

MARIE-CLAUDE GARIÉPY

**ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE
L'ACÉTYLE-XYLANE ESTÉrase A DE *STREPTOMYCES LIVIDANS***

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

Jury d'évaluation

Claude Dupont Ph.D.
Alain Fournier Ph.D.
Pierre Thibault Ph.D.

Août 2000
INRS-Institut Armand-Frappier

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ANNEXES	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
SOMMAIRE	xv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.0 LE XYLANE.....	5
1.1 Composition.....	5
1.2 Biodégradation.....	5
2.0 LES ESTÉRASES.....	7
2.1 Généralités.....	7
2.2 Mécanisme d'action.....	7
2.3 Les sérines estérases.....	12
3.0 LES ACÉTYLE-XYLANE ESTÉRASES.....	15
3.1 Classification.....	15
3.2 Applications.....	15
3.3 Mécanisme d'action.....	16
4.0 ACÉTYLE-XYLANE ESTÉrase A DE <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> (AXEA).....	18
4.1 Caractéristiques.....	18
4.2 Classification.....	21
4.3 Spécificité d'action.....	22
4.4 Mécanisme d'action proposé de l'AxeA de <i>S. lividans</i>	22
4.5 L'acétyle-xylane estérase tronquée (AxeA _{tr}) de <i>S. lividans</i>	23
5.0 TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS CATALYTIQUES.....	23
5.1 Sérine estérase.....	23
5.2 Histidine.....	27
6.0 OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	28

APPROCHE EXPÉRIMENTALE	29
1.0 PRODUITS CHIMIQUES.....	30
2.0 SOUCHES BACTÉRIENNES.....	30
2.1 <i>Streptomyces lividans</i>	30
2.2 <i>Escherichia coli</i>	30
3.0 VECTEURS D'EXPRESSION.....	31
3.1 <i>S. lividans</i>	31
3.2 <i>E. coli</i>	31
4.0 CONSERVATION DES SOUCHES	32
4.1 <i>S. lividans</i>	32
4.2 <i>E. coli</i>	32
5.0 MILIEUX DE CULTURE.....	33
5.1 <i>S. lividans</i>	33
5.1.1 Milieux solides.....	33
5.1.2 Milieux liquides	33
5.2 <i>E. coli</i>	33
5.2.1 Milieux solides.....	33
5.2.2 Milieux liquides	33
6.0 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)	34
6.1 Conditions de réaction	34
6.2 Mutagenèse dirigée.....	34
7.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES CHEZ <i>S. LIVIDANS</i>	35
7.1 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	35
7.2 Isolement d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	38
7.3 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur	38
8.0 MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES DES SOUCHES.....	39
8.1 Isolement de plasmide	39
8.1.1 <i>S. lividans</i>	39
8.1.2 <i>E. coli</i>	40
8.2 Protoplaste et transformation	41
8.2.1 <i>S. lividans</i>	41
9.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES.....	41
9.1 Sous-clonage dans M13	41
9.2 Transfection	42
9.3 Production et purification d'ADN simple brin du phage M13	42
9.4 Cartographie à la nucléase S1 (S1 mapping).....	43
9.5 Séquençage de l'ADN	43

10.0	PRODUCTION DE L'ENZYME	44
10.1	Conditions de culture.....	44
10.2	Récupération et concentration de l'enzyme.....	44
11.0	PURIFICATION DES ENZYMES.....	45
11.1	Échangeurs d'ions	45
11.2	Tamis moléculaire.....	46
12.0	ANALYSE DES PROTÉINES	47
12.1	Dosage des protéines	47
12.2	SDS-PAGE.....	47
12.3	Détermination du point isoélectrique	48
12.4	Immunobuvardage de type Western.....	48
13.0	DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	49
13.1	Préparation du substrat xylane acétylé	49
13.2	Tests quantitatifs pour l'AxeA _{tr}	50
13.2.1	Substrat : xylane acétylé.....	50
13.2.2	Substrat : méthyle tri- <i>O</i> -acétyle- β -D-xylopyranoside.....	50
13.3	Quantification de l'acide acétique.....	51
13.4	Tests quantitatifs avec la trypsine	51
14.0	RÉACTION D'INHIBITION.....	52
14.1	Inhibition avec le fluorure de benzyle sulfonyle (PMSF)	52
14.2	Inhibition avec le fluorophosphate de diisopropyle (DFP).....	52
14.3	Inhibition avec le fluorophosphate de diisopropyle marqué au tritium [³ H]DFP.....	53
14.4	Inhibition avec le phosphate de diisopropyle (DP)	53
15.0	DIGESTION PEPTIDIQUE	54
15.1	Digestion avec la trypsine.....	54
15.2	Séparation des peptides	54
15.3	Mesure de la radioactivité des peptides.....	55
16.0	ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	56
16.1	Analyse de l'AxeA _{tr} en mode <i>electrospray</i>	56
16.2	Analyse des peptides de l'AxeA _{tr} en mode <i>nanoflow</i>	56
16.3	Analyse des peptides par chromatographie liquide/spectrométrie de masse	57
16.4	Analyse de la trypsine en mode <i>electrospray</i>	57
	RESULTATS	58
1.0	CONSTRUCTION DE PLASMIDE POUR LA MUTAGÈSE DIRIGÉE	59
1.1	Amplification de l' <i>axeA_{tr}</i> par PCR.....	59
1.2	Sous-clonage dans <i>E. coli</i>	59
1.3	Sélection des transformants	62

2.0	MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR PCR.....	62
2.1	Mutation des quatre codons histidines.....	62
3.0	SÉQUENÇAGE ET SOUS-CLONAGE DES GÈNES MUTÉS.....	66
3.1	Production et purification d'ADN monocaténaire à l'aide du phage M13.....	66
3.2	Analyse des séquences nucléotidiques.....	66
3.3	Sous-clonage des gènes mutés dans <i>S. lividans</i>	68
3.4	Sélection des transformants.....	68
4.0	PRODUCTION.....	71
4.1	Production en fermenteur.....	71
5.0	PURIFICATION.....	71
5.1	Purification de l'enzyme sauvage.....	71
5.2	Purification des enzymes modifiées.....	73
6.0	CARACTÉRISATION DES ENZYMES PURIFIÉES.....	76
6.1	Caractéristiques physico-chimiques.....	76
6.2	Activité spécifique des mutants.....	76
7.0	MODIFICATION CHIMIQUE DE L'AxeA _{tr}	79
7.1	Modification par le fluorure de benzyle sylfonyle (PMSF).....	79
7.2	Modification par le diisopropyl fluorophosphate (DFP).....	79
8.0	ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	83
8.1	Analyse par <i>electrospray</i>	83
8.1.1	Analyse de l'AxeA _{tr}	83
8.1.2	Analyse de l'AxeA _{tr} inhibée avec le DFP.....	88
8.2	Analyse en mode <i>nanoflow</i>	91
8.2.1	Analyse des peptides de l'AxeA _{tr}	91
8.2.2	Analyse des peptides de l'AxeA _{tr} inhibée avec le DFP.....	96
9.0	INHIBITION AU [H ³]DFP.....	96
9.1	Analyse des peptides de l'AxeA _{tr} marqués au [H ³]DFP.....	96
9.2	Analyse de l'AxeA complète inhibée au [H ³]DFP.....	104
9.3	Analyse du [H ³]DFP seul par HPLC.....	109
10.0	INHIBITION DE L'AxeA _{tr} AVEC LE PHOSPHATE DE DIISOPROPYLE (DP).....	109
11.0	INHIBITION DE LA TRYPSINE PAR LE DFP.....	113
	DISCUSSION	122
1.0	GÉNÉRATION DES GÈNES MUTANTS HISTIDINES.....	123
2.0	PRODUCTION ET PURIFICATION DES ENZYMES MUTANTES.....	124

3.0	CARACTÉRISATION DES MUTANTS PURIFIÉS.....	125
4.0	MODIFICATION CHIMIQUE.....	129
4.1	Modification par le fluorure de benzyle sulfonyle (PMSF).....	129
4.2	Modification par le fluorophosphate de diisopropyle (DFP).....	130
5.0	SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	132
6.0	INHIBITION AU [³ H]DFP.....	138
7.0	INHIBITION AU DP.....	141
8.0	INHIBITION DE LA TRYPSINE PAR LE DFP.....	142
	CONCLUSIONS	144
	REMERCIEMENTS	147
	BIBLIOGRAPHIE	148
	ANNEXES	155

LISTE DES ANNEXES

- Annexe A : Liste des produits chimiques
- Annexe B : Milieu de sporulation Bennett-thiostrepton
- Annexe C : Milieu 2XTY
- Annexe D : Milieu solide de culture Simmons-Citrate
- Annexe E : Milieu de régénération R5
- Annexe F : Milieu TSB
- Annexe G : Milieu M14
- Annexe H : Milieu H
- Annexe I : Gélose molle
- Annexe J : Spectres de masse des fragmentations d'ions peptidiques
- Annexe K : Spectres de masse des ions peptidiques issus d'une digestion de l'AxeA_r inhibée au DFP

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Structure du xylane acétylé.....	6
Figure 2:	Le lien ester	8
Figure 3:	Mécanisme d'action proposé pour les estérases).....	10
Figure 4:	Réseau de relais de charge de la triade catalytique	13
Figure 5 :	Triade catalytique de l'Axe de <i>Penicillium purpurogenum</i>	14
Figure 6:	Mécanisme d'action proposé des acétyle-xylane estérases.....	19
Figure 7:	Séquence peptidique de l'AxeA tronquée mature de <i>S. lividans</i>	24
Figure 8 :	Structure et mode de réaction du fluorophosphate de diisopropyle	25
Figure 9 :	Mutagenèse dirigée par PCR.....	37
Figure 10 :	Représentation du plasmide pIAF42.	60
Figure 11 :	Construction du plasmide pIAF834	61
Figure 12:	Analyse des produits de PCR obtenus lors de la première étape de la mutagenèse dirigée	64
Figure 13:	Analyse des produits de PCR obtenus lors de la deuxième étape de la mutagenèse dirigée.....	65
Figure 14 :	Correction de la séquence originale de l' <i>axeA</i>	67
Figure 15 :	Construction du plasmide pIAF934	69
Figure 16 :	Séparation des fragments d'ADN provenant des plasmides pIAF934 digérés par les endonucléases <i>SphI</i> et <i>SacI</i>	70
Figure 17 :	SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western de l'AxeA _r sauvage et des quatre enzymes mutantes.	75
Figure 18 :	Chromatogramme des composés générés lors de l'hydrolyse du xylane acétylé chimiquement et lors de l'hydrolyse du substrat méthyle tri- <i>O</i> -acétyle- β -D-xylopyranoside.. ..	78

Figure 19 :	Cinétique enzymatique de l'AxeA _{tr} et des mutants envers le substrat méthyle tri- <i>O</i> -acétyle-β-D-xylopyranoside.	80
Figure 20 :	Cinétique enzymatique de l'AxeA _{tr} inhibée au PMSF.....	82
Figure 21 :	Spectre de masse des valeurs m/z de l'AxeA _{tr}	84
Figure 22 :	Spectre de masse de la masse moléculaire de l'AxeA _{tr}	86
Figure 23 :	Spectre de masse de la masse moléculaire de l'AxeA _{tr} inhibée au DFP....	89
Figure 24 :	Spectre de masse des peptides de l'AxeA _{tr} digérée avec la trypsine.....	94
Figure 25 :	Spectre de masse des peptides de l'AxeA _{tr} et des peptides de l'AxeA _{tr} inhibée au DFP.....	97
Figure 26 :	Chromatogramme des peptides de l'AxeA _{tr} inhibée au [³ H]DFP et histogramme de la radioactivité des fractions recueillies.....	99
Figure 27 :	Peptides issus de la digestion de l'AxeA _{tr} inhibée au DFP et injectés au LC/MS.....	102
Figure 28 :	Chromatogramme des peptides de l'AxeA complète inhibée au [³ H]DFP et histogramme de la radioactivité des fractions recueillies.....	107
Figure 29 :	Chromatogramme du [³ H]DFP et histogramme de la radioactivité des fractions recueillies.	110
Figure 30 :	Molécule chimique du fluorophosphate de diisopropyle sous sa forme non-hydrolysée et sous sa forme hydrolysée	112
Figure 31 :	Spectre de masse de l'AxeA _{tr} inhibée avec le DP	114
Figure 32 :	Spectre de masse de la masse moléculaire de la trypsine pancréatique bovine	118
Figure 33 :	Spectre de masse de la masse moléculaire de la trypsine pancréatique bovine inhibée avec le DFP.....	121
Figure 34 :	Étapes de déacétylation proposées du substrat méthyle tri- <i>O</i> -acétyle-β-D-xylopyranoside par l'acétyle-xylane estérase de <i>S. lividans</i>	127
Figure 35 :	Schéma représentant le marquage chimique de l'AxeA _{tr} par le DFP	134

Figure 36 : Génération de fragments de type b et de type y lors des coupures de liens peptidiques au niveau de deuxième quadropole. 137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Organismes producteurs d'Axe connus et caractérisés	17
Tableau 2 :	Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR	36
Tableau 3 :	Programme d'élution de l'AxeA _r sur la colonne CM-Sépharose AP2	46
Tableau 4 :	Programme d'élution des peptides sur la colonne Nova-Pak C-18	55
Tableau 5 :	Longueurs théoriques attendues des différents produits de PCR, pour les quatre mutants histidines, lors de la première étape de la mutagenèse dirigée	63
Tableau 6 :	Détermination du pH _i de la masse cellulaire compacte humide et de la concentration des protéines du surnageant de culture de la souche sauvage	72
Tableau 7 :	Détermination du pH _i de la masse cellulaire compacte humide et de la concentration des protéines du surnageant de culture des différentes souches mutantes.	72
Tableau 8 :	Tableau de purification de la souche sauvage de l'AxeA _r	73
Tableau 9 :	Tableau de purification des mutants de l'AxeA _r	74
Tableau 10 :	Comparaison du poids moléculaire apparent, du point isoélectrique et de l'activité spécifique de l'AxeA _r et de l'AxeA complète	77
Tableau 11 :	Activités spécifiques des mutants de l'AxeA _r envers le substrat xylane acétylé	77
Tableau 12 :	Activités spécifiques des mutants de l'AxeA _r envers le substrat méthyle tri- <i>O</i> -acétyle-β-D-xylopyranoside	81
Tableau 13 :	Comparaison entre l'activité spécifique de l'AxeA _r inhibée avec le DFP avec celle de l'enzyme non-inhibée	83
Tableau 14 :	Peptides théoriques générés lors d'une digestion complète de l'AxeA _r par la trypsine	92
Tableau 15 :	Peptides théoriques générés lors de la digestion complète de l'AxeA complète par la trypsine	105
Tableau 16 :	Comparaison de l'activité spécifique de l'AxeA _r inhibée avec le DP avec celle de l'enzyme non-inhibée	113

Tableau 17 :	Comparaison de l'activité spécifique de la trypsine inhibée avec le DFP avec celle de la trypsine non-inhibée.....	117
--------------	--	-----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A	Alanine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AxeA	Acétyl-xylane estérase
AxeA _{tr}	Acétyl-xylane estérase tronquée
BCIP	Phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyle
BSA	Albumine de sérum bovin
CM	Carboxyméthyle
D	Acide aspartique
Da	Dalton (s)
DEP	Diéthyle pyrocarbonate
DFP	Fluorophosphate de diisopropyle
[³ H]DFP	Fluorophosphate de diisopropyle marqué au tritium
DMSO	Diméthyle sulfoxide
DO	Densité optique
DP	Phosphate de diisopropyle
DTT	dithiothréitol
EDC	1-éthyle-3-[3-(diméthylamino) propyle] carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines
g	Unité gravitationnelle
h	Heure
H	Histidine
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression des protéines
IgG	Immunoglobuline de type G
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
kDa	Kilo Dalton (s)
kPa	Kilo Pascal (s)
kV	Kilo Volt (s)
MBq	MégaBecquerel
min	Minute
mVh	Milli Volt (s)•heure (s)
NBT	Nitro bleu tetrazolium
NTG	N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	Paires de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEG	Polyéthylène glycol
pI	Point isoélectrique
PMSF	Fluorure de benzyle sulfonyle
p/v	poids/volume
rpm	Révolutions par minute

S	Sérine
SARIN	Méthylephosphonofluoridate d'isopropyle
SDS	Dodécyle sulfate de sodium
T _{1/2}	Temps de demi-vie
TBS	Tampon tris salin
TCA	Acide trichloroacétique
TEPP	Pyrophosphate de tétraéthyle
TFA	Acide trifluoro acétique
TRIS	Tris (hydroxyméthyle) aminométhane
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Unités
UV	Ultraviolet
V	Volt (s)
v/v	volume/volume
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolylo-β-D-galactoside

SOMMAIRE

L'acétyl-xylane estérase A (AxeA) de *Streptomyces lividans* hydrolyse spécifiquement les liens esters unissant les groupements acétyles au xylane. Malgré le fait que la spécificité d'action de l'AxeA soit connue, le mécanisme d'action de cette enzyme n'est pas élucidé. La plupart des études, menées sur des enzymes estérases, suggèrent que le mécanisme d'action de ces enzymes implique la participation de trois acides aminés (Ser/His/Asp) regroupés pour former une triade catalytique. En se basant sur ces études, il est possible d'émettre l'hypothèse que le mode d'action de l'AxeA de *S. lividans* est également basé sur une triade catalytique. L'objectif du projet de recherche est d'identifier la sérine et l'histidine catalytique de l'AxeA de *S. lividans*. De ce fait, par mutagenèse dirigée, des mutants histidines ont été produits. Ces mutants ont par la suite été exprimés et purifiés jusqu'à homogénéité. Les tests d'activité effectués sur ces mutants ont démontré une réduction de l'activité spécifique de 95% pour les mutants H62A et H155A. Dans le but de vérifier la présence d'une sérine nucléophile chez l'AxeA, cette enzyme a été modifiée chimiquement par deux différents inhibiteurs à sérine active. Les tests d'activités effectués sur l'enzyme modifiée ont montré une diminution jusqu'à 85% de l'activité spécifique de l'enzyme inhibée. Afin d'identifier la sérine nucléophile, l'AxeA modifiée chimiquement a été digérée par une endoprotéinase et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse. Aucun peptide ne présentait un ajout de masse moléculaire correspondant à l'inhibiteur. A partir de ces résultats, il n'a pas été possible d'identifier la sérine active de l'AxeA. Des hypothèses au niveau des paramètres utilisés au spectromètre de masse, de l'accès limité à la sérine catalytique et de l'état de protonation de l'enzyme ont été évoquées pour expliquer les difficultés rencontrées pour l'identification de la sérine nucléophile.

