmide pIAF844 ont été digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SacI*. Les produits de digestion ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes correspondant au plasmide linéarisé et aux gènes *axeA_r* mutés ont été découpées et purifiées à l'aide de la trousse QIAquick (Qiagen). Les gènes ont été ligués au plasmide et le tout a été introduit dans la souche d'*E. coli* BL21/pREP4 par électro-transformation.

3.2.4 Séquençage

Pour confirmer l'efficacité de la méthode de mutagenèse, l'ADN plasmidique de neuf clones a été isolé et purifié, pour ensuite être séquençé à l'aide des amorces universelles M13rev et M13for. L'analyse des séquences nucléotidiques a permis de confirmer que les neuf clones comportaient des mutations aux trois positions visées (figure 25).

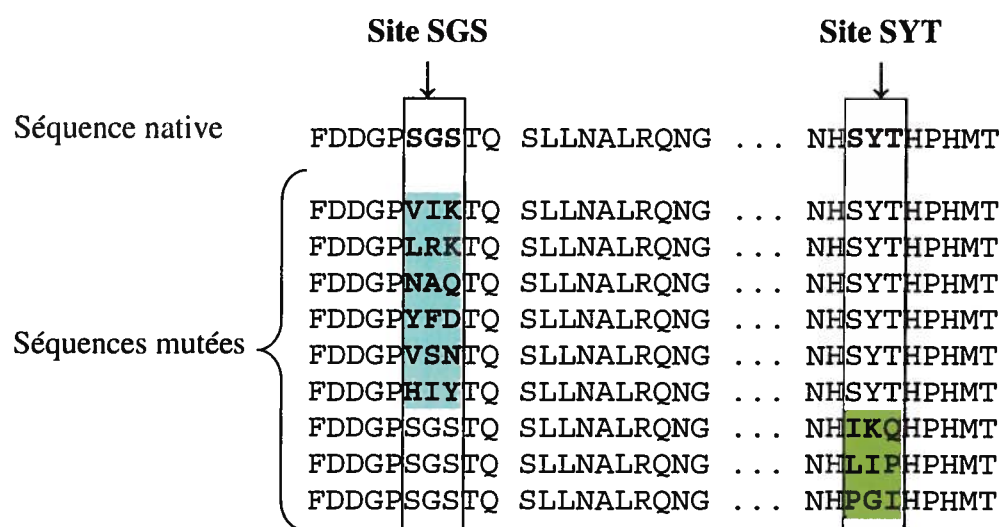


Figure 25. Séquences partielles de neuf clones provenant des bibliothèques SGS-V, SGS-Y et SYT-V

3.3 Expression protéique

L'efficacité d'expression de l'AxeA_{tr} a été évaluée chez deux souches bactériennes, soit *S. lividans* IAF45 et *E. coli* BL21/pREP4. Le vecteur d'expression pIAF935 a été utilisé pour *S. lividans*. Chez *E. coli*, les vecteurs pIAF843 et pIAF844 ont été testés, comportant respectivement la séquence codant pour le peptide signal de l'AxeA et celui de OmpA. L'expression de l'AxeA_{tr} a été évaluée pour des cultures en Erlenmeyer et en microplaques. Les fractions protéiques intracellulaire soluble, intracellulaire insoluble et extracellulaire ont été analysées pour les cultures en Erlenmeyer. Seule la fraction extracellulaire des cultures en microplaques a été analysée.

3.3.1 Profil d'expression de *S. lividans*

Pour les cultures en Erlenmeyer et en microplaque, il a été possible d'observer l'AxeA_{tr} sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie. Dans la fraction extracellulaire, l'enzyme était visible à 23 kDa (figures 26A et 27A). Bien que le poids théorique de l'enzyme soit de 21 kDa, l'immunobuvardage de type Western a confirmé que cette bande correspondait bien à l'AxeA_{tr} (figures 26B et 27B). Dans la culture en Erlenmeyer, l'enzyme a été sécrétée de façon pratiquement pure. La fraction extracellulaire des cultures en microplaques ne possédait pas le même niveau de pureté. En effet, d'autres bandes étaient visibles sur le SDS-PAGE, dont une de forte intensité à environ 17 kDa. Dans les deux types de cultures, des bandes de poids inférieur à l'AxeA_{tr} ont pu être observés par immunobuvardage. Les anticorps anti-AxeA ont aussi révélé la présence de l'enzyme dans la fraction intracellulaire soluble de la culture en Erlenmeyer, mais en trop faible quantité pour être visible sur le SDS-PAGE. Aucune bande de poids supérieur, pouvant correspondre au précurseur (25 kDa), n'a été détectée. Aucune forme de la protéine AxeA n'a été détectée chez les souches sans plasmide (IAF45) et avec plasmide sans insert *axeA*_{tr} (IAF45/pIAF550) (figures 26 et 27).

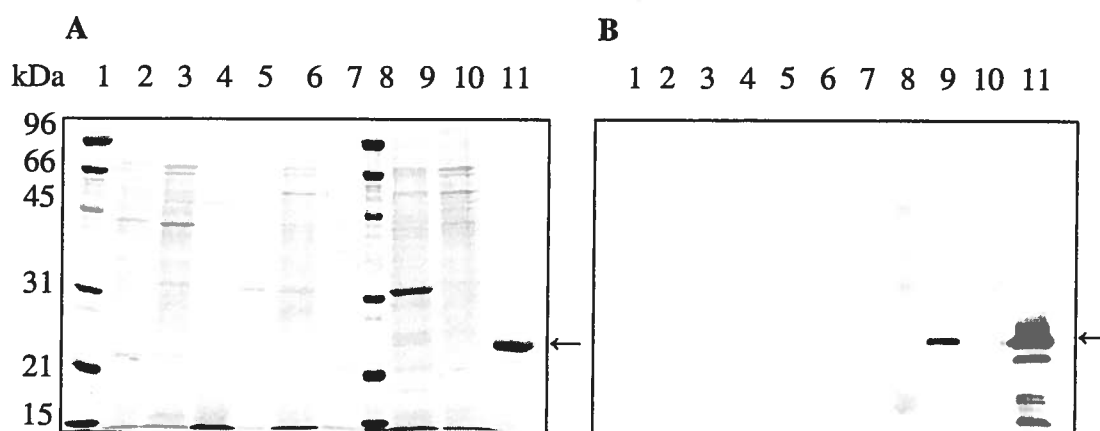


Figure 26. Analyse des différentes fractions protéiques de *S. lividans* cultivée en Erlenmeyer. Les échantillons contenaient environ 2 μ g de protéines pour le SDS-PAGE (A) et 0,2 μ g pour l'immunobuvardage de type Western (B). (1) Marqueur de poids moléculaires; (2) IAF45 intracellulaire soluble; (3) IAF45 intracellulaire insoluble; (4) IAF45 extracellulaire; (5) IAF45/pIAF550 intracellulaire soluble; (6) IAF45/pIAF550 intracellulaire insoluble; (7) IAF45/pIAF550 extracellulaire; (8) marqueur de poids moléculaires; (9) IAF45/pIAF935 intracellulaire soluble; (10) IAF45/pIAF935 intracellulaire insoluble; (11) IAF45/pIAF935 extracellulaire. La flèche indique l'AxeA_{tr}.

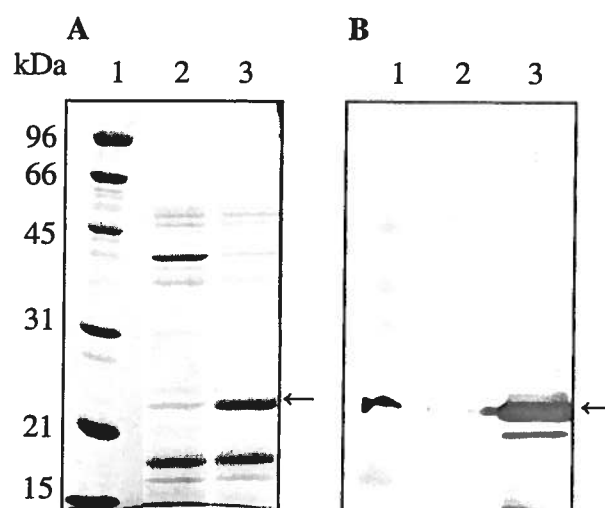


Figure 27. Analyse de la fraction extracellulaire de *S. lividans* cultivée en microplaque. Un volume de 15 μ L de surnageant de culture a été utilisé pour le SDS-PAGE (A) et 5 μ L pour l'immunobuvardage de type Western (B). (1) marqueur de poids moléculaires, (2) IAF45/pIAF550 et (3) IAF45/pIAF935. La flèche indique l'AxeA_{tr}.

3.3.2 Profil d'expression d'*axeA_{tr}* chez *E. coli*

Tout comme pour *S. lividans*, les fractions protéiques ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie et par immunobuvardage de type Western. L'*AxeA_{tr}* a pu être observée à environ 23 kDA dans chacune des fractions, pour les souches BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844 (figures 28 et 29). Dans les fractions intracellulaires insolubles, le précurseur de l'*AxeA_{tr}* a été observé à 28 kDa et 25 kDa. L'identité des bandes a été confirmée par immunobuvardage de type Western. Aucune différence d'expression n'a été notée entre les cultures en Erlenmeyer et en microplaque.

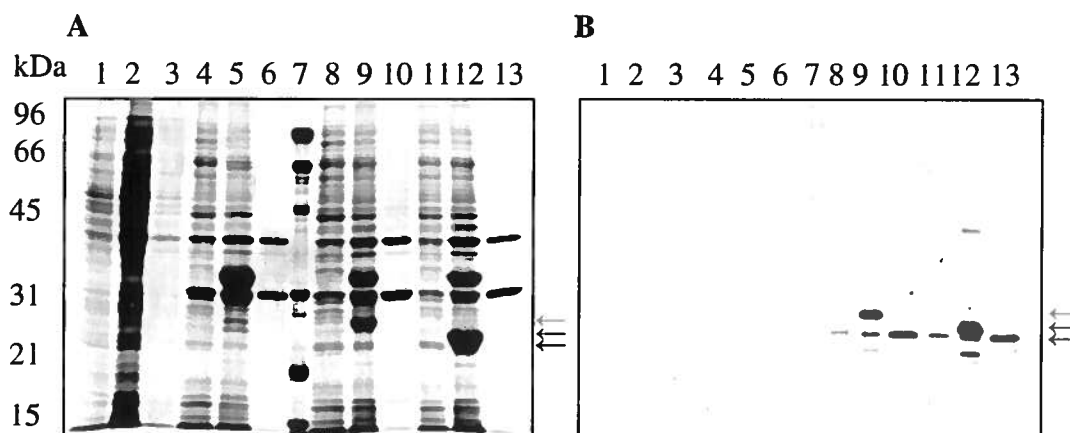


Figure 28. Analyse des différentes fractions protéiques de *E. coli* cultivée en Erlenmeyer. Les échantillons contenaient environ 5 μ g de protéines pour le SDS-PAGE (A) et 100 ng pour l'immunobuvardage de type Western (B). (1) BL21/pREP4 intracellulaire soluble; (2) BL21/pREP4 intracellulaire insoluble; (3) BL21/pREP4 extracellulaire; (4) BL21/pREP4/pIAF841B intracellulaire soluble; (5) BL21/pREP4/pIAF841B intracellulaire insoluble; (6) BL21/pREP4/pIAF841B extracellulaire; (7) marqueur de poids moléculaire; (8) BL21/pREP4/pIAF843 intracellulaire soluble; (9) BL21/pREP4/pIAF843 intracellulaire insoluble; (10) BL21/pREP4/pIAF843 extracellulaire; (11) BL21/pREP4/pIAF844 intracellulaire soluble; (12) BL21/pREP4/pIAF844 intracellulaire insoluble; (13) BL21/pREP4/pIAF844 extracellulaire. L'AxeA_r mature est indiquée par une flèche noire, le précurseur provenant du plasmide pIAF843 par une flèche rouge et le précurseur provenant du plasmide pIAF844 par une flèche bleu.

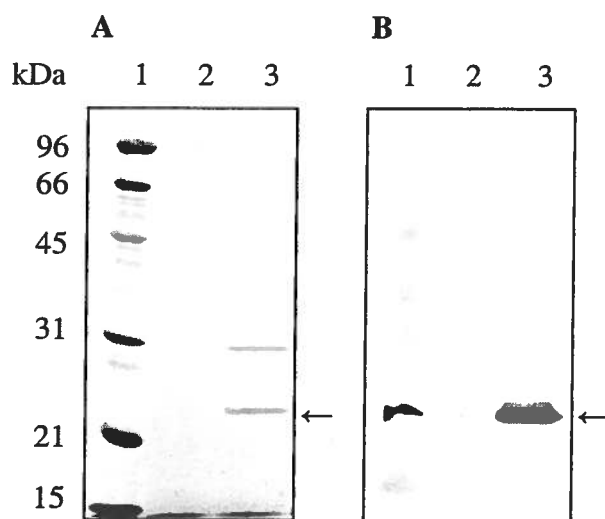


Figure 29. Analyse de la fraction extracellulaire de *E. coli* cultivée en microplaque. Un volume de 15 μ L de surnageant de culture a été utilisé pour le SDS-PAGE (A) et 5 μ L pour l'immunobuvardage de type Western (B). (1) marqueur de poids moléculaire, (2) BL21/pREP4/pIAF841 et (3) BL21/pREP4/pIAF844. L'AxeA_{tr} mature est indiquée par une flèche noire.

3.4 Détection de l'activité de déacétylation

3.4.1 Essais sur Pétri

Les essais de criblage sur Pétri ont été effectués avec les souches d'*E. coli* et de *S. lividans*, en utilisant trois substrats : la glycol chitine (acétylée à 80 %), le *p*-nitrophényl acétate (pNPA) et le 4-méthylumbelliféryl acétate (MUA). La glycol chitine a tout d'abord été utilisée pour visualiser l'activité de déacétylation chez *S. lividans* 10-164. Le substrat a été incorporé dans un milieu Stewart avec et sans chlorure de cobalt (CoCl₂). Suite à une incubation d'environ 64 heures à 34 °C, les géloses ont été colorées au Rouge Congo (figure 30). Quatre souches ont été comparées, soit 10-164/pIAFC109, 10-164/pIAF933, 10-164/pIAF934 et 10-164/pIA935. Sur le milieu sans CoCl₂, les quatre souches ont présenté des zones de couleur rouge foncé, indépendamment de la production d'AxeA. La grandeur des zones semblait variée en fonction de la croissance des colonies. Pour le milieu avec CoCl₂, des résultats semblables ont été obtenus, mais avec des zones plus petites pour les souches 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935. Ainsi, les milieux Stewart contenant de la glycol chitine, colorés au Rouge Congo, n'ont pas permis de distinguer les souches productrices d'AxeA des souches non-productrices.

Le pNPA et le MUA ont été pulvérisés sur le milieu de culture après croissance des bactéries. Lorsque déacétylés, le pNPA devient jaune et le MUA fluoresce sous les UV. Aucune coloration jaune n'a pu être détectée avec le pNPA, pour *E. coli* et *S. lividans*. Avec le MUA, une fluorescence a été observée pour l'ensemble des souches testées. La souche d'*E. coli* BL21/pREP4 a présenté une fluorescence comparable celle de la souche BL21/pREP4/pIAF843 qui sur-exprimait l'AxeA_{tr} (figure 31). Chez *S. lividans*, des différences au niveau de la grandeur de la zone fluorescente ont pu être observées (figure 32). Encore une fois, les zones variaient en grandeur selon la croissance des colonies. La souche IAF45, n'exprimant pas l'AxeA, comportait des zones comparables à celles des

souches 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935. La présence de CoCl_2 n'a pas semblé avoir de l'influence sur l'intensité de la fluorescence ou la grandeur des zones.

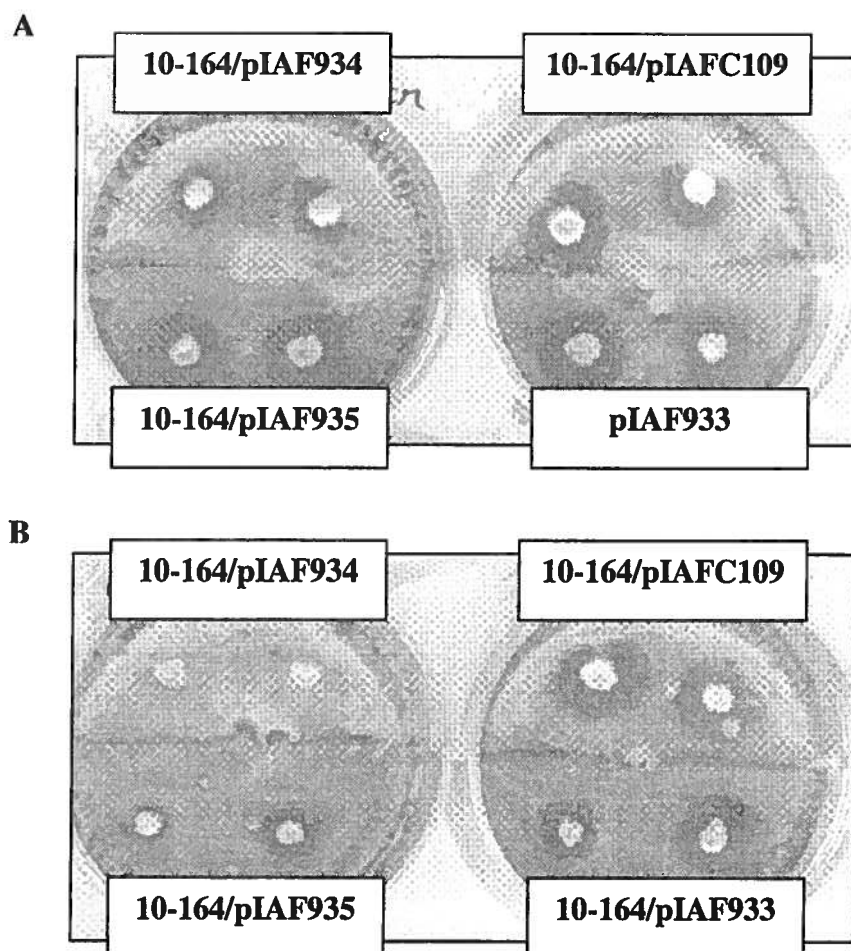


Figure 30. Essais sur milieu Stewart/glycol chitine effectués avec les souches de *S. lividans* 10-164/pIAFC109, 10-164/pIAF933, 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935; en présence (A) et en absence (B) de CoCl_2 .

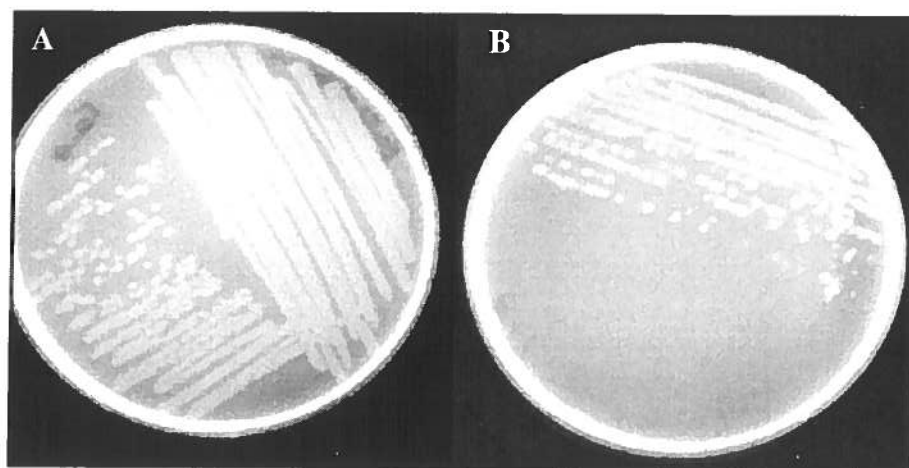


Figure 31. Essais effectués sur milieu 2xTY agar avec les souches d'*E. coli* BL21/pREP4 (A) et BL21/pREP4/pIAF843 (B). Une solution de pNPA a été pulvérisée sur le Pétri après croissance bactérienne.

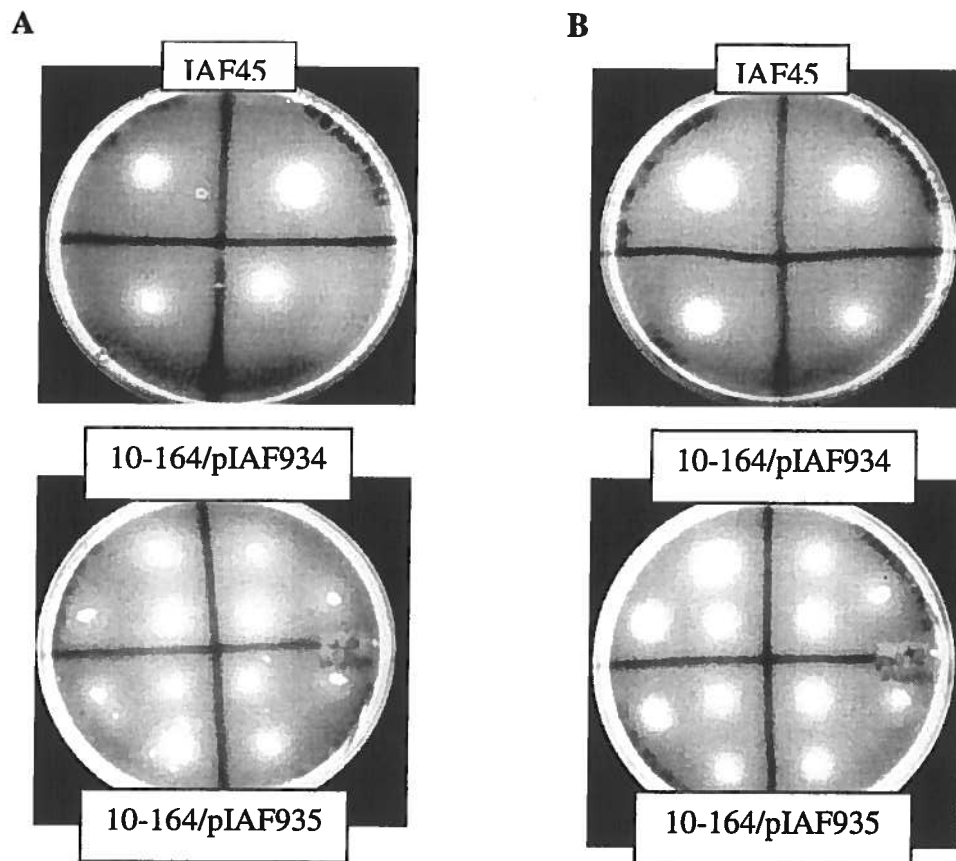


Figure 32. Essais sur milieu Stewart effectués avec les souches de *S. lividans* IAF45, 10-164/pIAF934 et 10-164/pIAF935. Une solution de MUA a été pulvérisée sur les plaques de Pétri après croissance bactérienne. Milieux avec (A) et sans CoCl_2 (B).

3.4.2 Criblage en solution avec le pNPA

Des essais enzymatiques ont été effectués avec les fractions protéiques, intracellulaire soluble, intracellulaire insoluble et extracellulaire, provenant des souches d'*E. coli* BL21/pREP4, BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844. Les essais, effectués en duplicata, ont été conduits à 55 °C, l'absorbance (405 nm) a été prise au temps zéro et après 30 minutes d'incubation. Une augmentation de l'absorbance a été observée pour les trois souches et pour les trois fractions (figure 33). Malgré le fait que la souche BL21/pREP4 ne produise pas d'AxeA_{tr}, des résultats comparables aux souches BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844 ont été obtenus.

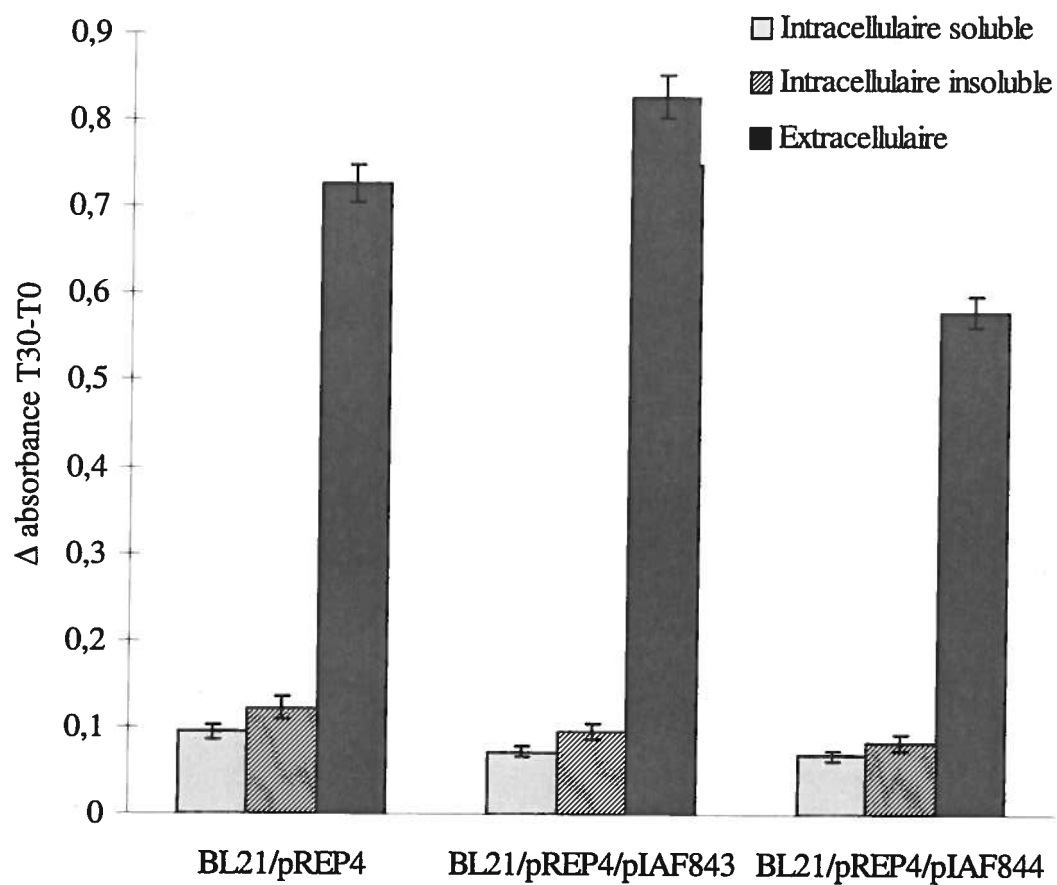


Figure 33. Augmentation d'absorbance lors d'essais enzymatiques utilisant le pNPA comme substrat, pour les différentes fractions cellulaires d'*E. coli* BL21/pREP4, BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844.