INTRODUCTION

Le xylane est un composant majeur de l'hémicellulose de plante. Le xylane est formé d'une chaîne de xylose et, chez le bois dur, ce xylose est hautement acétylé. Étant un polysaccharide complexe, la biodégradation du xylane en ses monomères nécessite la participation de plusieurs enzymes avec différentes fonctions. L'acétyl-xylane estérase (Axe) est responsable de l'hydrolyse des liens esters qui unissent les groupements acétyles au xylane.

Les Axe peuvent être d'importants outils de recherche pour diverses applications biotechnologiques, ainsi ces enzymes peuvent être utilisées comme critère de sélection pour augmenter la valeur nutritive des céréales servant à l'alimentation animale. Les Axe sont également d'importants outils de recherche pour l'étude de la structure de la paroi cellulaire des plantes. De plus, les Axe peuvent être utilisées dans les industries de pâtes et papiers. Leur utilisation dans la biodégradation du xylane augmente la solubilisation de la lignine, ce qui contribue à une réduction de la consommation de chlore dans l'étape de blanchiment de la pâte.

Malgré le fait que la spécificité d'action de l'AxeA de *Streptomyces lividans* soit connue, son mécanisme d'action reste encore obscur. Ainsi, c'est dans le but d'optimiser les applications biotechnologiques ou d'en développer de nouvelles que le mécanisme d'action de l'AxeA de *S. lividans* a été investigué. Étant donné que la structure tridimensionnelle de cette enzyme n'est pas connue, l'étude du mécanisme d'action permettra de mieux connaître le rôle spécifique et le fonctionnement de l'AxeA.

Plusieurs recherches sur le mécanisme d'action d'enzymes estérases ont été effectuées. Ces études suggèrent que le mécanisme d'action de ces enzymes est basé sur une triade catalytique impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique. En basant sur ces études, il a été suggéré que l'AxeA de *S. lividans* fasse partie de la famille des sérines estérases et, par le fait même, que son mécanisme d'action soit basé sur une triade catalytique.

Ce projet de recherche consiste donc à cibler et à identifier la sérine et l'histidine pouvant faire partie de la triade catalytique. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées. La mutagenèse dirigée a été employée pour repérer l'histidine catalytique. Cette approche a généré des mutants histidines de l'AxeA qui ont été exprimés, purifiés et caractérisés afin d'observer l'effet de la mutation sur l'activité spécifique de l'enzyme.

D'autre part, c'est une approche de modification chimique qui a été utilisée pour identifier la sérine catalytique de l'AxeA. Ainsi, cette enzyme a été modifiée chimiquement par deux différents inhibiteurs spécifiques à sérine nucléophile. Des tests d'activités spécifiques et des analyses de l'enzyme modifiée par spectrométrie de masse ont permis de vérifier s'il y avait présence d'une sérine nucléophile chez l'AxeA. Par la suite, les peptides générés par une digestion de l'AxeA modifiée ont été analysés par spectrométrie de masse dans le but d'identifier la sérine nucléophile.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 LE XYLANE

1.1 Composition

Après la cellulose, le xylane est le polysaccharide le plus abondant dans la nature (Christov et Prior, 1993). C'est le composant majeur de l'hémicellulose de plante. La composition et la structure du xylane sont plus complexes que celles de la cellulose et peuvent varier quantitativement et qualitativement selon les espèces de plantes. Le xylane est formé d'une chaîne principale de xyloses liés entre eux par des liens β -1,4. Le xylose peut être substitué et les substituants les plus fréquents du xylane sont les acétyles dans le bois dur et les arabinosyles dans le bois mou. En effet, le xylane provenant du bois dur est hautement acétylé : 60% à 70% des résidus xyloses sont estérifiés au groupement hydroxyle des carbones 2 ou 3 ou à ces deux positions dans un ratio de 24 : 22 : 10 (figure 1) (Lindberg *et al.*, 1973). On retrouve également comme substituant des groupements 4-*O*-méthylglucuronosyles et ce, dans le cas du bois dur comme dans le cas du bois mou. Selon son origine, le xylane peut contenir un nombre variable de groupements arabinosyles, d'acide 4-*O*-méthylglucuronosyles et de groupements acétyles (Puls *et al.*, 1991).

1.2 Biodégradation

Chez les plantes, le xylane forme l'interface entre la lignine et la cellulose et est lié de façon covalente à la lignine par ses résidus arabinosyles et méthylglucuronosyles. Ainsi, l'hydrolyse du xylane en ses monomères nécessite la participation de plusieurs enzymes avec différentes fonctions. Ces enzymes sont classifiées en deux groupes basés sur la nature des liens qu'ils hydrolysent. Le premier groupe d'enzymes est celui des glycosyles hydrolases (EC 3.2.1.X), qui sont impliquées dans l'hydrolyse des liens glycosidiques du xylane. Ce groupe comprend les endo-xylanases (EC 3.2.1.8) qui dissocient la chaîne du xylane en plus petits oligosaccharides (xylobiose et xylotriose), les β -xylosidases (EC 3.2.1.37), qui hydrolysent les xylooligosaccharides à leur extrémités

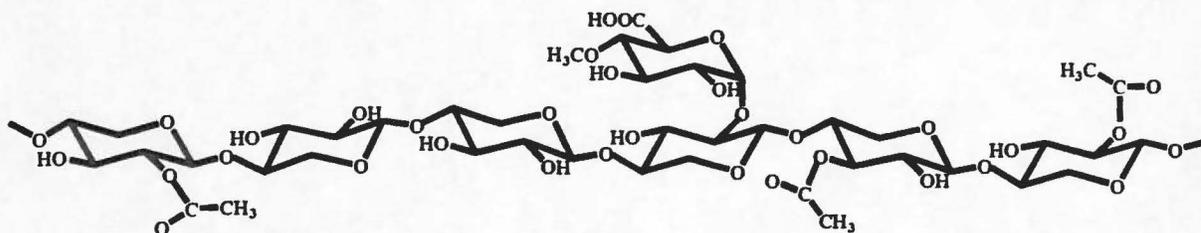


Figure 1 : Structure du xylane acétylé

non-réductrices, les α -L arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) et les α -glucuronidases (3.2.1.1), qui hydrolysent respectivement les substituants arabinoses et acide 4-O-méthylglucuroniques de la chaîne de xylane. Le second groupe inclut des enzymes estérases (3.1.1.X), qui hydrolysent les liens esters situés entre les unités xyloses et l'acide acétique ou entre les résidus d'arabinose et les acides phénoliques tels l'acide ferrulique et l'acide *p*-coumarique (Christov et Prior, 1993).

Un effet synergique appréciable est produit lorsque le substrat acétylé est traité avec la xylanase et l'acétyl-xylane estérase. Cet effet est noté lorsque l'activité des enzymes combinées est supérieure à la somme calculée des activités individuelles (Ross *et al.*, 1992). Une étude menée par Biely *et al.*, (1986) montre l'effet synergique créé lors d'une combinaison des enzymes xylanases et acétyl-xylane estérases de *Schizophillum commune*. Les résultats obtenus par ces chercheurs montrent que l'hydrolyse du xylane acétylé par la xylanase et l'acétyl-xylane estérase de *S. commune* résulte en la formation de plus petits oligosaccharides tels le xylose, le xylobiose et le xylotriose. Toutefois, lorsque le xylane acétylé est traité uniquement avec la xylanase, seul du xylose peut être détecté et ce, en faible quantité. Ainsi, l'action synergique des estérases et des xylanases dans l'hydrolyse du xylane acétylé, résulte en un relâchement initial de l'acide acétique par les estérases, ce qui contribue à l'augmentation du nombre de site de liaison sur la chaîne de polysaccharides, pour l'action de la xylanase.

Cet effet synergique a également été observé par Dupont *et al.*, (1996), qui montre que le xylane acétylé est pleinement hydrolysé en plus petits oligosaccharides par les xylanases A (XlnA) et B (XlnB) de *Streptomyces lividans* seulement lorsque le substrat a été traité préalablement avec l'acétyl-xylane estérase A (AxeA) de *S. lividans*. Ainsi, les endo-xylanases et les β -xylosidases sont les enzymes primaires impliquées dans la dissociation du xylane, mais la dégradation complète du xylane requiert une action synergique d'enzymes additionnelles pour détacher les substituants (Christov et Prior, 1993).

2.0 LES ESTÉRASES

2.1 Généralités

Les estérases sont des enzymes qui hydrolysent des liens esters. Les esters sont des classes de composés qui comportent trois liaisons carbone-oxygène. Ces composés sont des dérivés des acides carboxyliques où l'hydrogène du groupement hydroxyle est remplacé par un groupement carboné (figure 2). Les estérases font partie de la famille des hydrolases et peuvent donc hydrolyser plusieurs liens esters, dont les esters carboxyliques.

2.2 Mécanisme d'action

Plusieurs recherches sur le mécanisme d'action des enzymes estérases ont été effectuées. La plupart des études suggèrent que le mécanisme d'action implique la participation de trois acides aminés soit une sérine, une histidine et un acide aspartique retrouvés au niveau d'une triade catalytique (Wang *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 1992; Whittaker *et al.*, 1994). Même si ces trois acides aminés sont distancés dans la séquence primaire d'acides aminés, ils sont maintenus très près les uns des autres lors du

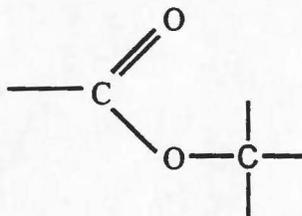


Figure 2 : Le lien ester

repliement de la molécule. La mise en place de cette orientation entraîne une élévation de la vitesse de la réaction par un effet de proximité (Whittaker *et al.*, 1994).

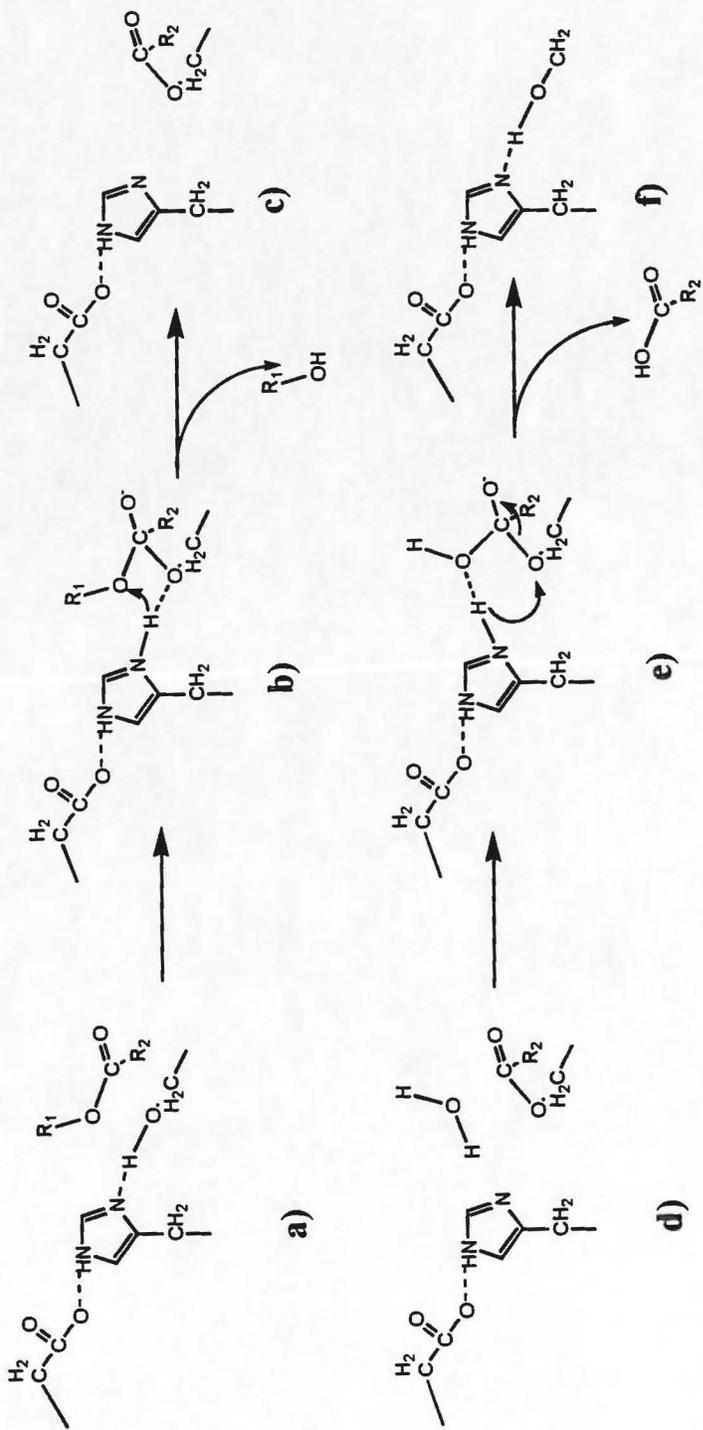
Ce mécanisme d'action impliquant une triade catalytique a été suggéré pour une cutinase produite par *Fusarium solani* (Koller et Kolattukudy, 1982). La cutinase (3.1.1.X) est une enzyme estérase extracellulaire sécrétée par des champignons phytopathogènes et qui catalyse l'hydrolyse de la chitine, un polyester recouvrant la surface des plantes. Les études effectuées sur cette cutinase montrent que la modification chimique de cette enzyme par le fluorophosphate de diisopropyle (DFP), qui est un inhibiteur spécifique à sérine nucléophile, engendre une perte d'activité estérasique de 98%. De même, la modification chimique par le pyrocarbonate de diéthyle (DEP), qui est un inhibiteur se liant aux histidines, en présence de dodécyle sulfate de sodium (SDS), cause une perte importante de l'activité estérasique de l'enzyme. Finalement, un carbodiimide soluble dans l'eau tel le 1-éthyle-3-[3-(diméthylamino) propyle] carbodiimide (EDC) a été utilisé pour modifier les groupements carboxyliques des protéines. Ainsi, une modification d'environ 4 groupements carboxyliques essentiels à l'activité enzymatique par molécule de cutinase a entraîné une perte de 60% de l'activité estérasique de l'enzyme. Suite à ces résultats, il a été suggéré que le mécanisme d'action

de cette cutinase soit basé sur une triade catalytique impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique.

D'autre part, le mécanisme d'action d'une lysophospholipase (3.1.1.5) provenant d'un macrophage de souris a été étudié (Wang *et al.*, 1997). Un alignement de séquence des acides aminés de la lysophospholipase avec d'autres enzymes estérases a permis d'identifier les acides aminés potentiels pouvant faire partie d'une triade catalytique. De ce fait, une séquence consensus G-X-S-X-G, indicatrice de la présence d'une sérine catalytique, a été identifiée chez la lysophospholipase. La sérine de cette séquence consensus (Ser 119) était donc susceptible d'être un composant de la triade catalytique. De plus, la comparaison de la séquence en acides aminés de la lysophospholipase, avec d'autres estérases, a permis de repérer une histidine (H208) et un acide aspartique (Asp 174) qui étaient conservés à travers plusieurs estérases. Afin de vérifier si ces acides aminés étaient des composants de la triade catalytique, chacun de ces acides aminés a été muté individuellement, par mutagenèse dirigée, pour une alanine. Les tests enzymatiques révèlent une perte de l'activité estérasique de 100% de ces mutants. À partir de ces résultats, il a été proposé que le mécanisme d'action de cette lysophospholipase soit basé sur une triade catalytique.

En se basant sur les études menées sur plusieurs enzymes estérases, il a été possible de suggérer un mécanisme d'action pour ces enzymes. Ce mécanisme d'action est illustré à la figure 3. La liaison entre le substrat estérifié et l'enzyme estérase s'effectue de telle sorte que le lien ester du substrat se retrouve à proximité du groupement hydroxyle de la sérine (3a). À ce stade, la sérine perd son proton qui est fortement attiré par un lien hydrogène à un atome d'azote qui faisant partie du groupement imidazole de l'histidine (3b). Par la suite, il y a une réaction de transestérification. Ainsi, l'oxygène de la sérine de l'estérase forme un lien ester avec le groupement acyle du carbone du substrat, ce qui cause en même temps un clivage du lien ester original du substrat (3c). Le premier produit formé quitte le site actif de l'enzyme avec le proton de l'histidine (formation d'un alcool). L'intermédiaire nouvellement formé est très instable, ce qui favorise l'hydrolyse avec une molécule d'eau (3d). La réaction génère un second

Figure 3: Mécanisme d'action proposé pour les estérases (tiré de Whittaker *et al.*, 1994)



génère un second produit soit, la portion carboxylique du substrat (3e). Cette hydrolyse permet également la restauration du proton sur le groupement hydroxyle de la sérine (3f) (Whittaker *et al.*, 1994). Ainsi, au cours du mécanisme d'action, la sérine qui est un acide aminé nucléophile, joue un rôle de stabilisation du substrat en formant un lien ester avec ce dernier. Le groupement imidazole de l'histidine et le groupement carboxylique de l'acide aspartique participent pour leur part, aux mouvements d'association de proton (Wang *et al.*, 1997).

2.3 Les sérines estérases

Les sérines estérases sont des enzymes qui sont caractérisées par la présence d'une seule sérine nucléophile. Cette sérine nucléophile a la capacité de former un lien ester covalent avec le groupement acyle du carbone du substrat pour former un intermédiaire acyle-enzyme. Ces enzymes peuvent contenir plusieurs résidus sérines mais une seule sera impliquée dans l'hydrolyse du substrat. Cette affinité singulière de la sérine-nucléophile provient de la conformation particulière du site actif de l'enzyme. L'étude chimique de ce site actif a permis de repérer deux autres acides aminés impliqués dans le mécanisme d'action de ces enzymes, soit une histidine et un acide aspartique. La configuration de ces trois résidus est orientée et stabilisée par une série de liaisons bordant le site actif de l'enzyme. Comme l'indique la figure 4, le groupe imidazole de l'histidine attire un proton du groupe hydroxyle de la sérine et fait de celle-ci un nucléophile puissant. Le groupe carboxylate de l'acide aspartique forme une liaison hydrogène avec l'histidine et stabilise l'état de transition. Ainsi, la configuration de ces trois acides aminés garantit la fonction d'un réseau de relais de charge. Par ce réseau, l'ion carboxylate de l'acide aspartique stabiliserait l'histidine, protonée par captation du proton de la sérine. Ce réseau de relais de charge concourt à augmenter de beaucoup le caractère nucléophile de la sérine dont dépend l'activité catalytique.