3.4.3 Essais enzymatiques avec des oligomères de chitine

En premier lieu, des essais ont été effectués avec l'AxeA_{tr} pure, afin de connaître le niveau d'activité de l'enzyme envers des oligomères de chitosan. Deux oligomères ont été testés, soit un de degré de polymérisation moyen (DPM) égal à 6,4 et un de 7,4. Les deux oligomères possédaient un degré d'acétylation de 20 %. Les essais enzymatiques ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5 en présence de CoCl₂ 5 mM. Le mélange réactionnel a été incubé durant 24 heures à 50 °C. Ensuite, la quantité d'acide acétique libéré par la réaction enzymatique a été mesurée à l'aide de la trousse K-ACET de Megazyme. Les essais ont été effectués en triplicata et les réactions de quantification en duplicata. Des résultats semblables ont été obtenus pour les deux substrats (tableau 10).

Afin de vérifier que ce type d'essai était applicable au criblage, des tests ont été effectués avec les fractions protéiques extracellulaires des souches d'*E. coli* BL21/pREP4/pIAF841B et BL21/pREP4/pIAF844. Le mélange réactionnel contenait la fraction protéique, du tampon Tris-HCl, du CoCl₂, et les oligomères de chitosan DPM 7,4. Comme avec l'enzyme pure, les échantillons ont été incubés durant 24 heures à 50 °C. La quantité d'acide acétique a été mesurée comme précédemment. L'acide acétique produit durant la croissance bactérienne a été soustrait à l'acide acétique total, pour ne considérer que l'acide acétique issu de la réaction de déacétylation. De plus, l'acide acétique ne résultant pas de l'action de l'AxeA_{tr} a été soustrait grâce à la souche témoin BL21/pREP4/pIAF841B qui ne produit pas d'AxeA_{tr}. De cette façon, lors de deux expériences différentes, la présence de 0,772 mM et 1,14 mM d'acide acétique a été attribuée à la déacétylation d'oligomères de chitosan par l'AxeA_{tr} contenue dans la fraction extracellulaire de BL21/pREP4/pIAF844.

Tableau 10. Quantité d'acide acétique libérée par l'AxeA_{tr} (10 µg/ml) lors d'essais enzymatiques utilisant comme substrats les oligomères de chitosan DPM 6,4 et DPM 7,4.

Oligomères	Acide acétique (mM)
DPM 6,4	1,593 ± 0,129
DPM 7,4	1,630 ± 0,124

3.5 Stratégie de criblage

Suite à différents essais, une stratégie de criblage a été mise au point (figure 34). La librairie a été clonée dans *E. coli* BL21/pREP4 et les transformants ont été sélectionnés sur Pétri, à l'aide d'ampicilline. Pour l'expression protéique, les clones obtenus ont été repiqués en milieu liquide, dans une microplaque de 96 puits. Les surnageants de cultures ont ensuite été recueillis par centrifugation, pour être analysés dans une étape de pré-criblage. Finalement, les surnageants contenant l'AxeA_{tr} ont été testés pour leur capacité à déacétyler des oligomères de chitosan.

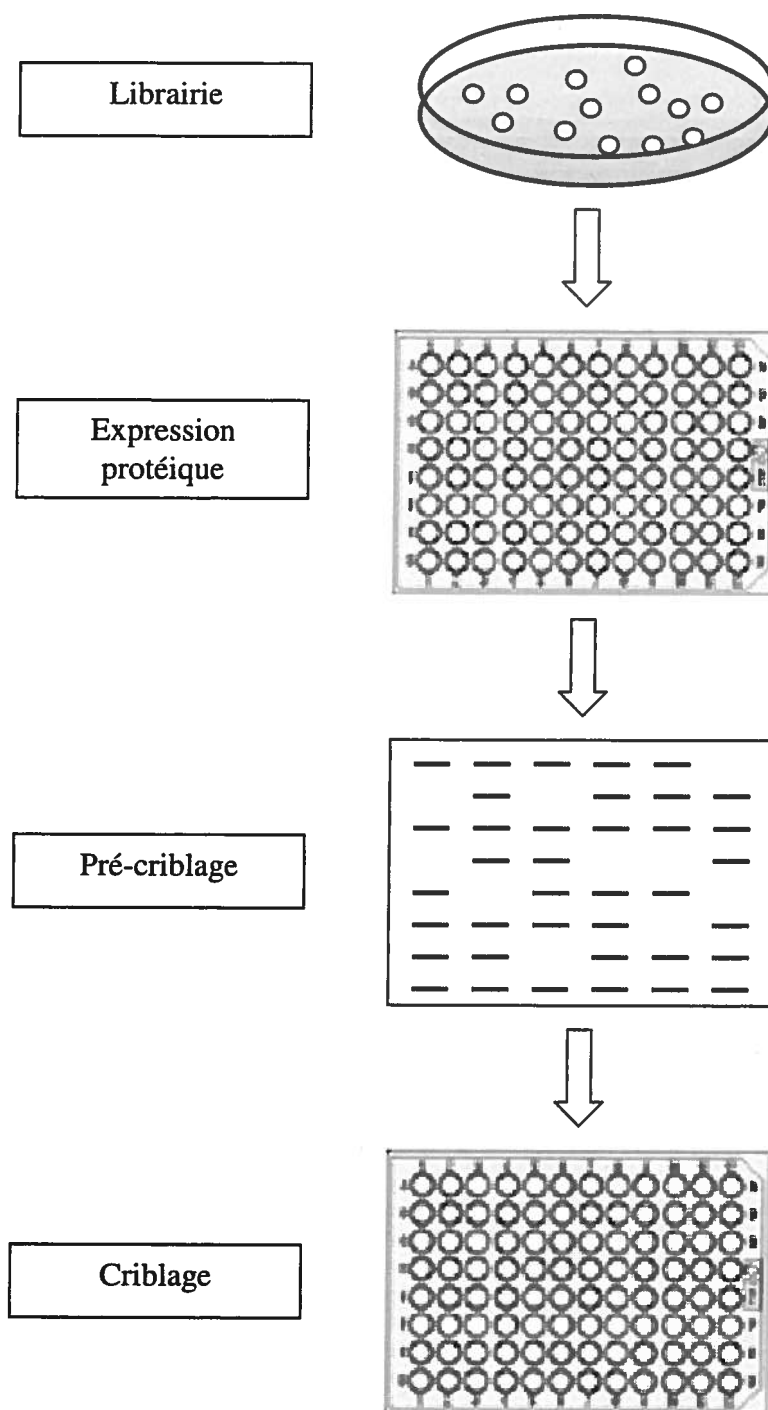


Figure 34. Stratégie de criblage.

3.5.1 Pré-criblage

L'étape de pré-criblage avait comme fonction de réduire le nombre de clones à cribler en permettant de sélectionner les surnageants contenant l'AxeA_{tr}. Le surnageant des différents clones a été analysé par immunobuvardage de type Western, grâce à l'appareil Slot blot de Biorad. Cet appareil a permis de déposer directement des surnageants de culture sur une membrane de nitrocellulose. De cette façon, les surnageants de 89 clones provenant de la librairie SYT-V ont été analysés. Cette méthode a permis de visualiser la présence ou l'absence d'AxeA_{tr} dans les surnageants de cultures (figure 35). Il a été possible de distinguer des bandes de différentes intensités. Des témoins positifs (BL21/pREP4/pIAF844) et négatifs (BL21/pREP4/pIAF841) ont aussi été analysés. L'AxeA_{tr} a été détectée chez environ 75 % des clones.

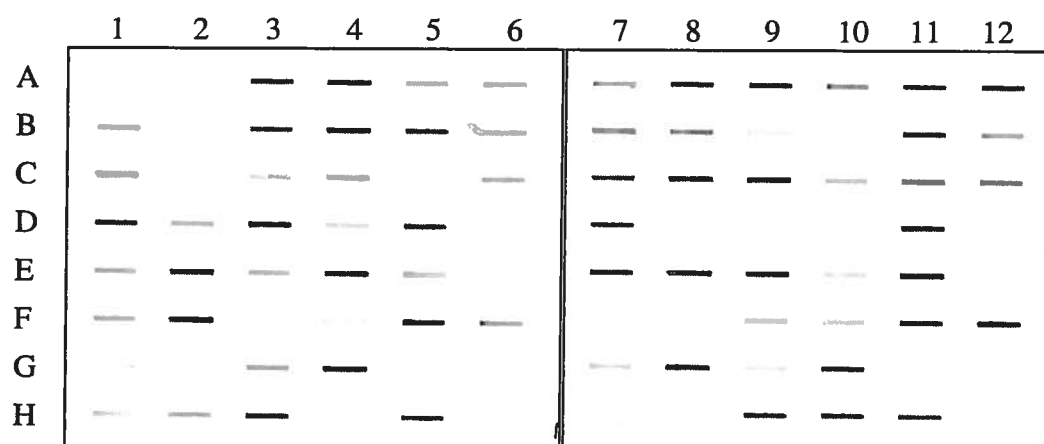


Figure 35. Analyse des surnageants de culture de clones de la librairie SYT-V par immunobuvardage. (A1 et H12) milieu de culture, (B1 et C1) BL21/pREP4/pIAF844, (A2-C2) BL21/pREP4/pIAF841B et (autres puits) clones SYT-V.

3.5.2 Criblage de l'activité enzymatique de l'AxeA_{tr}

Les surnageants contenant l'AxeA_{tr} ont été analysés dans l'étape de criblage. Cette étape consistait en un essai enzymatique effectué en microplaque 96 puits, avec des oligomères de chitosan (20 % acétylés) de DPM 7,4. Ainsi, après 24 heures d'incubation, la quantité d'acide acétique libérée par la réaction de déacétylation a été mesurée à l'aide de la trousse K-ACET (Megazyme). Le dosage de l'acide acétique a aussi été effectué en microplaques à 96 puits. Les lectures d'absorbance ont tous été faites grâce à un spectrophotomètre à microplaques. Pour chaque échantillon, un témoin a été préparé afin de soustraire l'acide acétique produit durant la croissance bactérienne. Ces témoins ont été préparés comme les échantillons, mais ne contenaient pas de substrats. Dû au grand nombre d'échantillons à traiter, aucun duplicata n'a été effectué. Ainsi, 32 clones provenant de la librairie SYT-V ont été analysés et comparés à BL21/pREP4/pIAF844 (figure 36). Environ 80 % des clones testés étaient actifs envers les oligomères de chitosan. Les quantités d'acide acétique libéré variaient grandement parmi les clones.

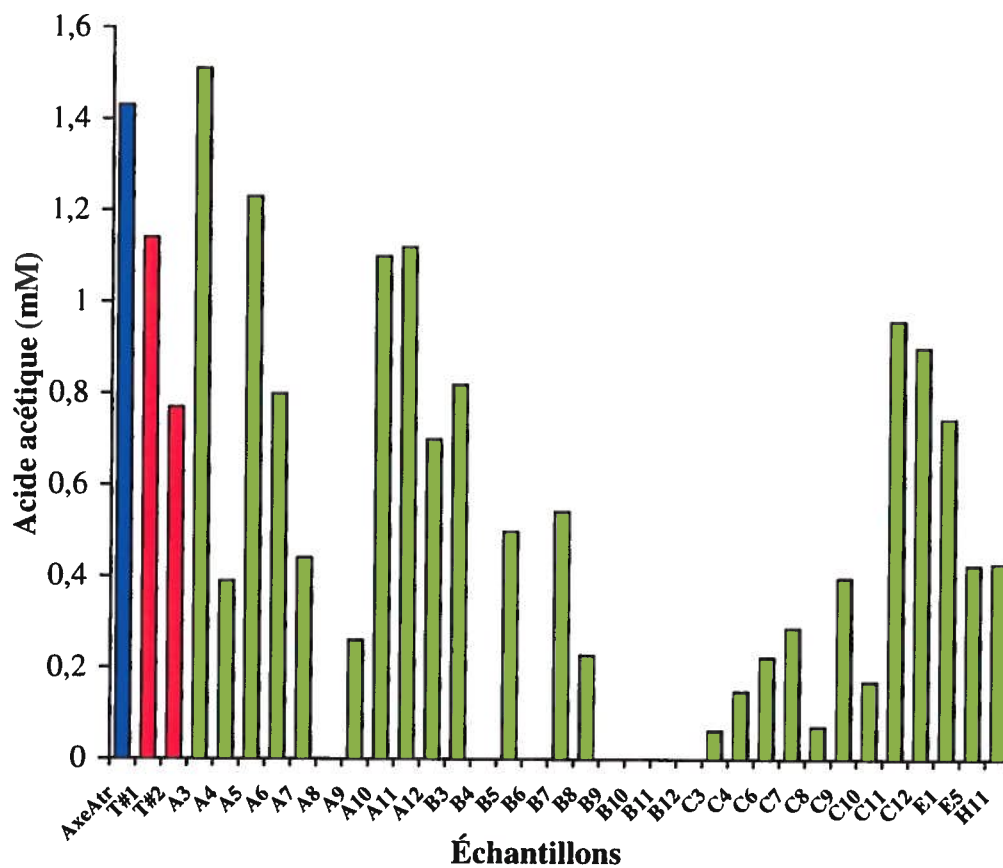


Figure 36. Quantité d'acide acétique libéré par les différentes réactions de déacétylation; (AxeA_{tr}) enzyme pure en bleu (10µg/ml), (T#1 et T#2) surnageant de culture de BL21/pREP4/pIAF844 en rouge, (A3-H11) surnageant des clones en vert.

3.6 Dosage de l'acide acétique par HPLC

Pour trouver une alternative à la trousse K-ACET (Megazyme), des essais ont été effectués pour doser l'acide acétique par HPLC. Cette méthode a déjà été utilisée par Dupont *et al.* (1996) pour la caractérisation de l'AxeA. Comme décrit précédemment, les surnageants de culture des souches d'*E. coli* BL21/pREP4/pIAF841B et BL21/pREP4/pIAF844 ont été utilisés dans un essai enzymatique avec des oligomères de chitosan. Des témoins, dans lesquels il n'y avait pas de substrat, ont été effectués simultanément. Après incubation, le mélange réactionnel a été précipité à l'aide d'acétonitrile pour nettoyer l'échantillon, puis injecté sur la colonne. Plusieurs pics ont été observés entre 6 et 20 minutes de rétention, pour les deux échantillons (figure 37). L'acide acétique apparaissait après un temps de rétention d'environ 16 minutes. Un pic d'acide acétique de plus forte intensité a été détecté pour l'essai enzymatique avec le surnageant de BL21/pREP4/pIAF844. Cependant, la quantification de l'acide acétique était difficile, car le chromatogramme n'offrait pas une bonne résolution. En effet, le pic de l'acide acétique était chevauché par deux autres pics. La quantité d'acide acétique libérée par la réaction enzymatique ne pouvait donc être mesurée précisément.

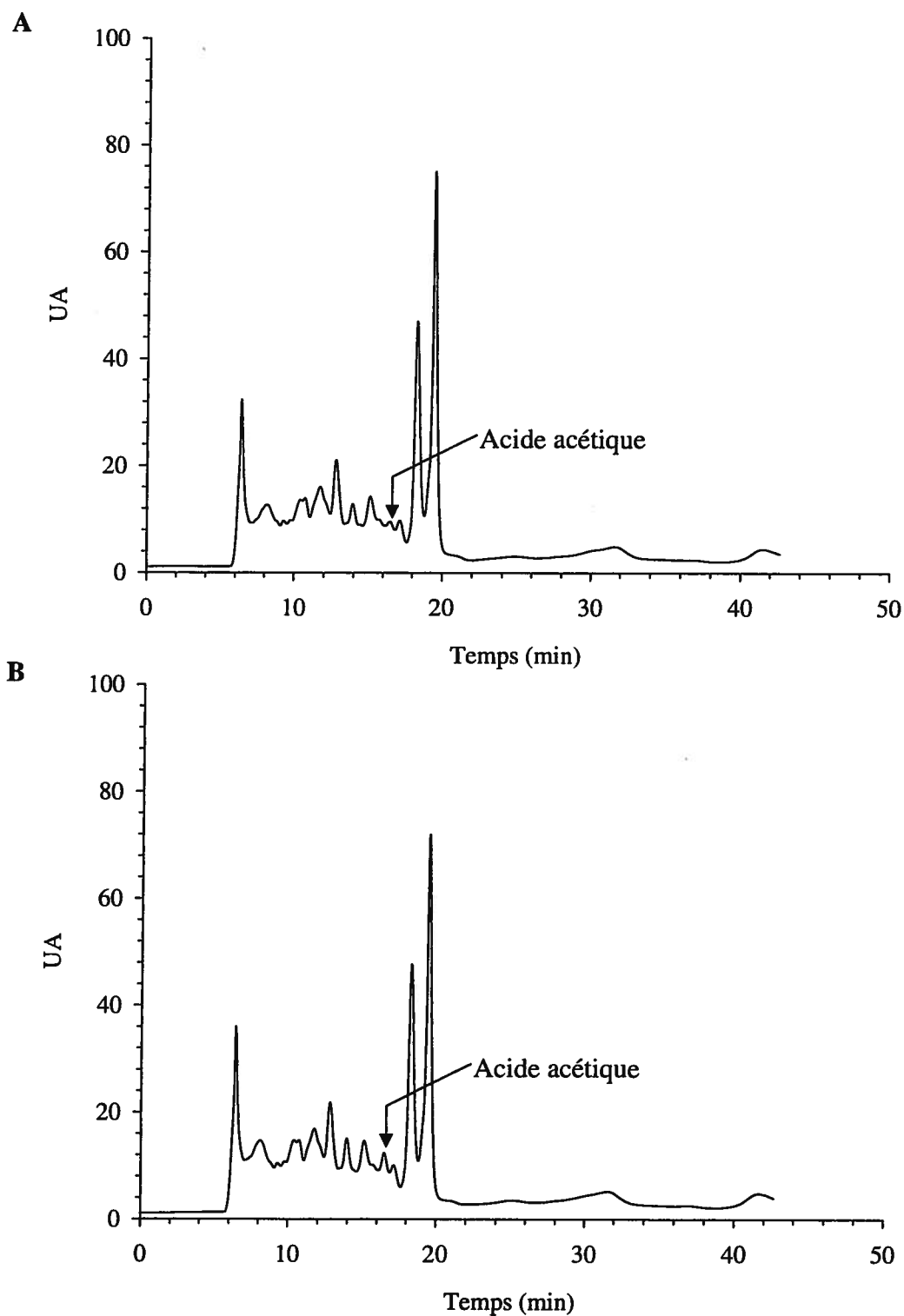


Figure 37. Chromatogrammes obtenus pour les essais enzymatiques effectués avec le surnageants de culture des souches BL21/pREP4/pIAF841 (A) et BL21/pREP4/pIAF844 (B).

4. DISCUSSION

4.1 Dislocation du gène *axeA*

Dans le but d'adapter une souche de *S. lividans* à la production de l'AxeA_{tr} et ses formes mutées, le gène chromosomique codant pour l'AxeA a été délété. Pour ce faire, la méthode de dislocation génétique dirigée par PCR, mise au point par Gust *et al.* (2003), a été utilisée. Cette dernière méthode est beaucoup plus efficace que celles utilisées auparavant chez les *Streptomyces* (Kieser *et al.*, 2000). Elle permet la délétion complète d'un gène par une double recombinaison homologue entre une cassette de dislocation et l'ADN chromosomique, et ce, sans créer d'effet polaire. La dislocation génétique dirigée par PCR permet donc d'obtenir une souche mutante stable. Cette méthode a été utilisée avec succès dans de nombreuses autres études (Li *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Aigle *et al.*, 2005; Derouaux *et al.*, 2004; Brekasis et Paget, 2003). La délétion du gène *axeA* a été confirmée en séquençant la région chromosomique comprise entre les régions de recombinaison. La séquence obtenue montrait la présence de la cassette de dislocation, située entre les codons de départ et d'arrêt du gène *axeA*. La souche *S. lividans* IAF45 a ainsi été obtenue.

En utilisant la souche IAF45 pour la production de l'AxeA_{tr}, il est possible d'obtenir une fraction protéique extracellulaire sans traces de l'AxeA native. Ainsi, le processus de purification est simplifié et les tests d'activité ne sont pas faussés. Il est toutefois possible que d'autres enzymes ayant une activité comparable à l'AxeA soient présentes dans le milieu extracellulaire. En effet, *Streptomyces coelicolor* (un très proche parent de *S. lividans*) possède, en plus de l'AxeA, dix protéines présomptives classées dans la famille 4 des carbohydrates estérases (CE4) (Coutinho et Henrissat, 2002; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>)

4.2 Construction des bibliothèques

La construction de bibliothèques d'*axeA*_{tr} mutées s'inscrivait dans le cadre d'une étude d'évolution dirigée visant à accroître l'activité de déacétylation de l'enzyme envers des oligomères de chitosan. Les bibliothèques ont été obtenues en

mutant à saturation des régions précises du gène. Par cette méthode, des bibliothèques comportant l'ensemble des mutations possibles à une position donnée d'un gène peuvent être créées. La mutagenèse par saturation de site permet d'introduire des acides aminés nécessitant la substitution de plusieurs bases à l'intérieur d'un même codon, impossible à obtenir par les méthodes de mutagenèse aléatoire, comme le *error-prone* PCR (epPCR). En effet, cette dernière méthode ne permet généralement d'introduire que 2 à 3 mutations par gène, ce qui limite les possibilités de substitutions à environ 6 acides aminés (Patrick *et al.*, 2003; Miyazaki et Arnold, 1999). La mutagenèse par saturation de site permet d'explorer de façon approfondie la séquence d'un gène (Zheng *et al.*, 2004).

4.2.1 Choix des sites de mutations

Au moment où les bibliothèques ont été construites, les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le substrat et dans l'activité catalytique n'étaient pas connus. Le choix des sites de mutations a donc été effectué de façon semi-rationnelle, basé sur un alignement de séquences protéiques. L'alignement comprenait les séquences de la peptidoglycan déacétylase de *Bacillus subtilis*, de la chitine déacétylase de *Colletotrichum lindemuthianum*, de la chitine déacétylase 2 de *Saccharomyces cerevisiae* et de la chitine déacétylase de *Mucor rouxii*, tous membres de la famille des CE4 (Coutinho et Henrissat, 2002; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Selon une approche conservative, les sites de mutations ne devaient pas contenir d'acides aminés hautement conservés parmi la famille des CE4, pouvant potentiellement être essentiels à l'activité catalytique ou au bon repliement de l'enzyme. Ainsi, deux sites ont été sélectionnés, soit les sites Ser16-Gly17-Ser18 (SGS) et Ser63-Tyr64-Thr65 (SYT).

Dans une étude portant sur la PdaA de *Bacillus subtilis*, il a été démontré que les acides aminés interagissant avec le GlcNAc étaient hautement conservés parmi les membres de la famille des CE4 (Blair et van Aalten, 2004). Il a aussi été démontré par Blair *et al.* (2005) que la PdgA de *Streptococcus pneumoniae*

était une métalloenzyme liquant l'ion métallique grâce à une triade His-His-Asp. Cette triade est à proximité d'une histidine et d'un acide aspartique identifiés respectivement comme acide et base catalytiques. Parce que tous ces résidus sont conservés parmi les CE4, les données recueillies pour la PdgA pourraient aussi s'appliquer à l'AxeA. Le site SGS se situe immédiatement après deux acides aspartiques (Asp12 et Asp13), identifiés respectivement comme base catalytique et ligand de l'ion métallique (Blair *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006). Pour sa part, le site SYT est compris entre deux histidines (His62 et His66) faisant partie de la triade qui interagit avec l'ion métallique (Taylor *et al.*, 2006).

Selon des études d'ingénierie protéique rationnelle, les substitutions d'acides aminés à proximité du site de fixation au substrat seraient propices à modifier les propriétés d'une enzyme, telles la spécificité, l'activité et la thermostabilité (Cedrone *et al.*, 2000; el Hawrani *et al.*, 1994; Morley et Kazlauskas, 2005). Des études d'évolution dirigée ont aussi montré que des mutations éloignées du site actif pouvaient modifier efficacement la spécificité d'une enzyme (Zhang *et al.*, 1997; Yano *et al.*, 1998; Reetz, 2004). Pour accroître l'activité catalytique, il semblerait que les mutations distantes sont aussi efficaces que celles à proximité du site actif. Pour ce qui est de la spécificité envers le substrat, les mutations près du site actif seraient plus efficaces que celles éloignées (Morley et Kazlauskas, 2005). Par leur position respective, les deux sites de mutations sélectionnés pourraient donc modifier l'activité catalytique et la spécificité de l'AxeA_{tr}.

4.2.2 Méthode de mutagenèse

Les mutations ont été introduites à l'aide d'amorces comportant des séquences dégénérées VNN et NNY (N=A/T/G/C, V=A/G/C et Y=T/C). Les amorces VNN et NNY permettaient respectivement l'introduction de 48 et 32 codons différents à une position donnée. Ceci se traduisait par une possibilité de 16 acides aminés pour les amorces VNN et 15 pour les amorces NNY. En limitant l'introduction de thymine à la position un du codon (amorces VNN), ainsi

que l'introduction d'adénine et de guanine à la position trois (amorces NNY), aucun codon d'arrêt ne pouvait être introduit.

Des séquences NNN, NNB ou NNK (B=G/T/C et K=G/T) auraient aussi pu être utilisées. La séquence NNN permet l'introduction des 64 codons, incluant les trois codons d'arrêt. Avec une séquence NNB, 48 codons et 20 acides aminés peuvent être insérés. Une séquence NNK permet aussi d'introduire les 20 acides aminés, mais avec une possibilité de 32 codons. Pour ces deux dernières séquences, un codon d'arrêt peut être introduit. La séquence NNK est la plus couramment utilisée dans les expériences de mutagenèses (Miyazaki et Arnold, 1999; Horsman *et al.*, 2003; Kretz *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Parikh et Matsumura, 2005). Ceci peut s'expliquer par le fait que cette séquence permet d'obtenir le meilleur compromis entre le nombre de codons, le nombre d'acides aminés et le nombre de codons d'arrêt.