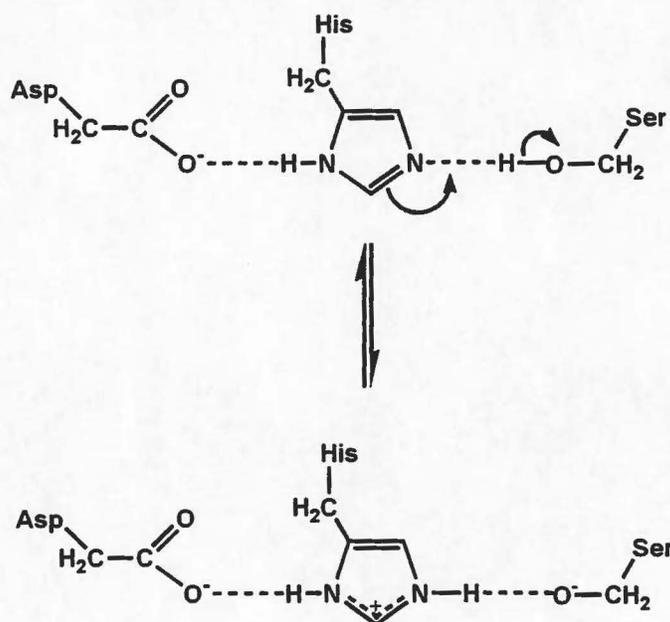


Figure 4: Réseau de relais de charge de la triade catalytique

La configuration des acides aminés impliqués dans la triade catalytique de l'acétyl-xylane estérase de *Penicillium purpurogenum* est présentée à la figure 5. Comme l'indique cette figure, les trois résidus catalytiques soit la sérine 90, l'histidine 187 et l'acide aspartique 175 impliqués dans la triade catalytique sont maintenus très près les uns des autres afin d'assurer, par un effet de proximité, un réseau de relais de charge.

Chez plusieurs sérines estérases, les acides aminés adjacents à la sérine nucléophile forment une séquence consensus G-(Y/H)-S-X-G. La sérine impliquée dans la triade catalytique peut être aisément identifiée par cette séquence (Brady *et al.*, 1990). Toutefois, les acides aminés adjacents à l'acide aspartique et à l'histidine sont beaucoup moins conservés.



Figure 5 : Triade catalytique de l'Axe de *Penicillium purpurogenum* (Ghosh *et al.*, 1998)

3.0 LES ACÉTYLE-XYLANE ESTÉRASES

3.1 Classification

Selon la classification d'enzyme basée la spécificité de substrat, les Axe portent le # EC (Enzyme Commission) 3.1.1.72. D'après cette classification, il est possible de déduire que ces enzymes sont des hydrolases (3.-.-), qui hydrolysent principalement les liens esters (3.1.-) et qui agissent plus spécifiquement sur les esters carboxyliques (3.1.1.-). Il existe plusieurs enzymes agissant sur les esters carboxyliques et les Axe font partie de la 72^e classe répertoriée.

Également, selon la classification basée sur la similarité des séquences des acides aminés (Coutinho et Henrissat, 1999) les Axe font partie de 7 familles (famille N° 1-2-3-4-5-6-7) des estérases carbohydrates et possèdent donc des similarités de séquence avec certaines xylanases, acétyle estérases, chitine déacétylases, chitooligosaccharide déacétylases et cutinases.

3.2 Applications

Les Axe, impliquées dans la dégradation du xylane, peuvent être d'importants outils de recherche dans l'étude et le mécanisme de la paroi cellulaire des plantes. La nature des liens covalents entre la lignine et les polymères de carbohydrates dans la paroi cellulaire de plusieurs plantes est à déterminer et nécessite plusieurs investigations. (Christov et Prior, 1993). De plus, le xylane acétylé est faiblement digéré par les enzymes du rumen des ruminants et inhibe aussi l'action des cellulases et des hémicellulases, selon le degré d'acétylation (Bacon *et al.*, 1975). Les Axe peuvent donc être utilisées comme critère de sélection chez la plante, pour la production de nourriture animale avec une amélioration de la digestion.

Les Axe peuvent aussi être utilisées dans les industries des pâtes et papiers. Elles peuvent contribuer à la solubilisation de la lignine en coupant les liens esters entre les substituants d'acides acétiques et les unités xyloses (Magnuson et Crawford, 1992; Christov et Prior, 1993). Lorsqu'elles sont utilisées avec la xylanase et d'autres enzymes qui dégradent le xylane dans le bio-blanchiment des pâtes et papier, les Axe peuvent partiellement rompre la structure de la paroi cellulaire végétale. Par conséquent, le complexe lignine-carbohydrate est plus susceptible à l'attaque enzymatique, et les produits de dégradation sont plus solubles et se diffusent plus facilement. L'augmentation de l'extraction de la lignine peut avoir comme résultat une réduction de la consommation de chlore dans l'étape de blanchiment. De plus, les acétyl-xylane estérases, combinées avec les xylanases et les cellulases, peuvent être appliquées dans la bioconversion des déchets de lignocellulose en sucres fermentables servant à la production de divers produits chimiques et essences. De même, la fonction des estérases est généralement réversible ainsi, le mécanisme d'estérification peut être exploité.

3.3 Mécanisme d'action

Plusieurs Axe ont été caractérisées (tableau 1) mais la plupart de ces recherches se sont limitées à la purification et à la caractérisation primaire des enzymes. Toutefois, le mécanisme d'action de l'Axe de *Trichoderma reesei* a été investigué et il a été suggéré que cette enzyme fasse partie de la famille des sérines estérases (Margolles-Clarke *et al.*, 1996). En effet, une comparaison de l'Axe de *T. reesei* avec des cutinases de champignons a démontré une homologie de séquences des acides aminés catalytiques (Ser-His-Asp). Plus spécifiquement, une séquence consensus G-(Y/H)-S-X-G a été notée dans la séquence primaire de l'Axe de *T. reesei* ce qui indique la présence d'une sérine nucléophile. De ce fait, l'Axe de *T. reesei* a été inactivée avec 5mM de fluorure de phénylméthyle sulfonyle (PMSF), qui est un inhibiteur spécifique à la sérine nucléophile. Cette inactivation a provoqué une perte de 98% de l'activité estérasique de l'enzyme. Ceci indique que le mode d'action de l'Axe de *T. reesei* fait probablement appel à une triade catalytique impliquant une sérine nucléophile. Toutefois, la séquence en acides

Tableau 1 : Organismes producteurs d'Axe connues et caractérisées

Microorganismes	
Champignons	<i>Aspergillus aculeatus</i> (Christgau <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Aspergillus niger</i> (Kormelink <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Orpinomyces</i> famille PC-2 (Blum <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Penicillium purpurogenum</i> (Egana <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Schizophyllum commune</i> (Halgasova <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Trichoderma reesei</i> (Margolles-Clarke <i>et al.</i> , 1996)
Bactéries	<i>Bacillus pumilus</i> PS213 (Degrassi <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Caldocellum saccharolyticum</i> (Lüthi <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 (Mc Dermid <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ferreira <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Streptomyces lividans</i> (Dupont <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Streptomyces rubiginosus</i> (Keller, 1992)
	<i>Thermoanaerobacterium</i> JW/SL YS485 (Shao et Wiegel, 1995)

aminés de l'Axe de *T. reesei* ne montre aucune similarité avec les Axe produites par *C. saccharolyticum*, *P. fluorescens*, *A. niger*, *A. aculeatus* et *S. lividans* (Margolles-Clarke *et al.*, 1996). Il existe une grande diversité de liens esters dans la nature qui sont hydrolysés par différentes estérases. Ceci pourrait expliquer les variabilités observées entre les différentes Axe qui peuvent provenir d'une évolution convergente.

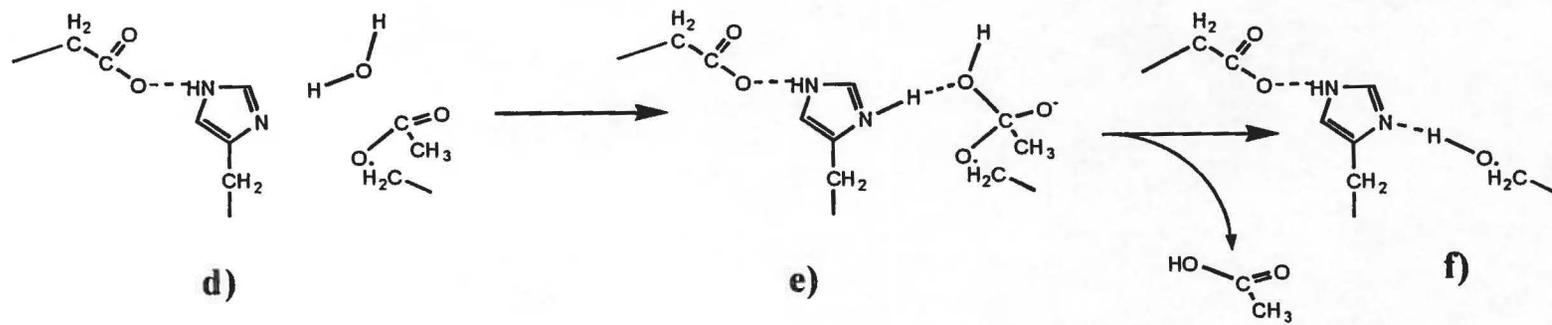
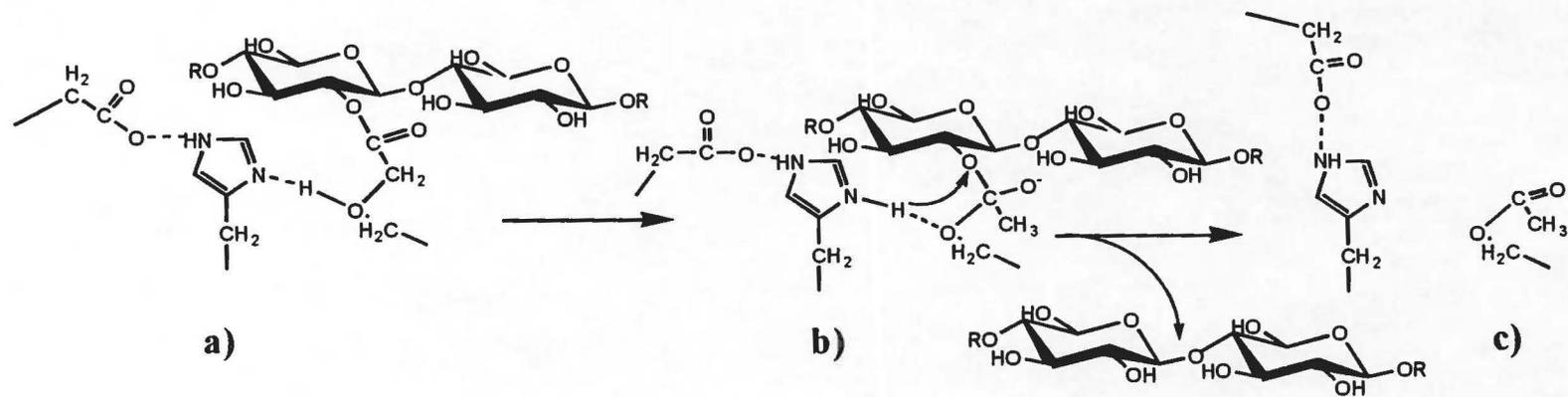
Mise à part les études réalisées sur l'Axe de *T. reesei*, peu de recherches ont été effectuées au sujet du mécanisme d'action des Axe des autres organismes. Cependant, en se basant sur le mécanisme d'action des estérases, il est possible de proposer le mode d'action des Axe impliquant également une triade catalytique (figure 6). Les interactions chimiques impliquées sont les mêmes que celles retrouvées pour le mécanisme d'action des estérases décrit précédemment. Toutefois, les composés formés diffèrent. Ainsi, le substrat de départ utilisé est le xylane qui est substitué par un groupement acétyle (6a). Lors de la réaction de transestérification (6b,c), le premier produit formé est un sucre (xylane), dont le groupement acétyle a été remplacé par un proton. Il y a par la suite une réaction d'hydrolyse, impliquant une molécule d'eau, ce qui résulte à la formation d'un intermédiaire transitoire instable (6d). Il s'ensuit une libération d'un second produit qui est dans ce cas, l'acide acétique (6e,f).

4.0 ACÉTYLE-XYLANE ESTÉRASE A DE *STREPTOMYCES LIVIDANS* (AXEA)

4.1 Caractéristiques

L'analyse de l'ADN de la région correspondant à l'AxeA de *S. lividans* révèle que la séquence de nucléotides est localisée en aval de la xylanase B (*xlnB*) (Shareck *et al.*, 1995). Ainsi, les gènes de l'*axeA* et de la *xlnB* de *S. lividans* sont organisés en opéron. La séquence d'acides aminés de l'AxeA indique que l'enzyme est constituée d'un domaine catalytique (N-terminal) et d'un domaine de liaison au substrat (C-terminal) séparés par une région riche en glycine. Le domaine de liaison au substrat de l'AxeA montre un haut degré de similarité (89,5%) avec le domaine correspondant de la

Figure 6: Mécanisme d'action proposé des acétyl-xylane estérases



xylanase B (XlnB) de *S. lividans*. De plus, ces deux domaines sont localisés dans la région 3' du gène qui compte pour 30% de la protéine (Shareck *et al.*, 1995). Cette grande homologie de la région 3' de la *xlnB* et de l'*axeA* indique une duplication génétique évidente. Le domaine de liaison de l'AxeA est spécifique au substrat xylane et ne possède pas d'affinité pour la cellulose (Dupont *et al.*, 1996). Ainsi, l'AxeA comporte un véritable domaine de liaison spécifique au xylane.

4.2 Classification

Selon la classification basée sur la similarité des séquences des acide aminés, l'AxeA de *S. lividans* fait partie de la famille 4 des estérases carbohydrates (Coutinho et Henrissat, 1999) et présente une certaine homologie de séquence avec une seule autre acétyl-xylane estérase soit, l'Axe STX-III de *Streptomyces thermoviolaceus* (Tsujiho *et al.*, 1997). De même, une homologie de la région N-terminale de l'AxeA de *S. lividans* a été trouvée avec les domaines NodB retrouvés chez les xylanases A, D et E produites respectivement par *Cellvibrio mixtus* (Hazlewood et Gilbert, 1993), *Cellulomonas fimi* (Millward-Sadler *et al.*, 1994) et *Pseudomonas fluorescens* (Millward-Sadler *et al.*, 1995). Également, il existe une similarité de séquence de l'AxeA de *S. lividans* avec la xylanase A produite par *Ruminococcus albus* (Nagamine *et al.*, 1995) et avec la xylanase A ou U produite par *Clostridium thermocellum* (Hayashi *et al.*, 1998). Finalement, une homologie significative a été trouvée avec la protéine NodB, produite par *Rhizobium meliloti* (Egelhoff *et al.*, 1985), et avec la chitine désacétylase (Cda), produite par *Mucor rouxii* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993a). Plus spécifiquement, NodB est impliquée dans la biosynthèse des facteurs de nodulation des racines, et déacétyle le résidu N-acétylglucosamine d'un chitooligosaccharide avant son attachement à un acide gras (John *et al.*, 1993). La Cda est impliquée, avec la chitine synthase, dans l'hydrolyse du groupement N-acétamide des chitotétraoses (Kafetzopoulos *et al.*, 1993b). NodB et CDA sont donc des enzymes métaboliques impliquées dans la libération de groupements acétyles.

4.3 Spécificité d'action

Des études menées par Biely *et al.*, (1996) montrent que l'AxeA catalyse la déacétylation des substrats 2,3,4-tri-*O*-acétyl-Me- β -D-xylopyranosides et 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-Me- β -D-glucopyranoside aux positions 2 et 3, ce qui suggère que l'AxeA hydrolyse spécifiquement les liens esters des groupements acétyles des positions 2 et/ou 3 du xylose présent chez le xylane. De plus, lorsque des substrats méthyle xylopyranoside diacétates, contenant un groupement hydroxyle à la position 2 ou 3, sont utilisés (tels les 2,4-di-*O*-Ac-Me- β -Xylp et 3,4-di-*O*-Ac-Me- β -Xylp) la déacétylation est de une à deux fois plus rapide que lorsque le substrat utilisé est acétylé aux positions 2 et 3 (tels les 2,3,4-tri-*O*-Ac- β -D-Xylp et 2,3-di-*O*-Ac- β -D-Xylp). De plus, selon Biely *et al.*, (1996) il semble que l'AxeA de *S. lividans* en plus de posséder une fonction de déacétylation, aurait également la capacité de catalyser le déplacement d'un groupement acétyle entre les positions 2 et 3 du substrat xylopyranoside.

Ces chercheurs ont également démontré que l'AxeA de *S. lividans* est très spécifique à son substrat, puisque cette enzyme ne montre pas d'activité sur les esters des molécules qui ne sont pas des carbohydrates. Ainsi, l'AxeA de *S. lividans* est plus spécifique pour la déacétylation des carbohydrates et plus particulièrement pour le xylane acétylé.

4.4 Mécanisme d'action proposé de l'AxeA de *S. lividans*

Un alignement de séquence des acides aminés de la structure primaire de l'AxeA de *S. lividans* avec d'autres enzymes à sérines estérases, n'a pas permis de repérer des acides aminés consensus pouvant faire partie de la triade catalytique. De même, la structure tridimensionnelle de l'AxeA de *S. lividans* n'a pas été résolue. De ces faits, il n'a pas été possible de visualiser les résidus catalytiques de l'enzyme. Toutefois, en se référant au mode d'action des estérases et à celui proposé des Axe, il a été émis comme hypothèse que le mode d'action de l'AxeA de *S. lividans* est également basé sur une triade catalytique.

4.5 L'acétyl-xylane estérase tronquée (AxeA_{tr}) de *S. lividans*.

Étant donné que la région N-terminale de l'AxeA constitue le domaine catalytique de l'enzyme, une forme tronquée de l'enzyme (AxeA_{tr}) a été construite. L'AxeA_{tr} est une enzyme extracellulaire catalytiquement active, dont la forme sécrétée comporte une masse moléculaire de 20 597 Da. Suite au clivage du peptide signal, l'AxeA_{tr} de *S. lividans* compte 14 sérines, 4 histidines et 10 acides aspartiques (figure 7).

5.0 TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS CATALYTIQUES

5.1 Sérine estérase

La section 2.3 de la revue bibliographique mentionne que la sérine de la triade catalytique peut être identifiée si elle fait partie de la séquence G-(Y/H)-S-X-G. Or, chez l'AxeA de *S. lividans* cette séquence consensus n'est pas retrouvée. Cependant, il est possible de faire appel à des techniques de modifications chimiques afin de cibler la sérine active. De ce fait, des inhibiteurs de sérines actives peuvent être employés.