Pour l'obtention des différentes bibliothèques, l'élongation par chevauchement a été utilisée. Cette technique de PCR nécessitait l'utilisation de deux amorces externes, ainsi que deux amorces internes complémentaires portant les séquences dégénérées. L'introduction des mutations s'effectuait à l'aide de deux réactions d'amplifications par PCR. Une multitude d'autres méthodes permettent d'introduire des mutations à l'aide d'amorces dégénérées (Neylon, 2004). Parmi les différentes méthodes, la mutagenèse par amplification plasmidique semble être la plus simple et la plus rapide. La méthode de base consiste à amplifier un vecteur double brin comprenant l'insert d'intérêt, à l'aide de deux amorces complémentaires portant les mutations. Le vecteur matrice non muté est ensuite éliminé par digestion avec l'endonucléase *DpnI*. Les vecteurs contenant les mutations peuvent alors être introduits directement dans la souche d'expression (Kretz *et al.*, 2004). La mutagenèse par amplification plasmidique est commercialisée sous le nom de QuickChange System par Stratagene et est vendue sous forme de trousse.

En comparant les différentes approches décrites dans la littérature, la plus efficace semble être la méthode de mutagenèse par amplification plasmidique combinée à l'utilisation d'amorces de types NNK. Malgré ce fait, l'approche préconisée dans la présente étude a tout de même permis d'obtenir quatre librairies.

4.2.3 Caractéristiques des librairies

Les librairies SGS-V et SYT-V ont été obtenues avec les amorces dégénérées de type VNN. Trois codons ont été mutés simultanément, ce qui pouvait potentiellement créer 110592 séquences nucléotidiques différentes et 4096 combinaisons de trois acides aminés. La probabilité d'introduction de chaque acide aminé était variable, allant de 1/48 à 6/48. Quatre acides aminés n'étaient pas représentés parmi les 48 codons, soit la phénylalanine, la tyrosine, la cystéine et le tryptophane. Ces deux librairies étaient biaisées au niveau de la variation des acides aminés, car ils n'avaient pas tous la même probabilité d'être introduits.

Les librairies SGS-Y et SYT-Y découlaient des amorces NNY. Le nombre de possibilités de séquences était inférieur aux librairies SGS-V et SYT-V, soit de 32768. Parmi les 32 codons pouvant être introduits à chacune des trois positions, le tryptophane, la glutamine, la méthionine, la lysine et l'acide glutamique n'étaient pas représentés. Ainsi, 3375 combinaisons d'acides aminés pouvaient être générées. Les probabilités d'introduction des différents acides aminés étaient de 2/32, à l'exception de la sérine pour qui elle était de 4/32. Les librairies SGS-Y et SYT-Y n'ont donc qu'un léger biais au niveau de la variation des acides aminés.

En comparant les différentes librairies, il apparaît que celles obtenues avec les amorces NNY possèdent les meilleures caractéristiques. Bien que les librairies SGS-Y et SYT-Y ne permettent d'introduire que 15 acides aminés, leurs probabilités d'introduction sont pratiquement toutes équivalentes. De plus, elles

permettent d'obtenir un moins grand nombre de séquences nucléotidiques, ce qui réduit la quantité de clones à analyser. Seules les librairies SGS-Y et SYT-Y devraient donc être criblées.

4.3 Expression protéique

4.3.1 *Streptomyces lividans*

Les *Streptomyces* ont été utilisées dans de nombreuses études pour la production de différentes protéines homologues et hétérologues (Binnie *et al.*, 1997; Isiegas *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2002; Eustaquio *et al.*, 2005). La quantité de protéines sécrétées peut varier de quelques μg à plusieurs g/L , dépendamment de la nature de la protéine, de la force du promoteur et de la méthode de culture (Morosoli *et al.*, 1997). Les plus grandes quantités de protéines sécrétées ayant été rapportées sont de 3 g/L pour la xylanase A homologue, et de 300 mg/L pour le récepteur CD4 de cellules T humaines et le facteur tumoral nécrotique α murin (Bertrand *et al.*, 1989; Fornwald *et al.*, 1993; Lammertyn *et al.*, 1997).

Dans la présente étude, 596 mg/L et 264 mg/L de protéines ont été sécrétés respectivement par *S. lividans* 10-164/pIAF935 et IAF45/pIAF935, lorsque cultivées en fiole Erlenmeyer. L'analyse des fractions protéiques extracellulaires par SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie) n'a permis d'observer qu'une seule bande, correspondant à l'AxeA_{tr}. La concentration de l'enzyme dans le milieu extracellulaire se rapproche donc des concentrations de protéines totales mesurées. Ce niveau élevé de pureté a été observé dans d'autres études, aussi bien pour des protéines homologues qu'hétérologues (Bertrand *et al.*, 1989; Ogino *et al.*, 2004).

L'analyse des différentes fractions protéiques par immunobuvardage a permis d'observer la forme mature de l'AxeA_{tr} dans les fractions intracellulaires solubles et extracellulaires. En théorie, seul le précurseur de l'enzyme aurait pu être présent dans la fraction intracellulaire soluble. En effet, dans le processus de

sécrétion, le peptide signal n'est clivé que lors de la translocation (Morosoli *et al.*, 1997). Ainsi, la forme mature ne peut être présente dans le milieu intracellulaire. Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par la méthode de lyse utilisée lors de la préparation des fractions protéiques. Le mycélium a été lavé, puis lysé, ce qui a permis aux protéines sécrétées encore présentes dans la paroi d'être incluses dans la fraction intracellulaire. Par un prétraitement au lysozyme, il aurait été possible de digérer la paroi et de libérer ainsi ces protéines. Aucune forme mature de l'enzyme n'aurait alors été détectée dans la fraction intracellulaire soluble.

Les anticorps anti-AxeA ont aussi révélé des bandes de poids inférieures à l'AxeA_r dans la fraction extracellulaire, suggérant la présence de protéolyse. Toutefois, ces bandes n'étaient présentes qu'en faible quantité, n'ayant pas été détectées sur gel coloré au bleu de Coomassie. L'activité protéolytique extracellulaire de *S. lividans*, bien que considérée comme faible, augmente durant la phase de croissance stationnaire (Binnie *et al.*, 1997; Isiegas *et al.*, 1999). La protéolyse aurait pu être réduite en ajoutant des inhibiteurs de protéases dans le milieu de culture. Les acides Casamino sont aussi reconnus pour inhiber efficacement les protéases (Fornwald *et al.*, 1993; Brawner, 1994). La dégradation de l'AxeA_r aurait aussi pu être évitée en récoltant les protéines avant la phase de croissance stationnaire. Par contre, une moins grande quantité d'enzymes aurait alors été récoltée.

Les cultures en microplaques à 96 puits ont permis d'obtenir des résultats comparables à ceux des cultures en fioles Erlenmeyer. Toutefois, la quantité de protéines sécrétées était légèrement inférieure et le milieu extracellulaire contenait une plus grande variété de protéines. Ces résultats peuvent s'expliquer par des différences au niveau des conditions de culture.

Premièrement, il est possible que l'oxygénation du milieu ait été moins efficace en microplaques, considérant que le ratio surface/volume du milieu était d'environ 1/3, comparativement à 1/1 en fioles Erlenmeyer. Les *Streptomyces* étant hautement aérobiques, leur croissance est grandement influencée par la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu (Shioya *et al.*, 1999; Kieser *et*

al.,2000). Ainsi, il est probable que la croissance bactérienne en microplaques ait été limitée par un manque d'oxygène, menant à une production de protéines réduite. La forme des puits, le rayon de giration et la vitesse d'agitation sont aussi des facteurs qui ont pu influencer la productivité.

De plus, le processus d'expression en microplaques différait légèrement de celui en fioles Erlenmeyer. En microplaques, le milieu M14-xylose était ensemencé directement avec 8 % (v/v) de pré-culture, plutôt qu'avec du mycélium. De cette façon, des composés provenant de la pré-culture, comme des déchets, ont pu affecter la croissance bactérienne et l'expression protéique.

4.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'un des hôtes les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes (Choi et Lee, 2004). La grande popularité d'*E. coli* s'explique par sa croissance rapide sur des milieux non coûteux, par sa génétique bien caractérisée et par le grand nombre de systèmes d'expression disponibles (Baneyx, 1999). Dans la présente étude, la souche BL21 a été utilisée pour l'expression du gène *axeA_{tr}*. Cette souche est spécialement adaptée pour la production de protéines recombinantes, par son activité protéolytique réduite. En effet, elle possède une délétion au niveau du gène *ompT*, qui code pour une protéase membranaire externe reconnue pour dégrader les protéines hétérologues (McCarter *et al.*, 2004). La protéase cytoplasmique Lon est aussi absente de la souche BL21, du fait qu'elle découle d'*E. coli* B.

Pour la production de l'AxeA_{tr}, deux vecteurs d'expression ont été évalués, soit pIAF843 et pIAF844. Ces deux vecteurs sont identiques, à l'exception des séquences codant pour le peptide signal (PS). Le plasmide pIAF843 contient la séquence complète du gène *axeA_{tr}*, incluant celle du PS natif. Dans le plasmide pIAF844, la séquence du PS d'*axeA* a été remplacée par celle du PS de *ompA*. OmpA est une protéine membranaire externe présente naturellement chez *E. coli* (Chai et Foulds, 1977). La séquence du PS d'*ompA* a

souvent été utilisée pour diriger les protéines recombinantes vers le périplasme (Hytonen *et al.*, 2004; Manosroi *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 1995).

Les deux vecteurs utilisés ont permis la production de l'AxeA_{tr}. L'analyse des différentes fractions protéiques par immunobuvardage de type Western, a révélé la présence de l'AxeA_{tr} dans chacune d'elles. Normalement, *E. coli* n'excrète par de protéines dans le milieu extracellulaire, dû à la présence de la membrane externe qui est généralement imperméable aux protéines (Rinas et Hoffmann, 2004). La présence d'AxeA_{tr} dans le milieu de culture pourrait donc s'expliquer par la lyse des cellules. Cependant, parce que seule la forme mature de l'enzyme était présente, il est plus probable que les résultats obtenus soient dus à une fuite du périplasme. En effet, lorsqu'une protéine sécrétée est surproduite, des études ont démontré qu'il pouvait y avoir libération des protéines périplasmiques dans le milieu extracellulaire (Georgiou *et al.*, 1988; Tokuyasu *et al.*, 1999). La forme mature de l'AxeA_{tr} était aussi présente dans la fraction intracellulaire soluble, ce qui indique qu'une certaine portion de l'enzyme demeure dans le périplasme. En accentuant la perméabilité du périplasme, une plus grande quantité d'enzyme aurait pu être excrétée dans le milieu. Pour ce faire, il existe différentes méthodes mécaniques, chimiques et enzymatiques (Shokri *et al.*, 2003). La production de l'AxeA_{tr} dans le milieu de culture simplifie le criblage et limite la présence de protéines homologues (Jonasson *et al.*, 2002).

Dans la fraction intracellulaire insoluble, le précurseur et la forme mature de l'AxeA_{tr} étaient présents. Ce qui indique que l'AxeA_{tr} formait vraisemblablement des corps d'inclusions dans le cytoplasme et le périplasme. La surproduction de protéines hétérologues chez *E. coli* mène souvent à la formation de corps d'inclusion (Baneyx, 1999). Les principaux facteurs influençant la formation de ces agrégats sont le taux d'expression, la présence de ponts disulfure et la nature hydrophobique de la séquence peptidique (Swartz, 2001; Jonasson *et al.*, 2002). Le taux d'expression peut être facilement réduit en utilisant des concentrations d'inducteur moins élevées et en abaissant la température d'incubation. L'utilisation de promoteur moins puissant peut aussi limiter la

formation de corps d'inclusion. Une autre approche, est de coexprimer des gènes codant pour des chaperonnes moléculaires impliquées dans le repliement des protéines (Baneyx et Mujacic, 2004). En réduisant la formation de corps d'inclusion, la quantité d'AxeA_{tr} sécrétée aurait du même coup augmenté.

La quantité totale de protéines excrétées dans le milieu de culture était d'environ 30 mg/L pour les souches BL21/pREP4/pIAF843 et BL21/pREP4/pIAF844. Outre l'AxeA_{tr}, il était possible d'observer deux bandes de fortes intensités sur gel coloré au bleu de Coomassie. Dans la présente étude, aucune différence notable n'a été observée entre les deux souches utilisées. Par contre, dans une autre étude utilisant les mêmes souches, il a été démontré que le vecteur pIAF844 permettait l'excrétion de deux fois plus d'AxeA_{tr} que pIAF843 (Nisole *et al.*, 2006). Il apparaît donc que le peptide signal de OmpA est plus approprié que celui de l'AxeA pour la production de l'AxeA_{tr} chez *E. coli*. Cette même étude a aussi démontré que la plus grande quantité d'AxeA_{tr} dans le milieu extracellulaire de BL21/pREP4/pIAF844 n'était pas due à une meilleure sécrétion, mais plutôt à une augmentation de la transcription ou de la traduction. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la séquence nucléotidique codant pour le peptide signal de OmpA possède un contenu en G/C (57 %) moins élevé que celle de l'AxeA (80 %). Des études ont en effet démontré qu'un enrichissement en A/T dans la séquence suivant le codon d'initiation favorisait la traduction (Hall *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1994).

4.2.3 *Streptomyces lividans* versus *Escherichia coli*

Les deux hôtes bactériens testés, soit *S. lividans* et *E. coli*, ont permis la production de l'AxeA_{tr}. Toutefois, il existe des différences importantes entre ces deux souches. Premièrement, *S. lividans* permet de produire une plus grande quantité d'enzyme qu'*E. coli* et de façon plus pure. Par contre, le temps d'incubation requis pour l'expression protéique est environ quatre fois plus long chez *S. lividans*. Le choix de l'hôte doit donc être fait en fonction des besoins. *E.*

coli est mieux adapté pour le criblage par sa croissance rapide et sa facilité de manipulation. Par contre, lorsqu'une grande quantité d'enzyme est nécessaire, *S. lividans* est alors l'hôte de prédilection.

4.4 Détection de l'activité de déacétylation

4.4.1 Essais sur milieu solide

Des essais visant à détecter la déacétylation de différents substrats par l'AxeA_{tr} ont été effectués sur des milieux nutritifs solides en plaques de Pétri. Ce type d'essais permet un criblage rapide avec généralement peu de manipulations (Aharoni *et al.*, 2005). La détection de l'activité enzymatique sur milieu solide peut donc servir d'étape de pré-criblage, permettant d'éliminer les clones sans activité. Trois substrats ont donc été testés, soit la glycol chitine (acétylée à 80%), le *p*-nitrophényle acétate (pNPA) et le 4-méthylumbelliferyle acétate (MUA).

La glycol chitine a été utilisée dans de nombreuses études pour mesurer l'activité de déacétylation de différentes enzymes de la famille des CE4, dont l'AxeA et l'AxeA_{tr} (Kafetzopoulos *et al.*, 1993; Tsigos et Bouriotis, 1995; Martinou *et al.*, 2002; Caufriet *et al.*, 2003). Dans ces études, les groupements acétyles de la glycol chitine étaient radiomarqués et la déacétylation était évaluée par radiométrie. Dans le cas présent, la glycol chitine a été ajoutée au milieu de culture solide. Différentes souches de *S. lividans* ont été ensemencées sur ces milieux. Suite à l'incubation, les milieux ont été colorés au rouge Congo afin de visualiser les zones de déacétylation. Des zones plus foncées entourant les colonies ont été observées, indépendamment de la production d'AxeA_{tr}. Ces zones n'étaient donc pas dues à l'activité de l'AxeA_{tr}. Il se pourrait qu'elles soient plutôt dues à l'hydrolyse de la glycol chitine par des chitinases (Fujii et Miyashita, 1993; Miyashita et Fujii, 1993).

Le pNPA et le MUA sont des substrats qui peuvent être utilisés pour mesurer l'activité de diverses estérases, dont les acétyle xylane estérases

(Degrassi *et al.*, 1998; Gazenko *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 1999). Le pNPA et le MUA ont été pulvérisés sur le milieu de culture, suite à la croissance des bactéries. Lorsque déacétylés, le pNPA devient jaune et le MUA fluoresce sous les UV. Aucune coloration jaune n'a été observée avec le pNPA, pour *E. coli* et *S. lividans*. La quantité de pNP produit était peut-être insuffisante pour être visible à l'œil nu. Généralement, les essais avec le pNPA sont effectués en solution et la quantité de pNP formé est mesurée par spectrophotométrie (Blum *et al.*, 1999). Avec le MUA, une fluorescence a été observée pour l'ensemble des souches testées, indépendamment de la production d'AxeA_{tr}. Il était donc impossible de discriminer les souches productrices d'AxeA_{tr} des souches non productrices. La présence d'enzymes capables d'hydrolyser le MUA rend donc cet essai inadéquat pour la détection de l'AxeA_{tr}.

4.4.2 Essais en solution

Les essais enzymatiques en solutions ont été effectués dans le but de mettre au point une méthode de criblage. Deux substrats ont été testés, soit le pNPA et des oligomères de chitosan acétylés à 20 %. Des essais ont été effectués avec l'AxeA_{tr} purifiée et des fractions protéiques d'*E. coli*. Les deux substrats se sont avérés efficaces avec l'enzyme pure, permettant de quantifier l'activité de déacétylation. Par contre, avec les fractions protéiques, le pNPA était déacétylé même en l'absence de l'AxeA_{tr}. La quantité de pNP formé semblait plutôt variée en fonction de la concentration bactérienne. Comme pour le MUA, la présence d'enzymes capables de déacétyler le pNPA rendait la détection de l'activité de l'AxeA_{tr} impossible. Le pNPA ne pouvait donc être utilisé pour le criblage des bibliothèques.

Dans le cas des oligomères de chitosan, les essais avec les fractions protéiques extracellulaires ont été concluants. L'activité de déacétylation était observée seulement dans les fractions contenant l'AxeA_{tr}. L'activité enzymatique était évaluée en mesurant la quantité d'acide acétique formé à l'aide de la trousse K-ACET (Megazyme). La quantification de l'acide acétique était toute fois

compliquée par la présence d'acide acétique produit par *E. coli*. Pour soustraire cet acide acétique, il était nécessaire de préparer un témoin pour chacun des clones testés. La production d'acide acétique peut résulter d'une surcharge du métabolisme du glucose ou de la fermentation acides mixtes en conditions anaérobiques (Xu *et al.*, 1999). Parce que le milieu de culture utilisé ne contenait pas de sucres, la production d'acide acétique résulterait d'un manque d'oxygène. Ceci pourrait être évité en augmentant la vitesse d'agitation ou en réduisant le volume du milieu de culture.

Des oligomères de chitine auraient aussi pu être utilisés comme substrat (Caufrier *et al.*, 2003). Ainsi, une plus grande quantité d'acide acétique aurait été libéré par la réaction de déacétylation, du fait que les oligomères de chitine comportent un plus grand nombre de groupement acétyles. Il aurait alors été plus aisé de faire la différence entre l'acide acétique produit par la bactérie et celui produit lors de la réaction enzymatique. Par contre, l'utilisation d'oligomères de chitines augmenterait considérablement le coût de criblage par leur prix élevé. De plus, sachant que le but du projet est d'augmenter l'activité de déacétylation de l'AxeA_{tr} envers les oligomères de chitosan, il est préférable d'utiliser ce dernier substrat pour le criblage (Aharoni *et al.*, 2005).

4.5 Criblage

4.5.1 Approche expérimentale

Un des principaux défis du projet consistait à mettre au point une stratégie de criblage efficace. Pour le moment, la méthode ne permet pas un criblage à haut débit et nécessite encore des améliorations. La présente étude a tout de même permis de développer une technique d'expression protéique en microplaques à 96 puits pour *S. lividans* et *E. coli*. La surproduction de protéines en microplaques avec *E. coli* s'effectue couramment. Par contre, pour *S. lividans*, la littérature ne décrivait aucune méthode de culture en microplaques avant ce projet. Une étape de pré-criblage ainsi qu'un essai enzymatique avec des

oligomères de chitosan ont aussi été adaptés au format microplaque. L'étape de pré-criblage permettait d'éliminer les clones ne produisant pas d'AxeA_{tr}, réduisant ainsi la charge de criblage. Seule la détection de l'acide acétique n'est toujours pas adaptée au criblage à haut débit. En effet, la trousse K-ACET (Megazyme) nécessite beaucoup de manipulations et ne permet pas de tester un grand nombre d'échantillons simultanément.

La quantification de l'acide acétique par HPLC pourrait être une alternative à la trousse K-ACET. Une telle technique a déjà été utilisée par Dupont *et al.* (1996) lors de la caractérisation de l'AxeA de *S. lividans*. Les essais étaient alors effectués avec l'enzyme purifiée et du xylane acétylé comme substrat. Dans la présente étude, les essais enzymatiques ont été effectués avec des surnageants de culture et des oligomères de chitosan comme substrat. Il a été possible de détecter l'acide acétique libéré par la réaction de déacétylation. Cependant, le pic de l'acide acétique était chevauché par deux autres pics, ce qui ne permettait pas une quantification précise. Malgré ce fait, la quantification de l'acide acétique par HPLC apparaît applicable au criblage. Des modifications apportées au protocole pourraient permettre de diminuer le nombre de pics contaminants et/ou d'obtenir une meilleure résolution. Par exemple, la distance entre chaque pic pourrait être augmentée en diminuant le débit de la phase mobile. Aussi, l'utilisation d'une pré-colonne plus restrictive pourrait permettre de réduire le nombre de molécules détectées. Il est probable qu'une grande partie des pics contaminants provient du surnageant de culture. L'utilisation d'un milieu de culture minimale pourrait donc faciliter la quantification de l'acide acétique.

4.5.2 Librairie SYT-V

Malgré le fait qu'une méthode de criblage à haut débit n'a pas été mise au point, 89 clones provenant de la librairie SYT-V ont été analysés. À l'étape de pré-criblage, l'AxeA_{tr} a été détectée chez environ 75 % clones. Ces derniers sécrétaient donc une enzyme mutée stable en quantité suffisante pour être détectée par immunobuvardage. De ces clones positifs, 32 ont été testés pour leur

efficacité à déacétyler des oligomères de chitosan. La trousse K-ACET (Megazyme) a été utilisée pour la quantification de l'acide acétique. Environ 80 % des clones testés étaient actifs envers les oligomères de chitosan, avec des niveaux d'activité variable. Aucune amélioration évidente de l'activité de déacétylation n'a été observée. Il apparaît étonnant qu'un si grand nombre de clones aient conservé une activité, considérant que trois acides aminés successifs ont été mutés simultanément. Le site Ser63-Tyr64-Thr65 est donc relativement peu sensible aux mutations, malgré le fait qu'il soit bordé de deux histidines faisant possiblement partie du site actif (Blair et van Aalten, 2004). Pour conclure sur l'intérêt de ce site, d'autres analyses devront être effectuées.

5. CONCLUSION

Dans le cadre d'une étude d'évolution dirigée, l'objectif était d'augmenter l'activité de déacétylation de l'AxeA_{tr} envers des oligomères de chitosan. L'approche expérimentale consistait à construire des bibliothèques d'*axeA_{tr}* mutés, puis à isoler les clones comportant des caractéristiques améliorées grâce un criblage fonctionnel.

En premier lieu, une souche de *Streptomyces lividans* a été adaptée à la production de l'AxeA_{tr}, par modification génétique. Le gène *axeA* a été délété grâce à une méthode développée par Gust *et al.* (2003). Une souche mutante stable a ainsi été obtenue. L'utilisation de cette souche pour la surexpression d'*axeA_{tr}* permet de produire l'enzyme sans contamination par l'AxeA native. De cette façon, le processus de purification est simplifié et les essais enzymatiques effectués avec les surnageants de culture ne sont pas faussés.

Les bibliothèques d'*axeA_{tr}* ont été obtenues par mutagenèse de saturation de site. Ainsi, l'ensemble des mutations possibles pouvait être introduit dans une région précise. Lors de la construction des bibliothèques, les résidus impliqués dans l'activité catalytique n'étaient pas connus. Le choix des sites de mutations a donc été effectué en analysant un alignement de séquences protéiques, composés de différents membres de la famille des CE4. De cette façon, deux sites ont été sélectionnés, soit les sites Ser16-Gly17-Ser18 et Ser63-Tyr64-Thr65. Suite à la publication de la structure tridimensionnelle de l'AxeA_{tr}, il s'est avéré que les deux sites de mutations choisis se situaient tout près des résidus impliqués dans la catalyse, soit une histidine (His62) et deux acides aspartique (Asp12 et Asp13). Les deux sites de mutations sélectionnés ont donc le potentiel pour modifier l'activité catalytique et la spécificité de l'AxeA_{tr}.

Deux hôtes bactériens ont permis de produire l'AxeA_{tr} dans le milieu extracellulaire, soit *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans*. *S. lividans* produit une plus grande quantité d'enzyme qu'*E. coli* et de façon beaucoup plus pure. Par contre, le temps d'incubation requis pour l'expression protéique est relativement

long. *E. coli* est donc mieux adaptée pour le criblage, en raison de sa croissance rapide et de sa facilité de manipulation. *S. lividans* trouve plutôt son utilité lors de la purification d'enzyme.

Différents essais ont été effectués afin de détecter l'activité de déacétylation de l'AxeA_{tr}. Pour les essais sur milieux solides, trois substrats ont été utilisés, soit le *p*-nitrophényl acétate, le 4-méthylumbelliféryl acétate et la glycol chitine. Tous les essais se sont avérés infructueux, ne permettant pas de distinguer les souches productrices d'AxeA_{tr} des témoins négatifs. Des essais avec des surnageants de culture d'*E. coli* ont aussi été effectués. Seuls les oligomères de chitosan ont donné des résultats intéressants. Le *p*-nitrophényl acétate était déacétylé en présence et en absence d'AxeA_{tr}, possiblement par la présence d'estérases. Il ne pouvait donc être utilisé pour le criblage.