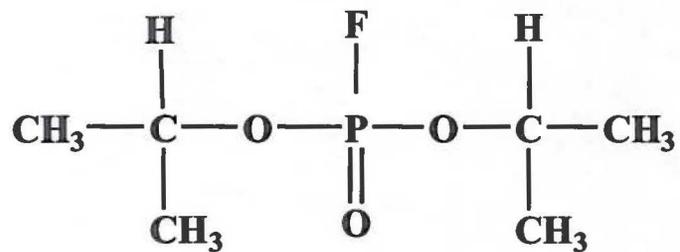
Plusieurs inhibiteurs sont utilisés commercialement dont le PMSF, le pyrophosphate de tétraéthyle (TEPP) et le méthylephosphonofluoridate d'isopropyle (Sarin). Le fluorophosphate de diisopropyle (DFP) est toutefois l'inhibiteur le plus utilisé. La réaction qui se produit entre le DFP et une enzyme comportant une sérine active est illustrée à la figure 8. Le marquage chimique du DFP est dû au déplacement du fluore du DFP par le groupe hydroxyle nucléophile de la sérine, ce qui inactive l'enzyme. À cause de l'organisation spatiale des résidus catalytiques des enzymes à sérines actives, le marquage chimique au DFP s'effectue de sorte que c'est uniquement la sérine nucléophile qui réagit avec l'inhibiteur (Cohen *et al.*, 1967).

1 A A C N G Y V G L T F D D G P S G S
 19 T Q S L L N A L R Q N G L R A T M F
 37 N Q G Q Y A A Q N P S L V R A Q V D
 55 A G M W V A N H S Y T H P H M T Q L
 73 G Q A Q M D S E I S R T Q Q A I A G
 91 A G G G T P K L F R P P Y G E T N A
 109 T L R S V E A K Y G L T E V I W D V
 127 D S Q D W N N A S T D A I V Q A V S
 145 R L G N G Q V I L M H D W P A N T L
 163 A A I P R I A Q T L A G K G L C S G
 181 M I S P Q T G R A V A P D G S

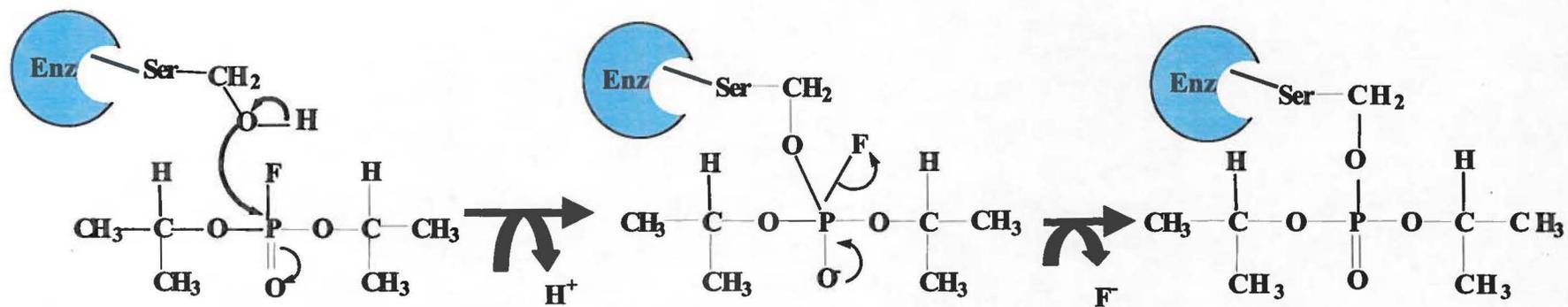
Figure 7: Séquence peptidique de l'AxeA tronquée mature de *S. lividans*. Les sérines, histidines et acides aspartiques sont indiqués en bleues, rouges et verts respectivement.

Figure 8 : a) Structure et b) mode de réaction du fluorophosphate de diisopropyle avec une enzyme à sérine active

a)



b)



Cette méthode de modification chimique par le DFP a été employée par Sakai *et al.*, (1998) afin de vérifier la présence d'une sérine nucléophile chez une estérase provenant de *Pseudomonas vesicularis*. Lorsque cette estérase a été utilisée avec le DFP, une importante inhibition de l'activité enzymatique a été observée, ce qui suggère que l'enzyme étudiée est une sérine estérase.

Il est également possible d'identifier la sérine nucléophile d'une estérase en utilisant du DFP marqué radioactivement. Cette méthode a été employée par Chevallier *et al.*, (1992) pour identifier la sérine estérase d'une prolyle endopeptidase de l'espèce *Flavobacterium meningosepticum*. Suite au marquage chimique de la prolyle endopeptidase avec du [³H]DFP suivi d'une digestion peptidique, un seul peptide présentait de la radioactivité. Après la purification et le séquençage de ce peptide, la sérine située à la position 536 a pu être identifiée comme étant la sérine active de l'enzyme.

5.2 Histidine

Les acides aminés adjacents à l'histidine de la triade catalytique ne présentent pas de séquences homologues. Ainsi, pour identifier l'histidine impliquée dans le mécanisme d'action de l'enzyme, la mutagenèse dirigée peut être employée. Par cette technique, le codon histidine de la séquence de nucléotides est changé pour un autre codon codant pour un autre acide aminé. Le nouvel acide aminé qui remplace l'histidine doit être neutre et non-polaire afin de ne pas introduire un élément chargé à l'enzyme et de ne pas créer un encombrement stérique.

Cette technique a été employée par (Wang *et al.*, 1997) afin d'identifier l'histidine de la triade catalytique d'une lysophospholipase provenant d'un macrophage de souris. Par mutagenèse dirigée, deux histidines soit l'histidine 28 et l'histidine 208 ont été mutées individuellement pour une alanine. Les tests d'activité effectués sur les mutants ont démontré que seul le mutant H208A présentait une perte totale de l'activité

enzymatique. Il a donc été suggéré par ces auteurs que l'histidine 208 de cette lysophospholipase faisait partie de la triade catalytique de l'enzyme.

Les histidines peuvent également être modifiées chimiquement en utilisant comme inhibiteur le pyrocarbonate de diéthyle (DEP). Toutefois, il a été démontré que le DEP pouvait se lier à des histidines autres que celle impliquée dans la triade catalytique. Également, il a été rapporté que le DEP pouvait se lier à d'autres groupements fonctionnels tels ceux des tyrosines, lysines, cystéines, sérines et arginines (Miles, 1977). Cette technique de modification chimique des histidines par le DEP a été utilisée par Ghazaleh *et al.*, (1996) qui ont démontré, chez une phosphodiesterase retrouvée dans les plaquettes sanguines, la présence de résidus histidines essentiels puisque l'enzyme était inactivée en présence de DEP. Toutefois, cette inhibition n'était pas spécifique à une seule histidine.

6.0 OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les objectifs de ce projet étaient de vérifier si le mécanisme d'action de l'AxeA_{tr} de *S. lividans* est basé sur une triade catalytique impliquant une sérine, une histidine et une acide aspartique. Plus précisément, il s'agissait de déterminer quelle sérine et quelle histidine font partie de la triade catalytique. Pour identifier l'histidine catalytique, il s'agissait donc, par mutagenèse dirigée, de muter individuellement les codons histidine. Par la suite, il s'agissait de produire les mutants, de les purifier et de tester leur activité enzymatique. En ce qui a trait à la détermination de la sérine nucléophile, c'est une méthode de modification chimique par des inhibiteurs spécifiques à sérine nucléophile qui a été employée. Il s'agissait donc de modifier chimiquement l'enzyme pour ensuite effectuer des tests d'activité spécifique ainsi que des analyses par spectrométrie de masse.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1.0 PRODUITS CHIMIQUES

Les produits utilisés dans ce travail sont de qualité égale ou supérieure aux normes de "l'American Chemical Society". La liste exhaustive est présentée à l'annexe A.

2.0 SOUCHES BACTÉRIENNES

2.1 *Streptomyces lividans*

La souche hôte mutante 10-164 (Mondou *et al.*, 1986) a été utilisée pour la surproduction de l'acétyl-xylane estérase. Cette souche mutante, qui ne présente pas d'activité xylanase et cellulase, a été produite par mutagenèse de la souche sauvage avec le *N*-méthyle-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG). Cet agent mutagène a provoqué une mutation dans le gène *msiK* et ce, dans le site responsable de la liaison de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP par MsiK attribue l'énergie nécessaire au système de transport des di et tri-saccharides. Ainsi, pour la souche 10-164, le système de transport des sucres est aboli, ce qui empêche l'induction et la production des xylanases et cellulases. Étant donné que l'acétyl-xylane estérase A est située sur le même opéron que la xylanase B (Shareck *et al.*, 1995) l'induction de l'expression du gène *axeA* est altérée.

La souche IAF934 est utilisée comme souche hôte pour la production d'acétyl-xylane estérase. Cette souche provient de la transformation de la souche 10-164 avec le plasmide pIAF934 contenant le gène de l'acétyl-xylane estérase tronqué.

2.2 *Escherichia coli*

La souche DH11S dont le génotype est $F^- mcrA \Delta(mrr hsdRMS mcrBC) \Delta(lac-proAB) \Delta(recA1398) deoR supE rpsL srl thi/F' proAB^+ lacI^qZ\Delta M15$ (Gibco BRL catalogue #18307-017 p.18-9) est utilisée comme hôte du phage M13 pour la production d'ADN simple brin servant au séquençage des gènes.

3.0 VECTEURS D'EXPRESSION

3.1 *S. lividans*

Chez *S. lividans*, pIJ702 est le plasmide utilisé pour le sous-clonage des acétylxylane estérases. Ce plasmide est présent en multicopies (40 à 300) par cellule (Gusek et Kinsella 1992). pIJ702 contient un gène de résistance à l'antibiotique thiostreptone ce qui permet la sélection des transformants (tsr+). De plus, ce plasmide contient le gène de la tyrosinase (*mel*) qui, de part son activité catalytique, induit la formation de mélanine (Katz *et al.*, 1983). La région régulatrice du gène *mel* comporte 3 sites de restriction unique. Ainsi, l'insertion d'un gène dans la région régulatrice permet la reconnaissance des plasmides recombinants puisqu'il y a inhibition du phénotype mélanine (Gusek et Kinsella 1992). Le promoteur du plasmide pIJ702 a été changé pour le promoteur fort c109 qui n'est pas répressé par le glucose (François Shareck, communications personnelles).

3.2 *E. coli*

Le plasmide pIAF834 est utilisé pour effectuer la mutagenèse dirigée par PCR. Ce plasmide provient de l'insertion d'un fragment *SphI-SacI* de 711 pb, correspondant à l'*axeA_r*, dans le phagemide pTZ19U. Le phagemide pTZ19U contient une origine de répllication chez *E. coli*, le promoteur de la polymérase T7, le gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline, l'opérateur et le promoteur du gène de la β -lactamase ainsi qu'un site de multiclonage.

Des sous-clonages ont également été réalisés dans les phages M13mp18 et M13mp19, afin d'obtenir de l'ADN simple brin qui sera utilisé pour le séquençage (Messing *et al.*, 1981).

4.0 CONSERVATION DES SOUCHES

4.1 *S. lividans*

Les souches de *S. lividans* sont lyophilisées afin d'être conservées. La méthode de conservation consiste à faire pousser une culture sur un milieu Bennett-thio solide (annexe B) et à en récolter les spores. Les spores sont ensuite suspendues dans une solution de lait écrémé 10% (v/v) et lyophilisées dans des ampoules de verre qui sont scellées sous vide à la flamme. Les souches sont ensuite entreposées à 4°C.

A court terme, les souches de *S. lividans* peuvent être conservées sur des plats de Pétri constitués de milieu Bennett-thio solide (banque). Cette banque peut-être utilisée dans les 7 jours suivants pour ensemercer les souches de *S. lividans* sur d'autres plats de Pétri. Les géloses sont incubées à 34°C pendant 7 jours.

4.2 *E. coli*

Les cultures de *E. coli* peuvent être lyophilisées dans une solution de lait écrémé 10% (v/v). De même, suite à une culture liquide de 24 heures en milieu 2XTY (annexe C) les cellules peuvent être récupérées par centrifugation et conservées dans une solution de glycérol 20% (v/v) à -70°C. Les cultures de *E. coli* peuvent également être conservées sur un milieu 2XTY solide.

Le milieu de culture Simmons-Citrate Agar est utilisé pour la conservation des bactéries *E. coli* DH11S (annexe D).

5.0 MILIEUX DE CULTURE

5.1 *S. lividans*

5.1.1 Milieux solides

Après transformation, les cellules sont régénérées sur le milieu R5 solide (annexe E). La culture des souches et la production de spores servant d'inoculum sont réalisés sur un milieu Bennett-thio.

5.1.2 Milieux liquides

Le milieu liquide riche TSB (Tryptic Soy Broth) sans dextrose est utilisé pour la production d'inoculum de *S. lividans* (annexe F). La production d'enzymes s'effectue en fermenteur avec du milieu M14 (annexe G). Ce milieu est supplémenté avec 1% (p/v) de xylose.

5.2 *E. coli*

5.2.1 Milieux solides

Le milieu 2XTY est utilisé pour la croissance de *E. coli* (annexe C). Après la stérilisation, une concentration finale de 100 µg/mL d'ampicilline est ajoutée. Le milieu H (annexe H) est utilisé pour la croissance des cellules *E. coli* DH11S après transfection. La gélose molle (annexe I) est utilisée lors de la transformation chez *E. coli*. La gélose molle doit être préalablement chauffée à 60°C pendant 20 min afin de pouvoir la couler sur des pétris contenant du milieu H. Une fois refroidie, la gélose devient solide.

5.2.2 Milieux liquides

Le milieu liquide 2XTY est également utilisé pour la croissance des bactéries *E. coli* (annexe C).

6.0 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

6.1 Conditions de réaction

Toutes les réactions PCR sont effectuées dans un microtube à paroi mince dans un volume final de 100 μ L. Dans l'ordre, les solutions suivantes sont ajoutées: tampon de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, $MgCl_2$ 1,5 mM et KCl 50 mM), 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide, 4% (v/v) de propionamide, 0,05% (v/v) de Tween 20, environ 1 ng d'ADN matrice, 50 pmol de chaque amorce et 2,5 U d'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene).

Par-dessus ce mélange à PCR, 100 μ L de paraffine liquide sont ajoutés afin d'empêcher l'évaporation. La réaction PCR débute par une dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivi d'une hybridation des amorces pendant 5 min à 55°C et d'une synthèse d'ADN pendant 3 min à 72°C. Par la suite, il y a une série de 30 cycles consistant en une dénaturation de 1 min à 94°C, suivi d'un appariement des amorces de 1 min à 55°C et d'une synthèse d'ADN pendant 3 min à 72°C. Dans le dernier cycle, la synthèse à 72°C se poursuit durant 7 min et la température est ensuite ramenée à 20°C. Les réactions PCR sont effectuées avec l'appareil DNA thermal cycler 480 de la compagnie Perkin Elmer.

6.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée par PCR a été utilisée pour la mutation des 4 histidines retrouvées dans la séquence primaire de l'AxeA_r. Cette mutagenèse fait appel à l'utilisation d'oligonucléotides externes et d'oligonucléotides internes. Ces oligos servent d'amorces pour l'ADN polymérase lors de la réaction PCR. Les oligos externes s'hybrident aux extrémités du gène d'intérêt. Afin de permettre le clonage de ces gènes, une séquence de nucléotides qui comporte les sites de restriction *Sph*I ou *Sac*I est ajoutée à l'extrémité des oligos externes utilisés. Les oligos internes s'hybrident dans la région d'ADN qui contient le codon CAC codant pour une histidine. Ces oligos sont synthétisés chimiquement et le codon CAC (histidine) est remplacé par le codon GCC (alanine). Le

tableau 2 présente tous les oligonucléotides utilisés pour la mutation des 4 histidines de l'AxeA_{tr}. L'appareil Gene Assembler 4 Primers de la compagnie Pharmacia a servi à la synthèse des différents oligos.

La mutagenèse dirigée par PCR s'effectue en deux étapes (figure 9). En premier lieu, deux réactions PCR sont effectuées simultanément (9 a). Ces deux réactions PCR ont pour but d'amplifier d'une part, la portion du gène qui code pour le côté N-terminal de l'AxeA_{tr} et d'autre part, la portion du gène qui code pour le côté C-terminal de l'AxeA_{tr}. Les deux portions de gènes amplifiés vont contenir une mutation spécifique du codon histidine pour le codon alanine. Par la suite, les deux produits PCR sont mélangés ensemble et un deuxième PCR est effectué (9 b). Lors de la réaction de ce deuxième PCR, les brins d'ADN vont se dénaturer puis se réhybrider. Lors de la réhybridation, les brins d'ADN peuvent s'apparier de quatre façons différentes (9 c-d-e-f). L'ADN polymérase *Pfu* synthétise dans le sens 5' → 3'. Ainsi, c'est l'appariement illustré en 9 (f) qui est favorable à l'élongation de l'ADN. Le nouveau brin d'ADN formé comporte la mutation désirée.

7.0 SOUS-CLONAGE DES GÈNES CHEZ *S. LIVIDANS*

7.1 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les digestions sont effectuées avec environ 1 µg d'ADN plasmidique, où l'on ajoute du tampon one-phor-all (concentration finale de 20 mM Tris-acétate pH 7,5, 20 mM d'acétate de magnésium et 100 mM d'acétate de potassium). À ce mélange, 1,5 U d'enzyme de restriction *SphI* (Pharmacia) et 4 U d'enzyme de restriction *SacI* (Pharmacia) sont ajoutées, pour un volume final de 20 µL. La digestion s'effectue à 37°C pendant 2 heures. Suite à la digestion, les enzymes de restriction sont inactivées à 85°C pendant 15 minutes. Par la suite, 4 µL de tampon de chargement 6X (0,25% (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) de xylène cyanol et 30% (v/v) de glycérol dans de l'eau distillée), sont ajoutés. Les produits de digestion peuvent être ensuite séparés sur un gel d'agarose 1% (p/v) dans du tampon à électrophorèse TBE 1X (89 mM de Tris-base, 89

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR des 4 histidines de l'AxeA_{tr}. Les nucléotides en caractères gras représentent le codon alanine qui remplace le codon histidine.

Nom des oligonucléotides	Lieu d'hybridation sur l'ADN	Séquence des oligonucélotides 5' → 3'	Mutation apportée
CD 200	Externe	cactc gcatg cggtaccagtaccgga <i>SphI</i>	-
CD 201	Externe	ccc gagctct caactgccgtcgggagcgaccgc <i>SacI</i>	-
CD 203	Interne	g tcgccaacg ccagctacacc	H62A
CD 204	Interne	g gtgtagctg gcggtggcgacc	H62A
CD 205	Interne	agctacaccg ccccg cacatgacc	H66A
CD 206	Interne	catgtc ggggc gggtgtagctgtgg	H66A
CD 207	Interne	acc ccccg ccatgaccagctcg	H68A
CD 208	Interne	ct gggtcatg gccgggtggtagc	H68A
CD 209	Interne	atc ctcatg ccgactggccc	H155A
CD 210	Interne	g ggccagtc ggccatgaggatgacc	H155A

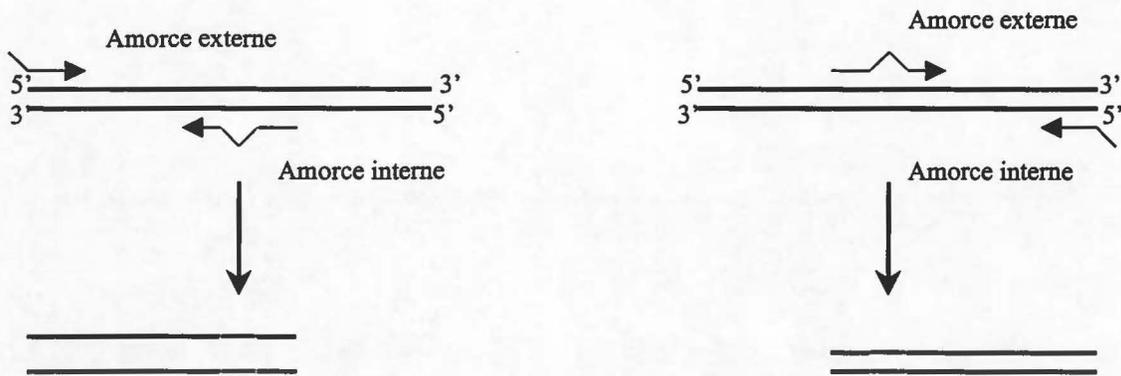
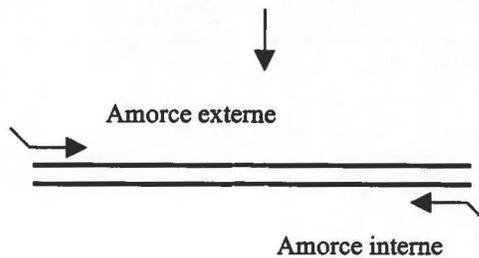
1^{er} PCR (a)2^{ième} PCR (b)1^{er} appariement (c)2^{ième} appariement (d)3^{ième} appariement (e)4^{ième} appariement (f)Polymérisation par l'ADN polymérase *Pfu*

Figure 9 : Mutagenèse dirigée par PCR (Tiré de Higuchi. 1990)

mM d'acide borique et 2 mM de EDTA pH 8,0) contenant une concentration finale de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ du bromure d'éthidium.

7.2 Isolement d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Un fragment d'ADN peut être isolé d'un gel d'agarose en utilisant la trousse Sephaglas BandPrep (Pharmacia). Le gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt est tout d'abord dissous dans une solution d'iodure de sodium à une concentration suffisamment élevée pour permettre la liaison de l'ADN au Sephaglas. Le Sephaglas (20 % (p/v) de Sephaglas BP suspendu dans de l'eau distillée contenant 0,15 % (p/v) de Kathon CG/ICP biocide) est ensuite ajouté au gel solubilisé pour permettre la liaison de l'ADN. Par la suite, la solution (ADN-Sephaglas) est lavée avec un tampon (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 mM NaCl et 70% (v/v) éthanol) afin d'éliminer les contaminants. Lorsque tout l'éthanol est retiré, l'ADN est élué de la matrice de Sephaglas en utilisant un tampon d'éluion (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM de EDTA) qui est de faible force ionique. L'ADN obtenu se retrouve dans un volume final de 20 μL .

7.3 Ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur

Le vecteur utilisé est digéré dans les mêmes conditions et avec les mêmes enzymes de restriction que celles utilisées pour obtenir le fragment d'ADN d'intérêt. La ligation est effectuée avec environ 0,5 μg d'insert d'ADN qui sont mis en solution avec 200 à 400 ng de vecteur, du tampon one-phor-all (concentration finale de 10 mM Tris-acétate pH 7,5, 10 mM de d'acétate de magnésium et 50 mM d'acétate de potassium), 1 mM d'ATP et 1 U Weiss d'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia), pour un volume final de 20 μL . La solution est incubée pendant 16 heures à la température de la pièce.

8.0 MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES DES SOUCHES

8.1 Isolement de plasmide

8.1.1 *S. lividans*

L'extraction de l'ADN plasmidique de *S. lividans* est réalisée selon le protocole de Hopwood *et al.*, (1985) avec les modifications suivantes. Un culot de 100 μL de mycéllium, obtenu à partir d'une culture de 12 mL en milieu TSB, est d'abord lavé avec 500 μL d'une solution contenant: 0,3 M de sucrose, 25 mM de Tris, 25 mM de EDTA à pH 8,0. Le culot obtenu est par la suite incubé pendant 1 heure à 37°C dans 400 μL de cette même solution contenant du lysosyme à une concentration de 2 mg/mL. Par la suite, 250 μL d'une solution contenant 0,3 M de NaOH et 70 mM de SDS sont ajoutés et le mélange est agité au vortex immédiatement avant d'être placé dans un bain d'eau à 70°C pendant 15 min. Une fois le mélange refroidi à une température inférieure à 40°C, 100 μL d'une solution acide phénol/chloroforme contenant: 50 g de phénol, 50 mL de chloroforme, 10 mL d'eau et 50 mg de 8-hydroxyquinoline sont ajoutés. Après une centrifugation de 3 min à 13000 g à la température de la pièce, la phase aqueuse est transférée dans un tube Eppendorf. Pour précipiter l'ADN, 70 μL d'une solution d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et 700 μL d'isopropanol sont ajoutés. Les tubes sont mélangés par inversion et incubés à la température de la pièce pendant 5 min. Après une centrifugation de 4 min à 13000 g à la température de la pièce, le surnageant est retiré et le culot est asséché. Ce culot d'ADN est suspendu à nouveau dans 50 μL de TE (Tris-HCl 25 mM pH 8,0 et EDTA 25 mM). Afin d'éliminer toute présence d'ARN, 1 μL de RNase (10 mg/mL) est ajouté au tube Eppendorf puis incubé à 37°C pendant 10 min. Par la suite, 5 μL de tampon acétate de sodium 3 M pH 4,8 et 25 μL de phénol neutre sont ajoutés afin de dénaturer les protéines. L'ADN de la phase aqueuse est de nouveau précipité avec 50 μL d'isopropanol pendant 5 min à la température de la pièce et le culot d'ADN obtenu est finalement dissous dans 50 μL d'eau stérilisée.

8.1.2 *E. coli*

L'isolement de plasmide chez *E. coli* se fait à partir de la trousse FlexiPrep de la compagnie Pharmacia. La procédure se fait en deux étapes. La première étape consiste en la lyse cellulaire afin de récupérer l'ADN plasmidique. Pour ce faire, 1,5 mL d'une culture de *E. coli* ayant poussé dans un milieu liquide 2XTY à 37°C durant 16 heures, sont transférés dans un tube Eppendorf et centrifugés à 13 000 g pendant 5 min à la température de la pièce. Le culot de bactéries est suspendu dans 200 µL d'une solution isotonique qui contient de la RNase (100 mM de Tris-HCl pH 7,5; 10 mM de EDTA et 400 µg/mL de RNase I). De plus, 200 µL d'une solution alcaline (1 M de NaOH; 183 mM de SDS) sont ajoutés au tube afin de permettre la lyse des cellules bactériennes ainsi que la dénaturation des protéines et de l'ADN chromosomique. Finalement, 200 µL d'une solution (3 M de potassium et 5 M d'acétate) sont ajoutés afin de neutraliser le mélange. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 g, le surnageant est récupéré et l'ADN plasmidique est précipité à la température de la pièce, pendant 10 min avec l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol.

La deuxième étape de l'isolement de plasmide consiste en la purification de l'ADN. Le culot obtenu à l'étape précédente est tout d'abord suspendu dans 150 µL d'une solution de Sephaglas (le Sephaglas est maintenu dans une solution contenant 7 M de guanidine-HCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 et 10 mM de EDTA). À ce stade, l'ADN plasmidique se lie à la matrice de Sephaglas. Après centrifugation, le culot obtenu (ADN-Sephaglas) est lavé par centrifugation en ajoutant 200 µL de solution de lavage (20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 2 mM de EDTA; 200 mM de NaCl et 60% (v/v) d'éthanol). Afin d'éliminer tous les contaminants résiduels, le culot est suspendu de nouveau dans 300 µL d'éthanol 70% (v/v). L'ADN est élué de la matrice en ajoutant un tampon de faible force ionique (100 mM Tris-HCl pH 7,5 et 10 mM de EDTA) et se retrouve dans un volume final de 50 µL.

8.2 Protoplaste et transformation

8.2.1 *S. lividans*

La préparation des protoplastes de *S. lividans* est basée sur la méthode de Hopwood *et al.*, (1985). Dans un tube Eppendorf stérile, 50 μL de protoplaste de souche 10-164 sont mélangés doucement avec 10 μL de produit de ligation. Par la suite, 200 μL d'une solution de polyéthylène glycol (PEG-masse moléculaire de 6000 Da) 25 % (v/v) sont ajoutés. La solution est incubée à la température de la pièce durant 1,5 min puis étalée sur des plats de Pétri contenant du milieu R5. Les plaques sont ensuite incubées à 34°C pendant 16 heures. Les souches de *S. lividans* qui sont transformées avec le plasmide ont la capacité à résister au thiostreptone. Ainsi, pour la sélection des transformants, 0,5 mg de thiostreptone (diluée dans le l'eau stérile) est répartie uniformément aux plats de Pétri R5 et ce, 16 heures après la transformation. Une fois que le thiostreptone a pénétré dans le milieu, les plats de Pétri sont incubés à nouveau à 34°C pendant environ 2 jours jusqu'à l'apparition de colonies.

9.0 SÉQUENÇAGE DES GÈNES

9.1 Sous-clonage dans M13

Le séquençage des gènes mutants de l'AxeA_{tr} est effectué après le sous-clonage des gènes dans *S. lividans* et le criblage des transformants. Le plasmide extrait de chaque mutant est digéré avec les enzymes de restriction *SphI* et *SacI* ce qui génère un fragment de 711 pb correspondant au gène codant pour le peptide signal et le domaine catalytique de l'AxeA_{tr}. Le fragment est élué et purifié du gel d'agarose 1% (p/v) tel que décrit à la section 7.2. Les vecteurs M13mp18 et M13mp19 sont également digérés avec les mêmes enzymes de restriction et le fragment de 7000 pb obtenu est élué et purifié du gel d'agarose de la même façon. La ligation du vecteur M13 digéré avec le fragment d'ADN digéré *SphI-SacI* à séquencer s'effectue selon l'explication à la section 7.3.

9.2 Transfection

La technique de transfection dans *E. coli* est utilisée afin de permettre une infection avec le phage M13, dans le but de produire de l'ADN simple brin pour le séquençage. Avant de procéder à la transfection dans *E. coli*, il est nécessaire de préparer une pré-culture de bactéries *E. coli* DH11S. Ainsi, deux jours avant la transfection, un inoculum de *E. coli* DH11S provenant d'un pétri Simmons-Citrate agar est mis en culture dans 5 mL de milieu liquide 2XTY. Cette pré-culture est incubée avec agitation, à 37°C pendant 16 heures. À partir de la pré-culture de 5 mL réalisée la veille, une culture 1/10 de *E. coli* DH11S est préparée. Cette nouvelle culture est incubée avec agitation à 37°C pendant 3 heures et sert de cellules de fond lors de la transfection.

La transfection dans *E. coli* nécessite la préparation de bactéries DH11S compétentes. Ces bactéries sont produites selon le protocole de la trousse «Unique Site Elimination Mutagenesis Kit» de la compagnie Pharmacia. L'introduction des formes répliquatives du phage M13 dans *E. coli* est effectuée selon la méthode décrite par Sambrook *et al.*, (1989). Dans un tube Falcon stérile de 10 mL, 300 µL de bactéries compétentes *E. coli* DH11S sont mélangées avec 10 µL de produit de ligation. Le mélange est incubé sur glace pendant 40 min. Par la suite, le mélange est incubé à 42°C pendant 2 min. Afin de permettre l'isolement de clones individuels 50 µL, 100 µL et 150 µL du mélange sont ajoutés à un tube contenant 3 mL de gélose molle. À ce tube, 300 µL de cellules de fond de *E. coli* (tel que décrit précédemment) sont ajoutés afin de permettre l'infection par les phages. De plus, 10 µL de isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) 100 mM et 50 µL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyle-β-D-galactoside (X-gal) dans 2% (v/v) de diméthylformamide sont ajoutés. Le mélange est ensuite coulé sur des pétris contenant du milieu H qui sont incubés à 37°C pendant 16 heures.

9.3 Production et purification d'ADN simple brin du phage M13

Après l'infection des cellules avec le phage M13, il se forme sur les pétris, des plages de lyse blanches. Ces dernières sont repiquées avec un cure-dent stérile et

déposées dans des tubes contenant 1,5 mL d'une culture de cellules *E. coli* DH11S dans du milieu 2XTY. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 6 heures avec agitation. Ensuite, les cultures sont centrifugées pendant 10 min et l'ADN simple brin se retrouve dans le surnageant. Cet ADN est précipité avec une solution de PEG 6000 20% (v/v) et NaCl 2,5 M. Le culot obtenu est suspendu de nouveau dans 100 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8,0 et 1 mM EDTA) et l'ADN simple brin de la phase aqueuse est précipité par l'ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol 95% (v/v). Le culot d'ADN obtenu est suspendu à nouveau dans 30 µL d'eau stérilisée.

9.4 Cartographie à la nucléase S1 (S1 mapping)

La digestion à la nucléase S1 permet de vérifier la présence de l'insert d'ADN, sous forme simple brin, dans les phages M13mp18 et M13mp19. La méthode consiste en l'hybridation de 1 µL de l'ADN simple provenant de M13mp18 avec 1 µL d'ADN simple brin complémentaire, provenant de M13mp19. À ce mélange, 1 µL de chlorure de sodium 2 M et 5 µL d'eau stérilisée sont ajoutés. Ce mélange est incubé à 90°C pendant 3 min. Par la suite, 1 µL d'un tampon S1 10X (NaOAc 0,5 M pH 4,6; ZnSO₄ 45 mM) et 1 µL de nucléase S1 (Pharmacia LKB) diluée à 2 U/µL avec du tampon S1 1X (NaOAc 0,05 M pH 4,6; ZnSO₄ 4,5 mM) sont ajoutés au tube contenant l'ADN et incubé à 37°C pendant 30 min. La nucléase S1 digère l'ADN simple brin présent, mais pas l'ADN double brins. Finalement, 2 µL de tampon de chargement pour électrophorèse (voir section 7.1) sont ajoutés et l'ADN est séparé sur un gel d'agarose de 1% (p/v). Où il y a eu hybridation, les fragments sont protégés de l'attaque de la nucléase S1 et un fragment de 711 pb est observé sur le gel d'agarose.

9.5 Séquençage de l'ADN

L'ADN simple brin est séquencé selon la méthode de Sanger *et al.*, (1977) en utilisant différents oligonucléotides produits par le «Gene Assembler II» de Pharmacia-LKB.

10.0 PRODUCTION DE L'ENZYME

10.1 Conditions de culture

Les productions des enzymes des souches sauvages et mutantes se font dans 7 L de milieu M14 en utilisant du xylose 1% (p/v) comme source de carbone. Toutes les productions se font dans des appareils Microferm Fermentor de la compagnie New Brunswick Co. Inc. L'appareil est ajusté de façon à obtenir un débit d'air de 10 L/min, une température de 30°C et un brassage du milieu équivalent à 400 rpm. Le temps de croissance des souches, dans ces conditions, est de 67 heures.

L'inoculum est préparé à partir de deux précultures de 25 mL en milieu TSB incubées à 34°C à 240 rpm. Après 24 heures de croissance, le mycélium obtenu est transféré dans 500 mL de milieu M14 supplémenté de xylose. Ce milieu est par la suite incubé à 34°C à 240 rpm. Après 48 heures de croissance, la totalité de ce dernier milieu de culture est transférée stérilement dans la cuve du fermenteur.

10.2 Récupération et concentration de l'enzyme

L'Axe_r est une enzyme sécrétée et se retrouve, lors d'une production, dans le surnageant de culture. Le surnageant est récupéré par une filtration du milieu de culture sur papier Wathman no°1. Par la suite, le surnageant est passé à travers un filtre de 0,2 µm (Sartorius) et les protéines totales du surnageant subissent une ultrafiltration à débit tangentielle par l'appareil Pellicon (Millipore) contenant une membrane Omega de 5 pieds carrés et de porosité de 3KDa (Filtron). Cette ultrafiltration s'effectue dans un tampon citrate 100 mM pH 6,0. Le retentat obtenu est de nouveau concentré à travers un appareil d'ultrafiltration (Amicon) contenant une membrane de porosité de 3KDa (Pall Filtron) et ce, jusqu'à l'obtention d'une concentration de protéines totales de 15 mg/mL.

11.0 PURIFICATION DES ENZYMES

11.1 Échangeurs d'ions

Seule l'enzyme sauvage a été purifiée par colonne échangeuse d'ions. La colonne échangeuse de cations carboxyméthyl (CM) sépharose AP2 (Waters) (20 mm X 100 mm) est montée sur l'appareil à chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) de Waters (Millipore) modèle 625 LC. La colonne est équilibrée dans du tampon Mes-NaOH 20 mM pH 6,0 à un débit linéaire de 76,4 cm/h. L'échantillon de protéines doit également être dialysé contre un tampon Mes-NaOH pH 6,0. Afin de favoriser, par rapport aux ions Na^+ provenant du tampon, l'attachement des protéines chargées positivement à la résine de la colonne, il est préférable de dialyser l'échantillon de protéines contre un tampon de plus faible concentration que celui utilisé pour l'équilibration de la colonne. De ce fait, l'échantillon est dialysé contre du tampon Mes-NaOH 5 mM pH 6,0, est filtré sur un filtre 0,2 μm (Acrodisc, Gelman Sciences). L'échantillon (210 mg de protéines) est injecté avec un débit linéaire de 76,4 cm/h. La colonne est lavée avec le tampon Mes-NaOH 20 mM pH 6,0 à un débit de 76,4 cm/h. Le programme d'élution est ensuite amorcé (tableau 3).

Les fractions sont ensuite récupérées avec le collecteur de fractions Frac-300 de Pharmacia. L'élution des protéines est suivie par absorbance à une longueur d'onde de 280 nm sur le détecteur à ultra-violet de Waters modèle 484. L'enregistreur utilisé provient de la compagnie Kipp & Zonen modèle BD 40. La colonne est lavée avec 100 % de NaCl 1 M dans du tampon Mes-NaOH 20 mM pH 6,0 à 76,4 cm/h.