Dans une optique de criblage à haut débit, la culture en microplaques à 96 puits de *S. lividans* et d'*E. coli* a été optimisée. L'expression protéique et les essais enzymatiques ont aussi été adaptés au format microplaque. Seuls les oligomères de chitosan ont démontré un potentiel pour le criblage. Ainsi, la quantité d'acide acétique libérée par la réaction de déacétylation devait être mesurée pour identifier les clones les plus performants. Une trousse commerciale permet le dosage de l'acide acétique, mais ne peut être adaptée pour le criblage. Comme alternative, la quantification par HPLC a été examinée. Les résultats obtenus ont démontré le potentiel de cette méthode, mais des modifications doivent encore être apportées pour permettre une quantification précise.

En l'absence d'une méthode de criblage efficace, un nombre réduit de clones a été analysé. À l'étape de pré-criblage, l'AxeA_{tr} a été détectée chez environ 75 % des 89 clones analysés. De ces clones positifs, 32 ont été testés pour leur efficacité à déacétyler des oligomères de chitosan. Environ 80 % des clones étaient actifs, à des niveaux variables. Le site Ser63-Tyr64-Thr65 apparaît

donc peu sensible aux mutations, considérant que trois résidus ont été substitués simultanément.

Pour la poursuite de cette étude, il est essentiel de compléter l'optimisation de la méthode de détection de l'acide acétique par HPLC, pour ainsi permettre un criblage efficace des bibliothèques. Par la suite, les AxeA_{tr} mutées ayant montré une activité accrue pourront être produites grâce à la souche *S. lividans* IAF45, pour être purifiées et caractérisées. D'autres cycles de mutations/criblages seront certainement requis pour atteindre un niveau d'activité suffisamment élevé. La création de nouvelles bibliothèques par mutagenèse aléatoire ou recombinatoire permettrait de compléter les bibliothèques obtenues dans la présente étude. Aussi, la structure tridimensionnelle de l'AxeA_{tr} récemment publiée et une meilleure compréhension du mécanisme catalytique permettent maintenant d'effectuer de la mutagenèse dirigée. À plus long terme, il serait envisageable de modifier d'autres propriétés de l'AxeA_{tr}, comme son activité cobalt-dépendante, pour ainsi obtenir une enzyme industriellement viable.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguinaldo, A. M. et Arnold, F. H. 2003. Staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Methods Mol. Biol.* **231** : 105-110.
- Aharoni, A., Griffiths, A. D. et Tawfik, D. S. 2005. High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9** : 210-216.
- Aigle, B., Pang, X., Decaris, B. et Leblond, P. 2005. Involvement of AlpV, a new member of the *Streptomyces* antibiotic regulatory protein family, in regulation of the duplicated type II polyketide synthase alp gene cluster in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Bacteriol.* **187** : 2491-2500.
- Alfonso, C., Nuero, O. M., Santamaria, F. et Reyes, F. 1995. Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* **30** : 49-54.
- Amorim, R. V., Ledingham, W. M., Fukushima, K. et Campos-Takaki, G. M. 2005. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32** : 19-23.
- Arachami, M., Gowri, N., et Sundara-Rajulu, G. 1986. dans : Chitin in nature and technology (Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., et Gooday, G. W., eds) Plenum, New York, pp. 263-268.
- Araki, Y. et Ito, E. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* **55** : 71-78.
- Arnold, F. H. et Volkov, A. A. 1999. Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** : 54-59.
- Aye, K. N., Karuppuswamy, R., Ahamed, T. et Stevens, W. F. 2006. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresour. Technol.* **97** : 577-582.
- Bailey, S. E., Olin, T. J., Bricka, R. M. et Adrian, D. D. 1999. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Res.* **33** : 2469-2479.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** : 411-421.

- Baneyx, F. et Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22** : 1399-1408.
- Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York.
- Bertrand, J. L., Morosoli, R., Shareck, F. et Kluepfel, D. 1989. Expression of the xylanase of *Streptomyces lividans* and the production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **33** : 791-794.
- Biely, P., Cote, G. L., Kremnicky, L., Greene, R. V., Dupont, C. et Kluepfel, D. 1996. Substrate specificity and mode of action of acetylxyylan esterase from *Streptomyces lividans*. *FEBS. Lett.* **396** : 257-260.
- Biely, P., Mastihubova, M., Cote, G. L. et Greene, R. V. 2003. Mode of action of acetylxyylan esterase from *Streptomyces lividans*: a study with deoxy and deoxy-fluoro analogues of acetylated methyl β -D-xylopyranoside. *Biochim. Biophys. Acta.* **622** : 82-88.
- Binnie, C., Cossar, J. D. et Stewart, D. I. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol.* **15** : 315-320.
- 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 Lett.* **570** : 13-9.
- Blair, D. E., Schuttelkopf, A. W., MacRae, J. I. et van Aalten, D. M. 2004. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** : 15429-15434.
- Blum, D. L., Li, X. L., Chen, H. et Ljungdahl, L. G. 1999. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3990-3995.
- Brawner, M. E. 1994. Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5** : 475-481.
- Brekasis, D. et Paget, M. S. 2003. A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* **22** : 4856-4865.
- Cadwell, R. C. et Joyce, G. F. 1994. Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* **3** : 136-140.
- Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C. et Bouriotis, V. 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* **338** : 687-692.

- Cedrone, F., Ménez, A. Quéméneur E. 2000. Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** : 405-410.
- Chai, T. J. et Foulds, J. 1977. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **493** : 210-215.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J. et Fu, W. -R. 1997. Heterogeneous *N*-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* **303** : 327-332.
- Chen, H., Pomeroy-Cloney, L., Bjerknes, M., Tam, J. et Jay, E. 1994. The influence of adenine-rich motifs in the 3' portion of the ribosome binding site on human IFN-gamma gene expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **240** : 20-27.
- Chirumamilla, R. R., Muralidhar, R., Marchant, R. et Nigam, P. 2001. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol. Cell. Biochem.* **224** : 159-168.
- Choi, J. H. et Lee, S. Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** : 625-635.
- Christians, F. C. et Loeb, L. A. 1996. Novel human DNA alkyltransferases obtained by random substitution and genetic selection in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** : 6124-6128.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. et Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271** : 31420-31425.
- Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A. et Bouriotis, V. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.* **460** : 275-279.
- Chung, H.-J., Park, S.-M., Kim, H.-R., Yang, M.-S. et Kim D.-H. 2002. Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus ficuum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* **31** : 384-391.
- Cirino, P. C., Mayer, K. M. et Umeno, D. 2003. Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* **231** : 3-9.
- Coco, W. M. 2003. RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates. *Methods Mol. Biol.* **231** : 111-127.

- Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P. T., Squires, C. H. et Monticello, D. J. 2001. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* **19** : 354-359.
- Coutinho, P. M. et Henrissat, B. 2002. Serveur Carbohydrate-Active Enzymes, URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- Cybinski, D. H., Layton, I., Lowry, J. B. et Dalrymple, B. P. 1999. An acetylxyylan esterase and a xylanase expressed from genes cloned from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* act synergistically to degrade acetylated xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** : 221-225.
- Dalrymple, B. P., Cybinski, D. H., Layton, I., McSweeney, C. S., Xue, G. P., Swadling, Y. J. et Lowry, J. B. 1997. Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology.* **143** : 2605-2614.
- Datsenko, K. A. et Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** : 6640-6645.
- Davis, L. L. et Bartnicki-Garcia, S. 1984. The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **130** : 2095-2102.
- Degrassi, G., Okeke, B. C., Bruschi, C. V. et Venturi, V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylian esterase from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 789-792.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F. et Rigali, S. 2004. Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **186** : 1893-1897.
- Dodane, V. et Vilivalam, V. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Today.* **1** : 246-253.
- Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylian esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* **319** : 881-886.
- el Hawrani, A. S., Moreton, K. M., Sessions, R. B., Clarke, A. R. et Holbrook, J. J. 1994. Engineering surface loops of proteins--a preferred strategy for obtaining new enzyme function. *Trends Biotechnol.* **12** : 207-211.

- Egana, L., Gutierrez, R., Caputo, V., Peirano, A., Steiner, J. et Eyzaguirre, J. 1996. Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24** : 33-39.
- Eustaquio, A. S., Gust, B., Galm, U., Li, S. M., Chater, K. F. et Heide, L. 2005. Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 2452-2459.
- Falini, G. et Fermani, S. 2004. Chitin mineralization. *Tissue Eng.* **10** : 1-6.
- Felt, O., Buri, P. et Gurny, R. 1998. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24** : 979-993
- Fornwald, J. A., Donovan, M. J., Gerber, R., Keller, J., Taylor, D. P., Arcuri, E. J. et Brawner, M. E. 1993. Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. *Biotechnology (N.Y.)*. **11** : 1031-1036.
- Fujii, T. et Miyashita, K. 1993. Multiple domain structure in a chitinase gene (chiC) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 677-686.
- Fukushima, T., Kitajima, T. et Sekiguchi, J. 2005. A polysaccharide deacetylase homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* acts as an N-acetylmuramic acid deacetylase in vitro. *J. Bacteriol.* **187** : 1287-1292.
- Gao, X. D., Katsumoto, T. et Onodera, K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **117** : 257-63.
- Gazenko, S. V., Reponen, T. A., Grinshpun, S. A. et Willeke, K. 1998. Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4410-4415.
- Georgiou, G., Shuler, M. et Wilson, D. 1988. Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of β -lactamase overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **32** : 741-748.
- Ghosh, D., Sawicki, M., Lala, P., Erman, M., Pangborn, W., Eyzaguirre, J., Gutierrez, R., Jornvall, H. et Thiel, D. J. 2001. Multiple conformations of catalytic serine and histidine in acetylxyylan esterase at 0.90 Å. *J. Biol. Chem.* **276** : 11159-11166.
- Goddard, J. P. et Reymond, J. L. 2004. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** : 314-322.

- Greener, A., Callahan, M. et Jerpseth, B. 1996. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Methods Mol. Biol.* **57** : 375-385.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. et Chater, K. F. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** : 1541-1546.
- Hakulinen, N., Tenkanen, M. et Rouvinen, J. 2000. Three-dimensional structure of the catalytic core of acetylxylnan esterase from *Trichoderma reesei*: insights into the deacetylation mechanism. *J. Struct. Biol.* **132** : 180-190.
- Halgasova, N., Kutejova, E. et Timko, J. 1994. Purification and some characteristics of the acetylxylnan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem. J.* **298** : 751-755.
- Hall, C. V., vanCleemput, M., Muench, K. H. et Yanofsky, C. 1982. The nucleotide sequence of the structural gene for *Escherichia coli* tryptophanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **257** : 6132-6136.
- 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. *Biochem. J.* **374** : 369-380.
- Higuchim, R., Krummel, B. et Saiki, R. K. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16** : 7351-7367.
- Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2** : 237-258.
- Honda, Y., Kirihata, M., Fukamizo, T., Kaneko, S., Tokuyasu, K. et Brzezinski, R. 1999. Chitosanase-catalysed hydrolysis of 4-methylumbelliferyl β -chitotrioside. *J. Biochem.* **126** : 470-474.
- Horsman, G. P., Liu, A. M., Henke, E., Bornscheuer, U. T. et Kazlauskas, R. J. 2003. Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl 3bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3phenylbutyrate. *Chemistry.* **9** : 1933-1939.
- Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M. et Hutcheson, S. W. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30** : 627-635.

- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **17** : 367-377.
- Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Airenne, T. T., Kidron, H., Meltola, N. J., Porkka, E. J., Horha, J., Paldanius, T., Maatta, J. A., Nordlund, H. R., Johnson, M. S., Salminen, T. A., Airenne, K. J., Yla-Herttuala, S. et Kulomaa, M. S. 2004. Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **384** : 385-390.
- Illum, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.* **15** : 1326-1331.
- Isiegas, C., Parro, V. et Mellado, R. P. 1999. *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM beta-lactamase. *Lett. Appl. Microbiol.* **28** : 321-326.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. et Stahl, S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35** : 91-105.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A. et Bouriotis, V. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 2564-2568.
- Kas, H. S. 1997. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul.* **14** : 689-711.
- Khor, E. et Lim, L. Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* **24** : 2339-2349.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. et Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich.
- Kim, D. W., Chater, K., Lee, K. J. et Hesketh, A. 2005. Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the bldA gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187** : 2957-2966.
- Koide, S. S. 1998. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr. Res.* **18** : 1091-1101.

- Koseki, T., Miwa, Y., Fushinobu, S. et Hashizume, K. 2005. Biochemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase from *Aspergillus awamori* expressed in *Pichia pastoris*: mutational analysis of catalytic residues. *Biochim. Biophys. Acta.* **1749** : 7-13.
- Kretz, K. A., Richardson, T. H., Gray, K. A., Robertson, D. E., Tan, X. et Short, J. M. 2004. Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods Enzymol.* **388** : 3-11.
- Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Gossey, M. W. et Copping, L. G. 1990. Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Springer-Verlag, Berlin.
- Lamarque, G., Viton, C. et Domard, A. 2004. Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules.* **5** : 1899-1907.
- Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Schacht, S., Dillen, C., Sablon, E., Van Broekhoven, A. et Anne, J. 1997. Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1808-1813.
- Laurie, J. I., Clarke, J. H., Ciruela, A., Faulds, C. B., Williamson, G., Gilbert, H. J., Rixon, J. E., Millward-Sadler, J. et Hazlewood, G. P. 1997. The NodB domain of a multidomain xylanase from *Cellulomonas fimi* deacetylates acetylxylan. *FEMS Microbiol. Lett.* **148** : 261-264.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** : 680-685.
- Leemhuis, H., Euverink, G. J. et Dijkhuizen, L. 2003. High-throughput screening for gene libraries expressing carbohydrate hydrolase activity. *Biotechnol. Lett.* **25** : 1643-1645.
- Li, C., Akopiants, K. et Reynolds, K. A. 2006. Identification and disruptional analysis of the *Streptomyces cinnamonensis* msdA gene, encoding methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33** : 75-83.
- Luthi, E., Jasmat, N. B. et Bergquist, P. L. 1990. Overproduction of an acetylxylan esterase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*" in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34** : 214-219.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G. L., Maranas, C. D. et Benkovic, S. J. 2001. Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** : 11248-11253.