Les fractions contenant l'AxeA_{tr}, déterminées par SDS-PAGE et par le profil d'élution, sont réunies et concentrées à environ 15 mg/mL. La concentration s'effectue avec l'appareil d'ultrafiltration Amicon contenant une membrane de porosité de 3 KDa (Pall Filtron).

Tableau 3 : Programme d'élution de l'AxeA_r sur la colonne CM-Sépharose AP2

Temps (min)	% A	% B	% C	% D
Initial	100	0	0	0
90	80	20	0	0
100	0	100	0	0
140	0	100	0	0
150	0	0	100	0
190	0	0	100	0
191	0	0	0	100
210	0	0	0	100
215	0	0	0	100

A : Tampon 20 mM Mes-NaOH pH 6,0

B : Tampon 20 mM Mes-NaOH pH 6,0

C : eau Milli-Q

D : NaN₃ 1mM

11.2 Tamis moléculaire

L'enzyme sauvage a été purifiée une deuxième fois par tamis moléculaire. De même, c'est par tamis moléculaire que les enzymes mutantes ont été purifiées. La colonne Superdex HR-75 (Pharmacia) est montée sur l'appareil HPLC de Waters (Millipore) modèle 510. La colonne (10 mm X 300 mm) est maintenue à 4°C et est équilibrée dans du tampon sodium-phosphate 0.1 M pH 6,0, à un débit linéaire de 90 cm/h. La solution de protéines à purifier est filtrée à travers un filtre Filtropur S plus 0,2 µm (Sarstedt). L'échantillon est injecté à raison de 2 mL (environ 30 mg de protéines) et les différentes fractions sont récupérées avec le collecteur de fraction Frac-100 (Pharmacia) réglé à 4 min par fraction. La densité optique (lue à une longueur d'onde de 280 nm) des fractions recueillies est prise par le détecteur Optical Unit UV-1. Les

fractions pures, déterminées par SDS-PAGE et par le profil d'éluion, sont réunies et concentrées, jusqu'au volume désiré, par l'appareil d'ultrafiltration (Amicon) contenant une membrane de porosité 3KDa (Pall Filtron). Afin de prévenir la dénaturation des protéines, 5% (v/v) de glycérol est ajouté à la solution d'enzyme pure puis conservé à -70°C.

12.0 ANALYSE DES PROTÉINES

12.1 Dosage des protéines

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

12.2 SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur SDS-PAGE de 12,5% en utilisant la technique décrite par Laemmli *et al.*, (1970).

Une deuxième technique de SDS-PAGE est utilisée. Cette technique est réalisée sur Phast Gel de 12,5% de Pharmacia avec l'appareil Phast System de Pharmacia. 10 µL d'échantillon sont ajoutés à 5 µL de tampon de chargement 3X (concentrations finales : 2,5% (p/v) de SDS; 10 mM de Tris-HCl-EDTA; 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol; 0,0075% (p/v) de bleu de bromophénol dans de l'eau distillée), et chauffés à 100°C pendant 7 min. 4 µL de l'échantillon sont chargés sur un peigne (Sample Applicator de 4 µL de Pharmacia) et séparés jusqu'à 70 mVh. La coloration du gel au nitrate d'argent se fait selon la méthode du « Development Unit » de l'appareil Phast System de Pharmacia un utilisant les standards de poids moléculaires « Electrophoresis calibration kit » de Pharmacia-LKB comprenant : la phosphorylase b de 94 kDa, l'albumine de sérum bovin de 67 kDa, l'ovalbumine de 43 kDa, l'anhydrase carbonique de 30 kDa, l'inhibiteur de la trypsine de soya de 20,1 kDa et l'α-lactalbumine de 14,4 kDa.

12.3 Détermination du point isoélectrique

Les échantillons à analyser sont séparés sur un gel contenant des ampholytes de pH 3 à 9 (Phast Gel de Pharmacia) par l'appareil Phast System. 4 μL d'échantillon sont déposés sur le gel avec l'applicateur (Sample Applicator de 4 μL de Pharmacia) et la séparation est effectuée selon le programme de l'appareil pour la détermination du point isoélectrique (filière No 100 des techniques de séparation de PhastSystem- Pharmacia LKB). Le gel est ensuite coloré à l'argent selon les indications de la compagnie (filière No 210 des techniques de développement de PhastSystem- Pharmacia LKB).

12.4 Immunobuvardage de type Western

Les protéines du gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protran, 45 μm) en utilisant un tampon de transfert (25 mM de Tris; 192 mM de glycine et 20% (v/v) de méthanol) et un courant électrique de 30 volts durant 16 heures. Les sites non spécifiques de la membrane séchée sont bloqués avec 30 mL d'une solution de blocage durant 30 min. Cette solution de blocage est constituée d'un tampon salin (TBS) (20 mM de Tris et 500 mM de NaCl) pH 7,5 contenant 3% (p/v) de gélatine. Par la suite, la membrane est lavée trois fois 5 min avec 30 mL de solution de lavage (0,05% (v/v) de Tween 80 solubilisé dans du TBS pH 7,5) puis incubée avec 30 mL de la solution d'anticorps primaire (70 μL d'anticorps polyclonaux anti-AxeA provenant de lapins; 29 mL de solution de lavage et 1 mL de solution de blocage). Les anticorps réagissent pendant 16 heures à 4°C ou pendant 1 heure à la température de la pièce avec une légère agitation. Après trois lavages de 5 min, la membrane est incubée avec la solution d'anticorps secondaire (20 mL de solution de lavage; 10 mL de solution de blocage et 15 μL d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)) pendant 1 heure à la température de la pièce avec une légère agitation. La membrane est lavée trois fois 5 min avec la solution de lavage et une fois 5 min avec la solution de TBS pH 7,5. Finalement la membrane est incubée avec une solution de développement contenant 15 μL de solution stock NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt)

(Boehringer Mannheim) et 10 mL de solution de coloration (50 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 100 mM de Tris et 100 mM de NaCl pH 9,5). Une fois que le niveau de développement désiré est atteint, la réaction est arrêtée par deux lavages de 5 min avec de l'eau distillée. Les standards de poids moléculaires « Rainbow mix » de Amersham sont utilisés comme marqueurs et comprennent : la myosin à 220 kDa, la phosphorylase b à 97,4 kDa, l'albumine de sérum bovin à 66 kDa, l'ovalbumine à 46 kDa, l'anhydrase carbonique à 30 kDa, l'inhibiteur de la trypsine à 21,5 kDa et la lysosyme à 14,3 kDa.

Une deuxième technique est également utilisée pour le transfert des protéines. Cette technique est réalisée sur l'appareil Phast System de Pharmacia et le transfert s'effectue selon le programme de l'appareil (filière No 221 des techniques de transfert avec le PhastSystem- Pharmacia LKB).

13.0 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

13.1 Préparation du substrat xylane acétylé

Du xylane acétylé est utilisé comme substrat lors des tests d'activité enzymatique. La préparation de ce substrat est effectuée selon la technique décrite par Johnson *et al.*, (1988). 10 g de xylane de bouleau sont lentement ajoutés à 250 mL de diméthyle sulfoxyde (DMSO) et ce, avec une légère agitation et à la température de la pièce. Une fois la solution homogène, la préparation est chauffée à 55°C pour environ 20 min ou jusqu'à ce que la solubilisation soit complète. Du borate de sodium est ensuite ajouté à une concentration finale de 0,8% (p/v). Par la suite, 200 mL d'anhydride acétique préchauffé à 60°C sont ajoutés, durant une période d'environ 5 minutes, à la solution. Une fois que tout l'anhydride acétique a été ajouté, la solution de xylane est répartie dans deux membranes à dialyse (Spectra/Por perméabilité : 3500 Da). Les membranes sont placées dans un bac où il y a une circulation constante d'eau. Après 5 jours de dialyse, la solution est lyophilisée.

13.2 Tests quantitatifs pour l'AxeA_r

13.2.1 Substrat : xylane acétylé

La méthode développée par Dupont *et al.*, (1996) mesure la quantité d'acide acétique libérée. Les tests sont effectués dans des tubes Eppendorf dans un volume final de 500 μL contenant 1% (p/v) de xylane acétylé dissous dans du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 6,0. Après avoir préincubé dans un bain d'eau le substrat pendant 10 min à 50°C, 50 μL d'enzyme (total de 100 ng) sont ajoutés pour démarrer la réaction de déacétylation. Le test dure 10 min à 50°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 100 μL d'acide sulfurique 0,33 M. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 13 000 g à la température de la pièce. Le surnageant récupéré est passé à travers un filtre de 0,45 μm (Acrodisc, Gelman Sciences) et l'acide acétique est quantifié (voir section 13.3). Un échantillon contrôle est testé afin d'éliminer le bruit de fond.

13.2.2 Substrat : méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside

Les tests réalisés avec le substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside sont effectués dans des tubes Eppendorf dans un volume final de 500 μL contenant 14,5 mM du substrat dissous dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,0. Après avoir préincubé dans un bain d'eau le substrat pendant 10 min à 40°C, 50 μL d'enzyme sont ajoutés de façon à obtenir une concentration finale d'enzyme de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La réaction est arrêtée en prélevant, à différents temps d'incubation, 50 μL de la solution enzymatique qui sont ajoutés à 50 μL d'acide sulfurique 0,33 M. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 000 g pendant 2 min à la température de la pièce. Le surnageant est récupéré et passé à travers un filtre de 0,45 μm (Acrodisc, Gelman Sciences) et l'acide acétique est quantifié en injectant 20 μL de l'échantillon sur HPLC (13.3). Un échantillon contrôle est testé et ce, aux différents temps d'incubation, afin d'éliminer le bruit de fond.

13.3 Quantification de l'acide acétique

La quantification de l'acide acétique est basée sur la méthode employée par Dupont et Clarke, (1991). Les échantillons sont passés sur une colonne HPX-87H de 7,8 mm x 300 mm (Bio-Rad), maintenue à 45°C, et qui est montée sur l'appareil HPLC de Waters (Millipore) modèle 510. La phase mobile utilisée est de l'acide sulfurique pH 1,5, réglé à un débit linéaire de 62,9 cm/h. Les échantillons sont placés dans un autoéchantillonneur (Spectra Physics modèle SP8880) et sont maintenus à 15°C par l'appareil Spectra Physics modèle SP 8760. L'acide acétique est quantifié en injectant 100 µL et 20 µL des échantillons testés avec le xylane acétylé et le méthyle tri-*O*-acétyl-β-D-xylopyranoside respectivement. La détection de l'acide acétique, après un temps de rétention de 19,5 min, est effectuée par absorbance à une longueur d'onde de 210 nm sur le détecteur UV de Waters modèle 484. L'enregistreur utilisé est de la compagnie Dionex. Cet enregistreur possède une interface qui rend possible l'analyse des données acquises par le logiciel Peaknet. La différence entre la quantité d'acide acétique libéré par l'échantillon et celle libérée par le contrôle est employée pour calculer la quantité d'acide acétique produit pour un échantillon. L'acide acétique glaciale est utilisée comme standard.

13.4 Tests quantitatifs avec la trypsine

Le protocole des tests quantitatifs effectués avec la trypsine est basé sur celui utilisé par Bascaran *et al.*, (1990). Dans un tube Eppendorf, 50 µL de trypsine (1 µg total) sont mis en solution avec 50 µL d'azocaséine 1% (p/v) (Sigma) qui est dilué avec du Tris-HCl 0,2 M pH 7,2. L'échantillon est ensuite incubé à 40°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 400 µL de TCA 5% (p/v) et l'échantillon est ensuite mis sur de la glace pendant 30 min. L'échantillon est centrifugé à 13 000 g pendant 10 min à la température de la pièce et le surnageant est récupéré. 500 µL de NaOH 0,5 N sont ensuite ajoutés au surnageant. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 340 nm avec le spectromètre Milton Roy modèle 3000. Une unité d'activité est définie comme

étant la quantité d'enzyme produisant une augmentation de 1 en absorbance en une heure dans les conditions choisies.

14.0 RÉACTION D'INHIBITION

14.1 Inhibition avec le fluorure de benzyle sulfonyle (PMSF)

Les réactions d'inhibition au PMSF sont effectuées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,0 et à la température de la pièce. Dans un tube Eppendorf, 400 μ L d'enzyme (total de 0,3 μ g), sont mis en solution avec 100 μ L de PMSF 50 mM, 25 mM ou 5 mM dissous dans de l'isopropanol (concentration finale de PMSF 10, 5 et 1 mM). Le temps d'incubation varie entre 15 min et 120 min. Aux différents temps d'incubation, 125 μ L de xylane acétylé 5% (p/v) dissous dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,0 sont ajoutés au tube (concentration finale de xylane: 1% (p/v)). Le temps de réaction avec le substrat est de 30 min et la réaction est arrêtée en ajoutant 125 μ L d'acide sulfurique 0,33 M. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 000 g pendant 2 min à la température de la pièce. Le surnageant est récupéré et passé à travers un filtre de 0,45 μ m (Acrodisc, Gelman Sciences) et l'acide acétique est quantifié.

14.2 Inhibition avec le fluorophosphate de diisopropyle (DFP)

Des expériences d'inhibition au DFP (Calbiochem) ont été effectuées avec l'AxeA_{tr} et la trypsine provenant d'un pancréas de bovin (Boehringer Mannheim). Toutes les réactions d'inhibition au DFP sont effectuées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,5 et à la température de la pièce. Dans un tube Eppendorf, 20 μ M d'enzyme (AxeA_{tr} ou trypsine) sont incubés avec une concentration de 5 mM de DFP pour un volume final de 500 μ L. Après une heure d'incubation, l'échantillon est complètement évaporé sous un jet d'azote. Le culot obtenu est suspendu dans 500 μ L d'eau milliQ. L'échantillon est par la suite dialysé trois fois à 4°C contre 5 L d'eau milliQ filtré 0,2 μ m (Gelman Science) afin d'éliminer le DFP excédentaire. Par la suite, un dosage des protéines effectué à une longueur d'onde de 280 nm est effectué avec le

spectromètre Milton Roy modèle 3000. Des tests d'activité enzymatique avec le substrat xylane acétylé (13.2.1) et des analyses par spectrométrie de masse sont ensuite effectués.

14.3 Inhibition avec le fluorophosphate de diisopropyle marqué au tritium [³H]DFP

Des expériences d'inhibition au [³H]DFP (Mandel Scientific) ont été effectuées avec l'AxeA_{tr} et avec l'AxeA complète (comportant le domaine de fixation au xylane). Toutes les réactions d'inhibition au [³H]DFP sont effectuées dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,5 et à la température de la pièce. Dans un tube Eppendorf, 20 μM d'enzyme (AxeA_{tr} ou AxeA complète) sont incubés avec 4,44 MBq de [³H]DFP et 5 mM de DFP froid (Calbiochem), pour un volume final de 500 μL. Après une heure d'incubation, l'échantillon est complètement évaporé sous un jet d'azote. Le culot obtenu est suspendu dans 500 μL d'eau milliQ. L'échantillon est par la suite dialysé trois fois à 4°C contre 5 L d'eau milliQ filtré 0,2 μm (Gelman Science) afin d'éliminer le DFP excédentaire. Par la suite, un dosage des protéines est effectué avec le spectromètre Milton Roy modèle 3000. Des tests d'activités enzymatiques avec le substrat xylane acétylé (13.2.1) et des analyses par HPLC sont ensuite effectués.

14.4 Inhibition avec le phosphate de diisopropyle (DP)

Des expériences d'inhibition au DP (forme hydrolysée du DFP) ont été effectuées avec l'AxeA_{tr}. Le DP est obtenu en incubant du DFP dans de l'eau milliQ pendant 18 heures. La réaction d'inhibition au DP est effectuée dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,5 et à la température de la pièce. Dans un tube Eppendorf, 20 μM d'enzyme (AxeA_{tr}) sont incubés avec une concentration de 5 mM de DP pour un volume final de 500 μL. Après une heure d'incubation, l'échantillon est complètement évaporé sous un jet d'azote. Le culot obtenu est suspendu dans 500 μL d'eau milliQ. L'échantillon est par la suite dialysé trois fois à 4°C contre 5 L d'eau milliQ filtré 0,2 μm (Gelman Science). Par la suite, un dosage des protéines à 280 nm est effectué avec le spectromètre Milton Roy modèle 3000. Des tests d'activité enzymatique avec le substrat xylane acétylé (13.2.1) et des analyses par spectrométrie de masse sont ensuite effectués.

15.0 DIGESTION PEPTIDIQUE

15.1 Digestion avec la trypsine

Les digestions peptidiques ont été effectuées avec l'AxeA_r et l'AxeA complète. Dans un tube Eppendorf, 100 µg d'enzyme (AxeA_r ou AxeA complète) sont dénaturés dans 25 µL de GuHCL 6 M contenu dans un tampon NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,6. La dénaturation a lieu à 50°C pendant 30 min. Par la suite, 0,5 µL de dithiothréitol (DTT) (concentration finale de 20 mM) est ajouté au tube puis incubé à 30°C pendant 2 h. Ensuite, 1,02 µL de l'iodoacétamide (concentration finale de 40 mM) est ajouté à l'échantillon puis incubé à la noirceur pendant 30 min à la température de la pièce. Suite à l'incubation, 106 µL de GuHCL 6M et 1 190 µL de NH₄HCO₃ 50 mM pH 8,6 sont ajoutés au mélange réactionnel. Finalement 5 µg de trypsine « sequencing grade » (Promega) sont ajoutés au mélange afin d'obtenir un ratio trypsine : AxeA de 1 :20. La réaction de digestion a lieu à 37°C pendant 18 h.

15.2 Séparation des peptides

Les peptides digérés sont séparés sur une colonne de phase inverse Nova-Pak C₁₈ de 3.9 mm x 150 mm (Waters), qui est montée sur l'appareil HPLC de Waters (Millipore) modèle 510. La phase mobile utilisée, TFA 0,065% (v/v) dans de l'eau milliQ filtré 0,2 µm, est réglée à un débit linéaire de 252 cm/h. La solution d'élution utilisée est constituée de 68 % d'acétonitrile (v/v) et de 0,05% (v/v) de TFA dans de l'eau milliQ filtrée 0,2 µm. Environ 100 µL d'échantillon (30 µg de peptides), préalablement filtrés sur un filtre de 0,45 µm (Acrodisc, Gelman Sciences) sont injectés dans l'appareil. Le programme de gradient d'élution est contrôlé par l'appareil « Automated Gradient Controller » de Waters. Le tableau 4 présente le programme d'élution utilisé pour les peptides. L'élution des peptides est suivie par absorbance à une longueur d'onde de 214 nm sur le détecteur ultraviolet de Waters modèle 484. L'enregistreur utilisé est de la compagnie Dionex. Cet enregistreur possède une interface qui rend possible l'analyse

Tableau 4: Programme d'élution des peptides sur la colonne Nova-Pak C-18

Temps (min)	Débit (cm/h)	%A 0,065 % TFA	%B 68% acétonitrile + 0,05% TFA
Initial	252	100	0
5	252	100	0
20	252	75	25
40	252	50	50
60	252	25	75
85	252	0	100
95	252	0	100
98	252	100	0
110	252	100	0

des données acquises et, par le fait même, le suivi de la séparation des peptides par le logiciel Peaknet.

15.3 Mesure de la radioactivité des peptides

Les fractions des peptides sont recueillies à la main et ce, à la sortie de l'échantillon du détecteur ultra-violet. Les fractions sont collectées à chaque deux minutes. Par la suite, 200 μ L de l'échantillon récolté sont mélangés avec 7 mL de liquide à scintillation Eco Lite (ICN). La radioactivité est mesurée avec le compteur à scintillation de Beckman modèle LS 1701. Les comptes sont effectués pour 1 min.

16.0 ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

16.1 Analyse de l'AxeA_{tr} en mode *electrospray*

L'AxeA_{tr} analysée par spectrométrie de masse est diluée dans de l'eau milliQ (contenant 0,1% (v/v) d'acide formique) qui est filtrée sur un filtre de 0,2 µm (Gelman Science). L'échantillon est injecté dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II. Le voltage attribué au capillaire, le voltage du cône, le voltage de l'extraction, la température du bloc source et la température attribuée à l'azote pour la désolvation varient selon l'échantillon à analyser. Ainsi, les conditions spécifiques utilisées pour chaque échantillons analysés sont mentionnées lors de la description des figures dans la section résultats. Les données enregistrées sont traitées par le logiciel MassLynx version 3.3.

16.2 Analyse des peptides de l'AxeA_{tr} en mode *nanoflow*

Les peptides analysés par spectrométrie de masse doivent être d'abord purifiés à l'aide de ZipTip contenant une résine C₁₈ (Millipore). Les ZipTips sont des embouts de pipette qui contiennent une résine C₁₈ servant à la purification de peptides. Le protocole de purification par ZipTip est indiqué dans le « User Guide for reversed-phase ZipTip ». Suite à la purification par ZipTip, 2 µg de peptides purifiés sont obtenus dans 12 µL d'acétonitrile 80 % (v/v) + TFA 0,1 % (v/v). L'échantillon de peptides est injecté dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 0,89 V est attribué au capillaire, un voltage de 5 V au cône, un voltage de 3V pour l'extraction et une température 80°C du bloc source. Lors de la fragmentation des ions peptidiques, un voltage de 34,5 V est attribué à la cellule de collision. Les données enregistrées sont traitées par le logiciel MassLynx version 3.3.

16.3 Analyse des peptides par chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/MS)

L'injection des peptides par LC/MS est fait dans le but d'analyser le chromatogramme et le spectre de masse des peptides. Une colonne à phase inversée C₁₈ de dimensions (4,0 mm X 125 mm) (Hewlett Packard) branchée sur un HPLC (Hewlett Packard-modèle 1100) est utilisée pour la chromatographie à phase liquide. Le gradient d'élution est effectué en 1 heure avec de l'acétonitrile 68 % (v/v) comme éluant. Le débit linéaire utilisé est de 190 cm/h. Le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II est utilisé pour obtenir la masse moléculaire des peptides. Les conditions utilisées au LC/MS sont les suivantes : un voltage de 3,16 kV attribué au capillaire, un voltage de 12 V au cône, une température de 120°C au bloc source et une température de 180°C attribuée à l'azote pour la désolvatation. Les données enregistrées sont traitées par le logiciel MassLynx version 3.3.

16.4 Analyse de la trypsine en mode *electrospray*

La trypsine analysée par spectrométrie de masse est diluée dans de l'eau milliQ (contenant 0,2% (v/v) d'acide formique) qui est filtrée avec un filtre de 0,2 µm (Gelman Science). L'échantillon est injecté dans le spectromètre de masse Finnigan MAT SSQ 7000 dans les conditions suivantes : une température de 210°C attribuée au capillaire; une température de 70°C au bloc source et une pression de 4,35 kPa pour la désolvatation. L'injection de l'échantillon s'effectue par infusion directe avec l'appareil Harvard Apparatus 22 syringe pump.

RESULTATS

1.0 CONSTRUCTION DE PLASMIDE POUR LA MUTAGENÈSE DIRIGÉE

1.1 Amplification de l'*axeA_{tr}* par PCR

L'amplification du gène *axeA* a été effectuée à partir du plasmide pIAF42 (Shareck *et al.*, 1995). Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pIJ702 dans lequel un insert de 7,5 kpb contenant les gènes de la xylanase B (*xlnB*) et de l'*axeA* ont été clonés (figure 10). A partir de ce plasmide, une forme tronquée de l'*axeA* a été amplifiée afin de conserver uniquement le domaine catalytique de l'enzyme. Afin de permettre le clonage de l'*axeA_{tr}*, des séquences de nucléotides qui comportent les sites de restriction *SphI* et *SacI* ont été ajoutées aux oligos s'hybridant respectivement en amont et en aval de l'*axeA_{tr}*. Un codon d'arrêt de transcription a également été ajouté à l'oligonucléotide s'hybridant en aval de l'*axeA*. L'*axeA_{tr}* est un gène comportant 711 paires de base.

1.2 Sous-clonage dans *E. coli*

Le produit de PCR de l'*axeA_{tr}* a été digéré par les enzymes de restriction *SphI* et *SacI*. Le phagemide pTZ19U a également été digéré par ces mêmes enzymes de restriction puis, après migration en gel d'agarose, le phagemide linéarisé a été isolé du gel à l'aide de la trousse Band-Prep (voir section 7.2 de l'approche expérimentale). Ce phagemide a par la suite été lié aux produits de PCR de l'*axeA_{tr}* ce qui résulte en la formation du plasmide pIAF834 (figure 11). Ce plasmide a par la suite été transformé dans *E. coli* DH11S.

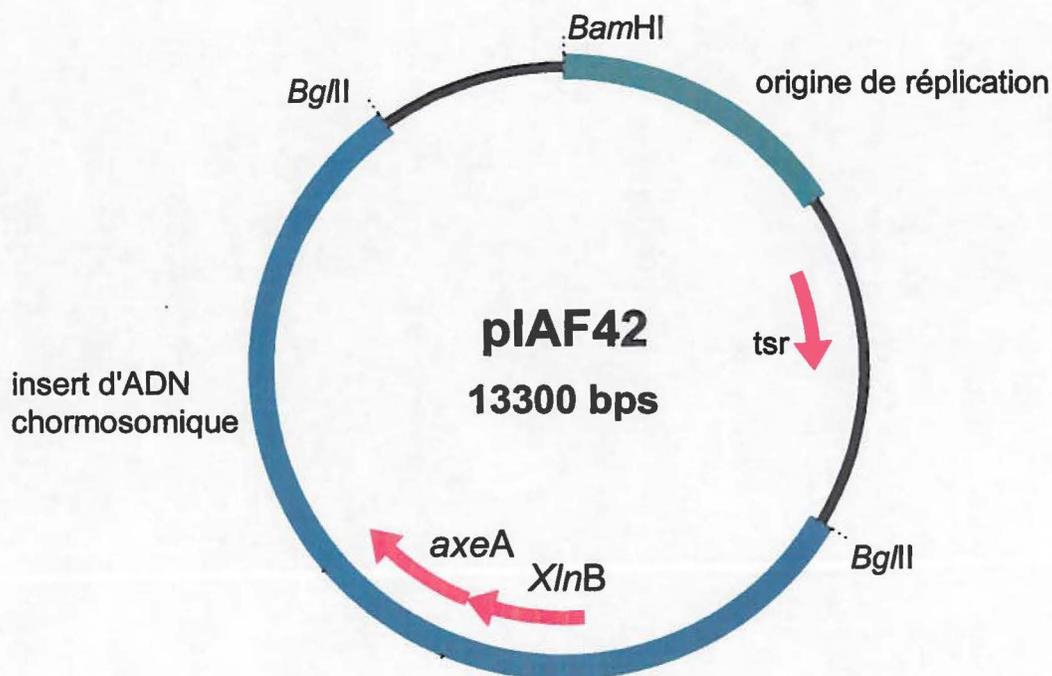


Figure 10 : Représentation du plasmide pIAF42. Ce plasmide provient du plasmide pIJ702 dans lequel un insert du chromosome de *S. lividans* de 7,5 kbp a été cloné (Shareck *et al.*, 1995).

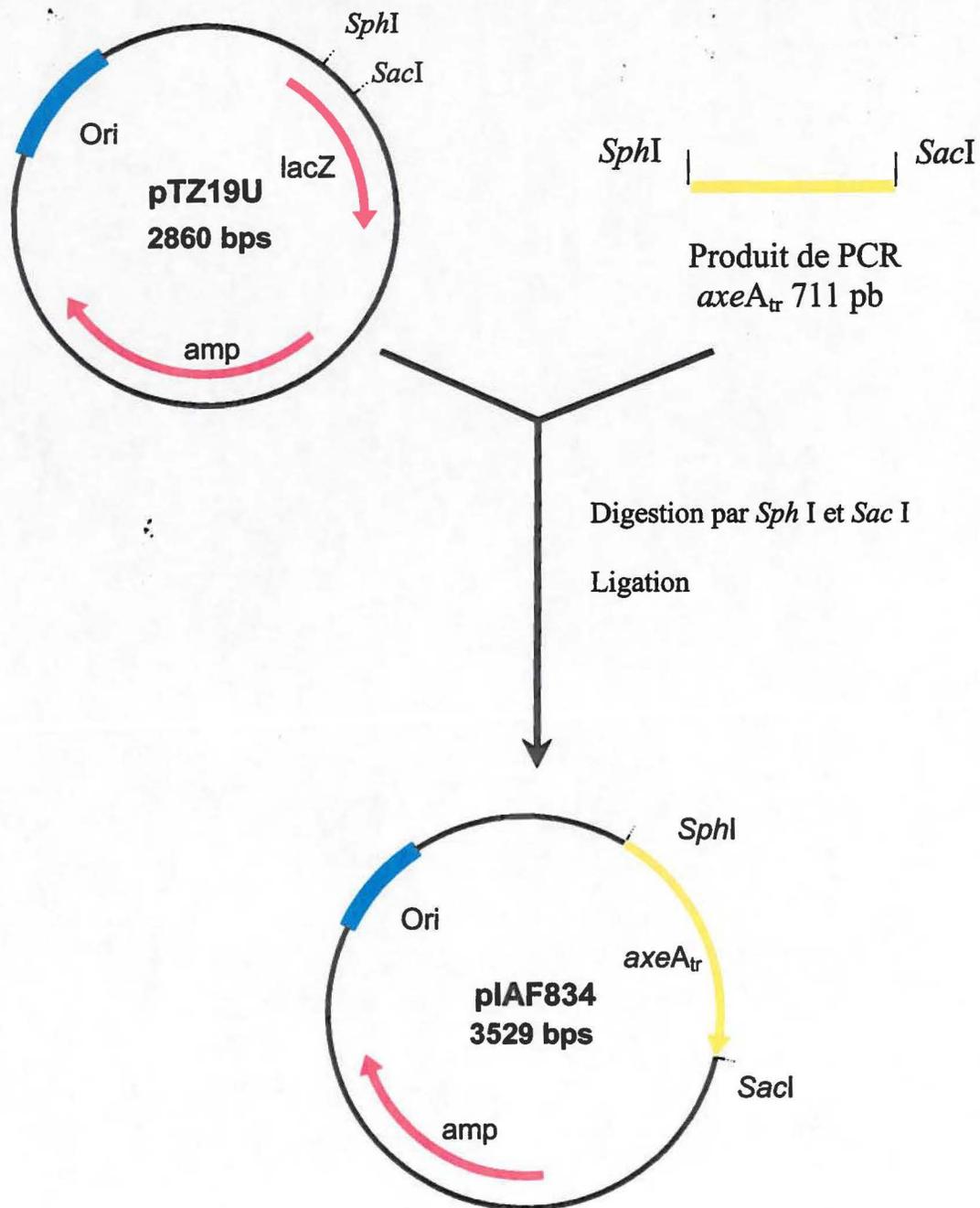


Figure 11 : Construction du plasmide pIAF834 à partir du phagemide pTZ19U et du gène de l'*axeA_{tr}* amplifié par PCR.

1.3 Sélection des transformants

Une fois que la transformation a eu lieu, des colonies blanches et bleues présentant une résistance à l'ampicilline ont été obtenues. Les colonies blanches ont été sélectionnées puisqu'elles sont indicatrices d'une interruption du gène *lacZ* dû à l'insertion d'ADN étranger. Ces colonies ont été inoculées dans un milieu 2XTY liquide contenant de l'ampicilline et par la suite, les plasmides ont été extraits à l'aide de la trousse Flexi-Prep (voir section 8.1.2 de l'approche expérimentale). Ces plasmides extraits ont été digérés par les enzymes de restriction *SphI* et *SacI*, puis séparés en gel d'agarose afin de vérifier la présence d'un insert de 711 pb correspondant au gène de l'*axeA_{tr}*. Une fois la présence d'un insert de 711 pb vérifiée, les plasmides ont été conservés pour la mutagenèse dirigée par PCR.

2.0 MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR PCR

2.1 Mutation des quatre codons histidine

La mutagenèse dirigée par PCR s'est effectuée en deux étapes. Suite à la première réaction de PCR, deux portions de gènes ont été amplifiées: la portion qui code pour le coté N-terminal et celle qui code pour le coté C-terminal de l'*AxeA_{tr}*. Selon la mutation effectuée, différentes longueurs de produit de PCR sont attendues tel que décrit au tableau 5. La figure 12 montre que les différents fragments de PCR obtenus lors de la première étape de mutagenèse dirigée sont de l'ordre de grandeur attendu.

Le mélange des deux produits de PCR obtenus pour une même mutation (N-terminal et C-terminal) a ensuite servi de matrice pour l'amplification complète du gène comprenant la mutation désirée. Le produit de PCR final obtenu pour les quatre mutants est montré à la figure 13. Ainsi, pour les quatre mutations, un produit de PCR d'une longueur de 711 pb a été obtenu correspondant au gène de l'*axeA_{tr}*.

Tableau 5: Longueurs théoriques attendues des différents produits de PCR, pour les quatre mutants histidine, lors de la première étape de la mutagenèse dirigée.

Mutation	Longueur en pb de la portion du gène codant pour le côté N-terminal de l'AxeA_{tr}	Longueur en pb de la portion du gène codant pour le côté C-terminal de l'AxeA_{tr}
H62A	325	411
H66A	337	399
H68A	347	396
H155A	139	601

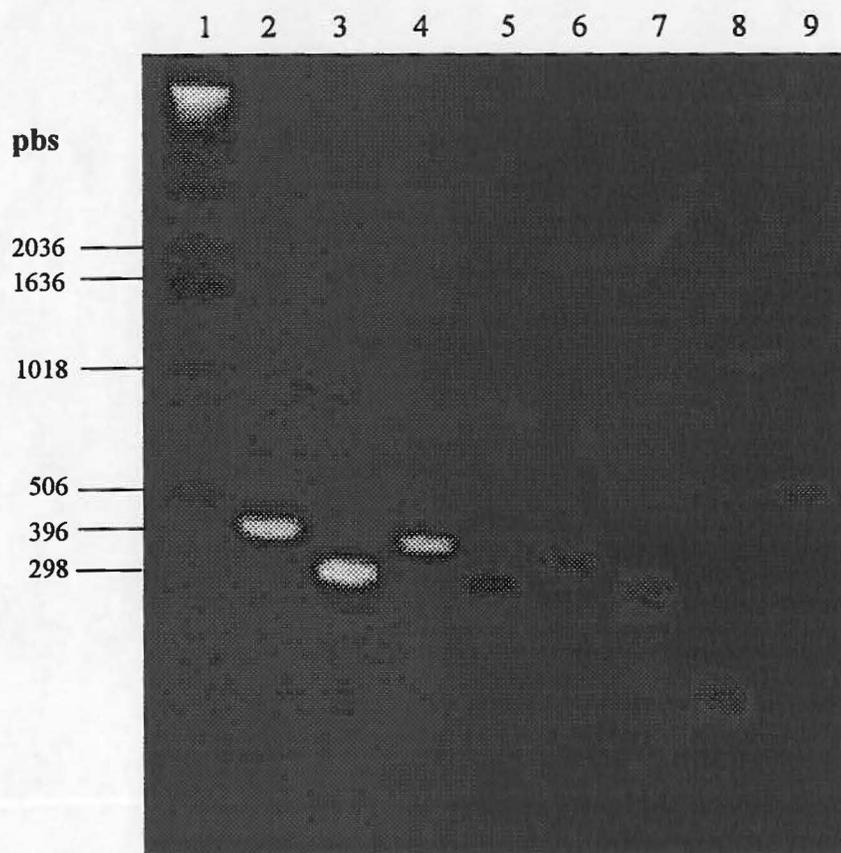


Figure 12: Analyse des produits de PCR obtenus lors de la première étape de la mutagenèse dirigée par séparation en gel d'agarose 1% (p/v).

Légende:

- 1 : marqueur de poids moléculaire d'ADN 1kb
- 2 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion N-terminale du mutant H62A
- 3 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion C-terminale du mutant H62A.
- 4 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion N-terminale du mutant H66A.
- 5 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion C-terminale du mutant H66A.
- 6 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion N-terminale du mutant H68A.
- 7 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion C-terminale du mutant H68A.
- 8 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion N-terminale du mutant H155A.
- 9 : amplicon du gène *axeA_{tr}* amplifiant la portion C-terminale du mutant H155A.