- MacBeath, G., Kast, P. et Hilvert, D. 1998. Exploring sequence constraints on an interhelical turn using in vivo selection for catalytic activity. *Protein Sci.* **7** : 325-335.
- Madhally, S. V. et Matthew, H. W. T. 1999. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* **20** : 1133-1142.
- Mandels, M et Reese, E. T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* **73** : 269-278.
- Manosroi, J., Tayapiwatana, C., Gotz, F., Werner, R. G. et Manosroi, A. 2001. Secretion of active recombinant human tissue plasminogen activator derivatives in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 2657-2664.
- Marini, F. 3^e, Naeem, A. et Lapeyre, J. N. 1993. An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucleic Acids Res.* **21** : 2277-2278.
- Martineau, P., Jones, P. et Winter, G. 1998. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **280** : 117-127.
- Martinou, A., Bouriotis, V., Stokke, B. et Varum, K. 1998. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially *N*-acetylated chitosans. *Carbohydr. Res.* **311** : 71-78.
- Martinou, A., Koutsoulis, D. et Bouriotis V. 2002. Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expr. Purif.* **24** : 111-116.
- McCarter, J. D., Stephens, D., Shoemaker, K., Rosenberg, S., Kirsch, J. F. et Georgiou, G. 2004. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.* **186** : 5919-5925.
- McDermid, K. P., Forsberg, C. W. et MacKenzie, C. R. 1990. Purification and properties of an acetylxyln esterase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 3805-3810.
- Miyazaki, K. et Arnold, F. H. 1999. Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* **49** : 716-720.
- Miyashita, K. et Fujii, T. 1993. Nucleotide sequence and analysis of a gene (chiA) for a chitinase from *Streptomyces lividans* 66. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57** : 1691-1698.

- Moore, G. L. et Maranas, C. D. 2000. Modeling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. *J. Theor. Biol.* **205** : 483-503.
- Morley, K. L. et Kazlauskas, R. J. 2005. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **23** : 231-237.
- Murakami, H., Hohsaka, T. et Sisido, M. 2002. Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* **20** : 76-81.
- Morosoli, R., Shareck, F. et Kluepfel, D. 1997. Protein secretion in streptomyces. *FEMS Microbiol. Lett.* **146** : 167-174.
- Murphy, K. C. 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180** : 2063-2071
- Muzzarelli, R. A. A. 1977. Chitin. Pergamon Press, Oxford.
- Nahar, P., Ghormade, V. et Deshpande, M. V. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* **85** : 80-88.
- Natsir, H., Chandra, D., Rukayadi, Y., Suhartono, M. T., Hwang, J. K. et Pyun, Y. R. 2002. Biochemical characteristics of chitinase enzyme from *Bacillus* sp. of Kamojang Crater, Indonesia. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **4** : 279-282.
- Neylon, C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic. Acids. Res.* **32** : 1448-1459.
- Nguyen, A. W. et Daugherty, P. S. 2003. Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains. *Methods Mol. Biol.* **231** : 39-44.
- 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 Expr. Purif.* **46** : 274-284.
- Ogawa, K., Yui, T. et Okuyama, K. 2004. Three D structures of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **34** : 1-8.

- Ogino, C., Kanemasu, M., Hayashi, Y., Kondo, A., Shimizu, N., Tokuyama, S., Tahara, Y., Kuroda, S., Tanizawa, K. et Fukuda, H. 2004. Over-expression system for secretory phospholipase D by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** : 823-828.
- Ostermeier, M., Shim, J. H. et Benkovic, S. J. 1999. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.* **17** : 1205-1209.
- Paget, M. S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J. et Buttner, M. J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **181** : 204-211.
- Parikh, M. R. et Matsumura, I. 2005. Site-saturation mutagenesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of beta-fucosidase from beta-galactosidase. *J. Mol. Biol.* **352** : 621-628.
- Patrick, W. M., Firth, A. E. et Blackburn, J. M. 2003. User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein. Eng.* **16** : 451-457.
- Puchart, V., Gariépy, M. C., Shareck, F. et Dupont, C. 2005. Identification of catalytically important amino acid residues of *Streptomyces lividans* acetylxyylan esterase A from carbohydrate esterase family 4. *Biochim. Biophys. Acta*. Sous presses.
- Reetz, M. T. 2004. Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** : 5716-5722.
- Rinas, U. et Hoffmann, F. 2004. Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **20** : 679-687.
- Robbens, J., Raeymaekers, A., Steidler, L., Fiers, W. et Remaut, E. 1995. Production of soluble and active recombinant murine interleukin-2 in *Escherichia coli*: high level expression, Kil-induced release, and purification. *Protein. Expr. Purif.* **6** : 481-486.
- Ruiz-Herrera, J. et Martinez-Espinoza, A. D. 1999. Chitin biosynthesis and structural organization *in vivo*. *EXS.* **87** : 39-53.
- Saito, Y., Okano, T., Gaill, F., Chanzy, H. et Putaux J. L. 2000. Structural data on the intra-crystalline swelling of beta-chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* **28** : 81-88.

- Sarkar, G. et Sommer, S. S. 1990. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*. **8** : 404-407.
- Sawano, A. et Miyawaki, A. 2000. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **28** : E78.
- Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. et Domard, A. 2003. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*. **4** : 641-648.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. et Jeon, Y. -J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* **10** : 37-51.
- Shao, W. et Wiegel, J. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 729-733.
- Shigemasa, Y. et Minami, S. 1996. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13** : 383-420.
- Shioya, S., Morikawa, M., Kajihara, Y. et Shimizu, H. 1999. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** : 164-169.
- Shokri, A., Sanden, A. M. et Larsson, G. 2003. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60** : 654-664.
- Shrestha, B., Blondeau, K., Stevens, W. F. et Hegarat, F. L. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein. Expr. Purif.* **38** : 196-204.
- Singla A. K. et Chawla M. 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J. Pharm. Pharmacol.* **53** : 1047-1067.
- Stemmer, W. P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 10747-10751.
- Sundberg, M. et Poutanen, K. 1991. Purification and properties of two acetylxylan esterases of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13** : 1-11.
- Swartz, J. R. 2001. Effect of sequences of the active-site dipeptides of DsbA and DsbC on in vivo folding of multidisulfide proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183** : 980-988.

- Synowiecki, J. et Al-Khateeb, N. A. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43** : 145-171.
- 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 acetyl xylan esterases involved in plant cellwall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. *J. Biol. Chem.* Sous presse.
- Thacharodi, D. et Rao, K. P. 1995. Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. *Biomaterials.* **16** : 145-148.
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M. et Hayashi, K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** : 1598-1603.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Hayashi, K. et Mori, Y. 1999a. Reverse hydrolysis reaction of chitin deacetylase and enzymatic synthesis of β -D-GlcNAc-(1-4)-GlcN from chitobiose. *Carbohydr. Res.* **322** : 26-31.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Kitagawa, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. et Mori, Y. 1999b. Selective *N*-deacetylation of *p*-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -chitobioside and its use to differentiate the action of two types of chitinases. *Carbohydr. Res.* **316** : 173-178.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Mitsutomi, M., Hayashi, K. et Mori, Y. 2000. Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-(1-4)-D-GlcN through a partial *N*-acetylation reaction by chitin deacetylase. *Carbohydr. Res.* **325** : 211-215.
- Tokuyasu, K., Kaneko, S., Hayashi, K. et Mori, Y. 1999. Production of a recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* **458** : 23-26.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. et Mori, Y. 1997. Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydr. Res.* **303** : 353-358.
- Tremblay, D., Lemay, J., Gilbert, M., Chapdelaine, Y., Dupont, C. et Morosoli, R. 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Can. J. Microbiol.* **48** : 43-48.

- Trudel, J. et Asselin, A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **189** : 249-253.
- Tsigos, I. et Bouriotis, V. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **270** : 26286-26291.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. et Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases : new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **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. *Eur. J. Biochem.* **261** : 698-705.
- Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Iio, T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M. et Inamori, Y. 1997. Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 661-664.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L. et Denolf, P. 2005. Reducing mutational bias in random protein libraries. *Anal. Biochem.* **339** : 9-14.
- Vasudev, S. C., Chandy, T. et Sharma, C. P. 1997. Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis. *Biomaterials.* **18** : 375-381.
- Vollmer, W. et Tomasz, A. 2002. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70** : 7176-7178.
- Win, N. N. et Stevens, W. F. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** : 334-341.
- Wong, T. S., Tee, K. L., Hauer, B. et Schwaneberg, U. 2004. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **32** : e26.
- Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G. et Enfors, S. O. 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** : 564-571.
- Yano, T., Oue, S. et Kagamiyama, H. 1998. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** : 5511-5515.

- Zaccolo, M., Williams, D. M., Brown, D. M. et Gherardi, E. 1996. An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J. Mol. Biol.* **255** : 589-603.
- Zhang, J. H., Dawes, G. et Stemmer, W. P. 1997. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** : 4504-4509
- Zhang, J. X., Martin, J. et Flint H. J. 1994. Identification of non-catalytic conserved regions in xylanases encoded by the xynB and xynD genes of the cellulolytic rumen anaerobe *Ruminococcus flavefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **245** : 260-264.
- Zheng, L., Baumann, U. et Reymond, J. L. 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32** : e115.

ANNEXE

Publication

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 Expr. Purif.* **46** : 274-284.

Contribution : Rédaction et production de résultats.

Communication orale

Lussier, F.-X. 2005. Hydrolase from *Streptomyces*. Atelier Enzymes Montréal, Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, Canada.

Communications par affiche

Lussier, F.-X., Shareck, F. et Dupont, C. 2005. Étude d'évolution dirigée portant sur l'acétyl xylane estérase de *Streptomyces lividans*. Atelier Enzymes Montréal, Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, Canada.

Chouinard, A., Lussier, F.-X. et Shareck, F. 2003. Proteomic study of *Streptomyces coelicolor* M145 mutants. 53^e Congrès Annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes. Laval, Canada.

Contribution : Construction de la souche *Streptomyces coelicolor* $\Delta bxlR$.

Liste des produits chimiques utilisés

Acétate de potassium	Sigma
Acétate de sodium	EM Science
Acide acétique	EMD
Acide borique	Sigma
Acide nalidixique	EM Science
Acide sulfurique	USB
Agar	USB
Agarose	USB
Albumine sérine bovine	Sigma
Apramycine	Sigma
ATP	Sigma
Bleu bromophénol	Biorad
Bleu de Coomassie	Biorad
Borate de sodium	Fisher
Bromure d'éthidium	EM Science
Carbonate de sodium	Fisher
Casamino Acid	Fisher
Chloroforme	Fisher
Chlorure de calcium	Sigma
Chlorure de cobalt	Sigma
Chlorure de cuivre	VWR
Chlorure de magnésium	VWR
Chlorure de manganèse	Sigma
Chlorure de potassium	Fisher
Chlorure de sodium	Fisher
Chlorure de zinc	VWR
Chlorure ferrique	Fisher
DMSO	Fisher
dNTPs	Fisher

EDTA	Fisher
Éthanol	Gouvernement du Québec
Extrait de boeuf	Difco
Extrait de levure	Difco
Farine de soya	TAU
Ficoll 400	Sigma
Formaldéhyde	Fisher
Glucose	Sigma
Glycérol	Fisher
Glycine	GE Healthcare
Glycol chitine	Université McGill
Hydroxyde de sodium	VWR
Hydroxyquinoline	Sigma
IPTG	USB
Isopropanol	Fisher
Kanamycine	Sigma
Lait écrémé	Merck
L-arabinose	ICN
L-proline	Roche
Lysozyme	USB
Maltose	Difco
Mannitol	Sigma
Méthanol	Gouvernement du Québec
Méthionine	Sigma
4-méthylumbelliféryl acétate	Sigma
Molybdate d'ammonium	Fisher
<i>n</i> -butanol	Sigma
Nitrate d'argent	Sigma
NZ amine A	Sigma
Oligomères de chitosan	ISM Biopolymer
PEG6000	Roche

Phénol	Roche
Phénylméthylsulfonyl fluoride	Sigma
Phosphate de potassium dibasique	Fisher
Phosphate de potassium monobasique	Fisher
Phosphate de sodium	VWR
<i>p</i> -nitrophényl acétate	Sigma
Polyacrylamide	GE Healthcare
Poudre de soja tryptique	Difco
RNase	Roche
Rouge Congo	J.T. Baker
Saccharose	Sigma
SDS	Biorad
Solution NBT	Boehringer Mannheim
Sulfate d'ammonium	Fisher
Sulfate de cuivre	Sigma
Sulfate de magnésium	VWR
TES	Sigma
Thiosulfate de sodium	VWR
Tris	USB
Tryptone	Difco
Tween80	Sigma
Tyrosine	Gibco BRL
Xylène cyanol	Sigma
Xylose	Sigma