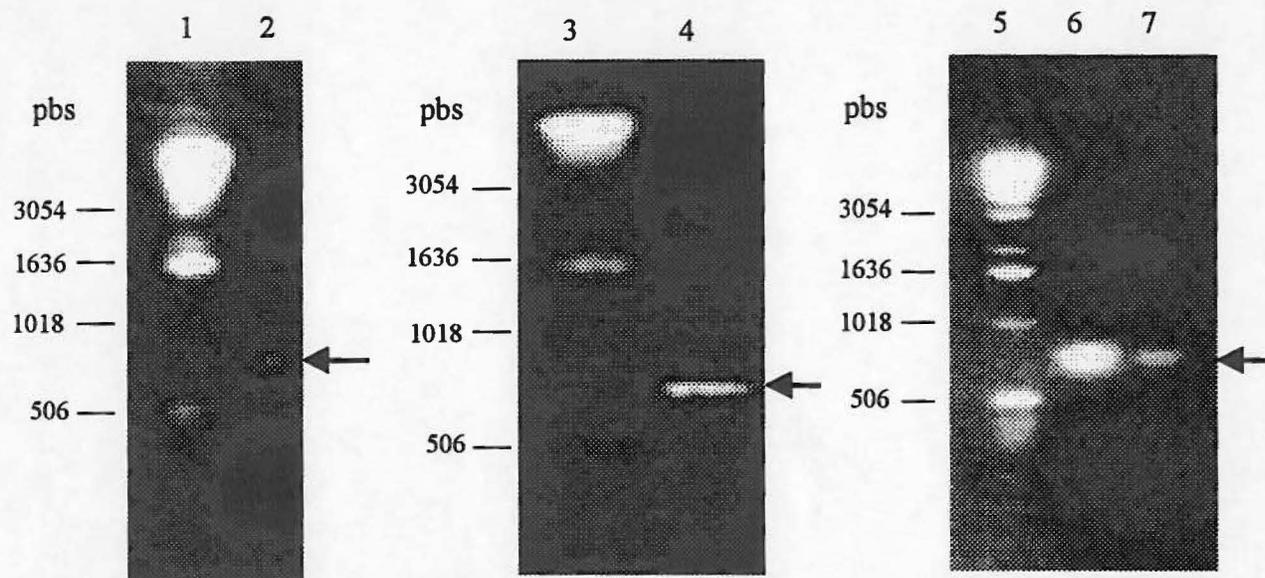


Figure 13: Analyse des produits de PCR obtenus lors de la deuxième étape de la mutagenèse dirigée par séparation en gel d'agarose 1% (p/v). Les flèches indiquent les fragments d'ADN d'intérêts.

Légende

- 1,3,5 : Marqueur de poids moléculaire d'ADN 1Kb
- 2 : amplicon de l'*axe*A_{tr} comprenant la mutation H62A
- 4 : amplicon de l'*axe*A_{tr} comprenant la mutation H68A
- 6 : amplicon de l'*axe*A_{tr} comprenant la mutation H66A
- 7 : amplicon de l'*axe*A_{tr} comprenant la mutation H155A

3.0 SÉQUENÇAGE ET SOUS-CLONAGE DES GÈNES MUTÉS

3.1 Production et purification d'ADN monocaténaire à l'aide du phage M13

Suite à la migration en gel d'agarose, les produits de PCR obtenus lors de l'amplification complète du gène, ont été purifiés du gel à l'aide de la trousse Band-Prep puis digérés par les enzymes *SphI* et *SacI*. Les phages M13mp18 et M13mp19 ont également été digérés par ces enzymes puis, après migration en gel d'agarose, ils ont été isolés du gel et liés aux produits de PCR digérés. Après transformation dans la souche *E. coli* DH11S et sélection à l'ampicilline et au IPTG/X-Gal, les plages de lyse blanches obtenues ont été repiquées afin d'en extraire l'ADN simple brin du phage. Une cartographie à la nucléase S1 a ensuite été effectuée pour vérifier la présence d'un insert d'ADN sous forme simple brin dans les phages M13mp18 et M13mp19. Une fois la présence d'un insert de longueur attendue (711 pb) vérifiée, l'ADN monocaténaire a été séquencé.

3.2 Analyse des séquences nucléotidiques

L'analyse des séquences nucléotidiques a permis de confirmer que chacun des quatre gènes mutés comportait la mutation attendue (codon CAC (His) modifié pour GCC (Ala)). Toutefois, l'analyse individuelle des séquences des quatre gènes mutés a montré l'insertion de trois nucléotides par rapport à la séquence originale (Shareck *et al.*, 1995) (figure 14). Ces trois nucléotides sont une guanidine à la position 403, une cytosine à la position 410 et une guanidine à la position 436. Afin de confirmer la présence de ces trois nucléotides, le gène sauvage original de l'*axeA* a été séquencé. L'analyse de la séquence du gène sauvage a confirmé la présence de ces trois nucléotides. Ainsi, une correction de la séquence originale de l'*axeA* a été apportée.

001 ATG CGT ACC AGT ACC GGA CCA CGC GCG TCC TCG CGC ACC CTG
 043 CGC ACC CTG GCT TCC GGC GTC GCC GTC ACC GCG CTC GCC GCC
 085 GCG GGC ACG GTG GCG GCC GGC GCC GCC CCG GCC CAG GCC GCG
 127 GCC TGC AAC GGT TAC GTC GGG CTC ACC TTC GAC GAC GGC CCC
 169 TCC GGC AGC ACC CAG TCC CTG CTC AAC GCG CTC AGG CAG AAC
 211 GGG CTG CGG GCC ACC ATG TTC AAC CAG GGG CAG TAC GCC GCC
 253 CAG AAC CCG TCC CTG GTC CGG GCC CAG GTC GAC GCC GGC ATG
 295 TGG GTC GCC AAC CAC AGC TAC ACC CAC CCG CAC ATG ACC CAG
 337 CTC GGC CAG GCC CAG ATG GAC TCG GAG ATC TCC CGG ACC CAG
 379 CAG GCC ATC GCG GGC GCC GGC GGC GGG ACG CCC AAG CTG TTC
 421 CGG CCG CCG TAC GGC GAG ACC AAC GCG ACG CTC CGG TCG GTC
 463 GAG GCC AAG TAC GGG CTG ACC GAG GTG ATC TGG GAC GTC GAC
 505 TCG CAG GAC TGG AAC AAC GCC AGT ACC GAC GCG ATC GTG CAG
 547 GCC GTC TCA CGG CTC GGC AAC GGC CAG GTC ATC CTC ATG CAC
 589 GAC TGG CCC GCC AAC ACG CTC GCG GCC ATC CCG CGC ATC GCG
 631 CAG ACC CTG GCG GGC AAG GGG CTG TGC TCC GGC ATG ATC TCG
 673 CCG CAG ACC GGC CGC GCG GTC GCT CCC GAC GGC AGT GGC GGC
 715 GGG GGA GAC GGC GGC GGG GGA GGC GGG GGC GCC TGC ACC GCG
 757 ACG CTG TCC GCC GGG CAG CGG TGG GGG GAC CGG TAC AAC CTC
 799 AAC GTC TCC GTC AGC GGT GCC AGT GAC TGG ACG GTG ACG ATG
 841 AAC GTG CCG TCC CCG GCG AAG GTC CTG TCG ACC TGG AAC GTC
 883 AAC GCC AGT TAC CCG AGC GCG CAG ACG CTG ACC GCC AAG TCC
 925 AAC GGC AGC GGC GGC AAC TGG GGC GCC ACC ATC CAG GCC AAC
 967 GGC AAC TGG ACC TGG CCC AGC GTG TCC TGT ACT GCG GGC TGA

Figure 14 : Correction de la séquence originale de l'*axeA* (No d'accèsion GenBank M64552). Les trois nucléotides en caractères rouges indiquent les bases nucléotidiques qui ont été ajoutées à la séquence d'ADN.

3.3 Sous-clonage des gènes mutés dans *S. lividans*

Une fois que les analyses des séquences ont confirmé les modifications des codons histidine, les produits de PCR des quatre gènes de l'*axeA_{tr}* mutés ont été digérés par les enzymes *SphI* et *SacI*. Le plasmide pC109 a également été digéré par ces mêmes enzymes. Après migration en gel d'agarose et isolement du plasmide linéarisé, ce dernier a été lié aux produits de PCR de l'*axeA_{tr}* ce qui résulte en la formation de quatre plasmides pIAF934 (figure 15) contenant chacun une mutation différente pour l'*axeA_{tr}*. Ces plasmides ont par la suite été transformés dans la souche *S. lividans* 10-164.

3.4 Sélection des transformants

Suite à la transformation dans *S. lividans*, des colonies présentant une résistance à la thiostreptone ont été obtenues. Ces colonies ont été inoculées dans un milieu M-14 contenant du thiostreptone et du glucose 1% (p/v). Après une croissance de 48 heures, les plasmides ont été extraits. Par la suite, les plasmides ont été digérés par les enzymes *SphI* et *SacI*, puis séparés en gel d'agarose afin de vérifier que ceux-ci comportent un insert de 711 pb. La figure 16 montre la présence, pour les quatre mutants, d'une bande à 5439 pb correspondant au plasmide pIAF934 digéré avec *SphI* et *SacI*, et d'une bande à 711 pb correspondant à la longueur attendue de l'insert de l'*axeA_{tr}*. Une fois que la présence d'un gène muté pour chaque souche ait été confirmé, les souches mutantes pour l'*AxeA_{tr}* ont été lyophilisées et conservées pour la production.

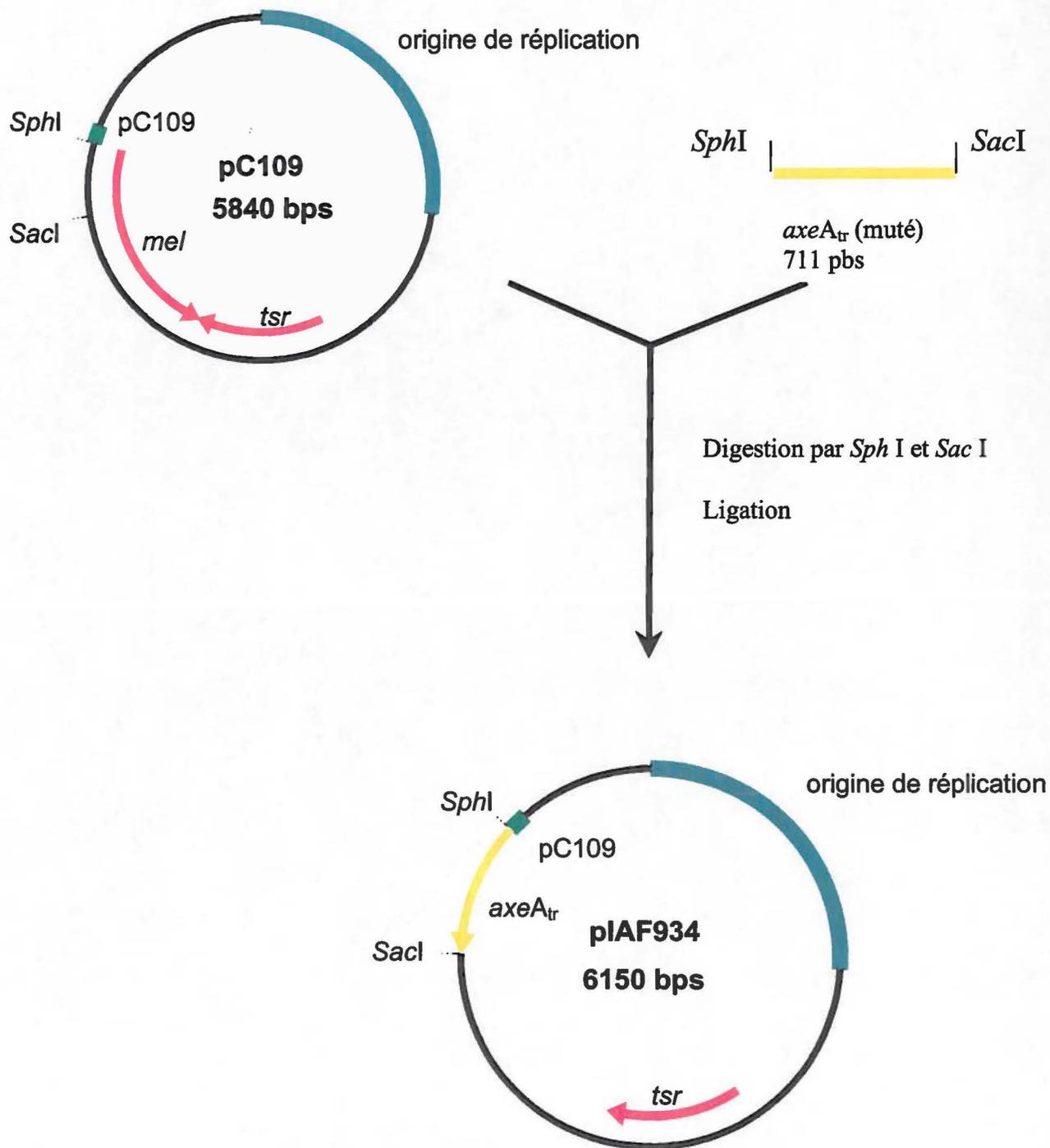


Figure 15 : Construction du plasmide pIAF934 à partir du plasmide pC109 et du gène de l'*axeA_{tr}*.

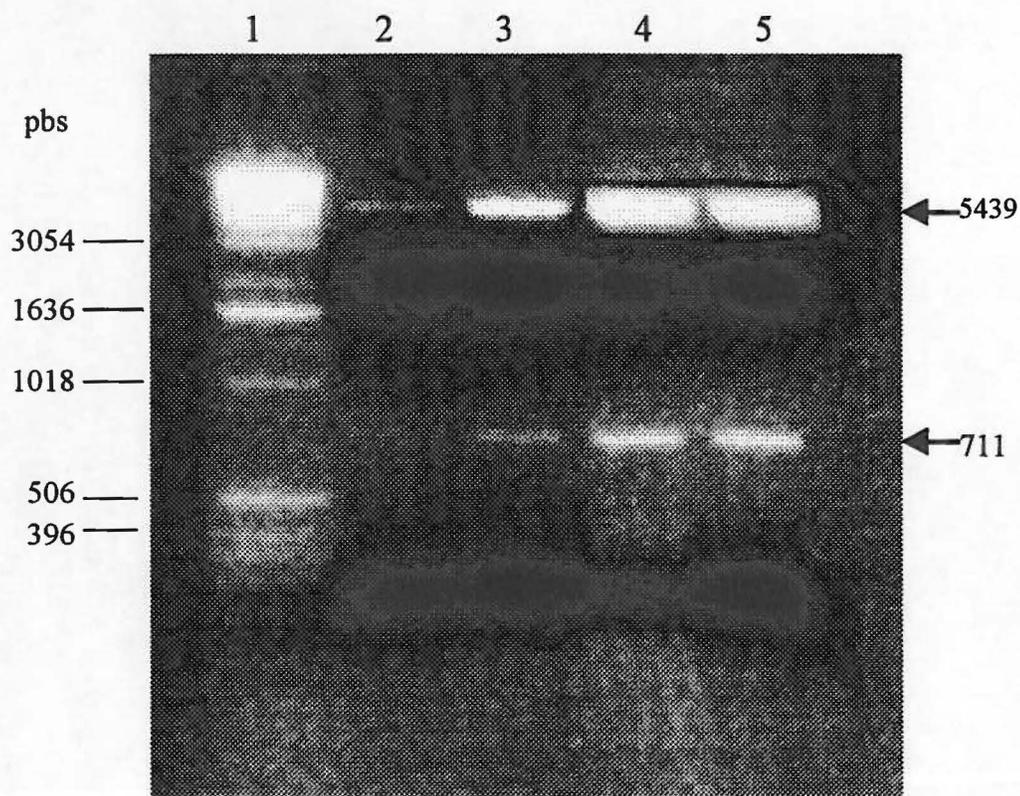


Figure 16 : Séparation des fragments d'ADN provenant des plasmides pIAF934 digérés par les endonucléases *SphI* et *SacI* en gel d'agarose 1% (p/v). Les flèches pointant les fragments d'ADN de 5439 et 711 pb correspondent respectivement au plasmide pIAF934 digéré avec *SphI* et *SacI* et à l'insert de l'*axeA_{tr}*.

Légende :

- 1 : Marqueur de poids moléculaire d'ADN 1kb
- 2 : plasmide pIAF934-H62A
- 3 : plasmide pIAF934-H66A
- 4 : plasmide pIAF934-H68A
- 5 : plasmide pIAF934-H155A

4.0 PRODUCTION

4.1 Production en fermenteur

L'enzyme sauvage et les enzymes modifiées ont été produites en fermenteur dans un milieu M-14 contenant du xylose comme source de carbone. Afin de vérifier la production d'enzymes, le pH et la masse cellulaire compacte humide ont été mesurés. Un dosage des protéines a également été effectué. Ces mesures sont présentées au tableau 6 pour la production de la souche sauvage et au tableau 7 pour les souches mutantes. C'est après 67 heures d'incubation que la quantité d'enzyme produite atteint un plateau. A ce stade, le pH du milieu a diminué à 5,3 pour l'enzyme sauvage et de 5,4 à 6,0 pour les enzymes mutantes. La masse cellulaire compacte humide était située entre 5% et 6,5% pour l'enzyme sauvage et pour les mutants. Suite à la production d'enzyme, les surnageants de culture ont été filtrés et les protéines totales du surnageant ont été concentrées.

5.0 PURIFICATION

5.1 Purification de l'enzyme sauvage

L'enzyme sauvage a été purifiée par chromatographie cationique suivi d'un tamis moléculaire. Le rendement de purification qui a été obtenu est de 22,4% (tableau 8). Les fractions de protéines récoltées ont été lavées, concentrées et conservées dans 5% (v/v) glycérol à -70°C.

Tableau 6: Détermination du pH, de la masse cellulaire compacte humide et de la concentration des protéines du surnageant de culture de la souche sauvage à différents temps d'incubation dans le milieu M 14 contenant 1% de xylose (p/v).

Temps d'incubation (h)	pH	Masse cellulaire compacte humide (%) (v/v)	Dosage des protéines (mg/mL)
22	7,0	1,0	0,45
29	7,0	1,0	0,47
44	6,4	3,5	0,66
55	5,7	4,5	0,65
67	5,3	5,0	0,76

Tableau 7: Détermination du pH, de la masse cellulaire compacte humide et de la concentration des protéines du surnageant de culture de différentes souches mutantes après 67 heures d'incubation, dans le milieu M 14 contenant 1% de xylose (p/v).

Souches	pH	Masse cellulaire compacte humide (%) (v/v)	Dosage des protéines (mg/mL)
IAF-H62A	6,0	6,0	0,84
IAF-H66A	5,9	5,5	0,55
IAF-H68A	5,4	6,5	0,70
IAF-H155A	5,9	6,0	0,69

Tableau 8: Tableau de purification de la souche sauvage de l'AxeA_{tr}. L'échantillon de départ provient d'une concentration par ultrafiltration des protéines totales du surnageant de culture.

Étape	Volume (mL)	Concentration (mg/mL)	Protéines totales (mg)	Rendement (%)
Échantillon de départ	14,0	11,5	161	100
CM-Sépharose	135	0,50	69,0	43
Tamis moléculaire	128	0,30	36,0	22

5.2 Purification des enzymes modifiées

Les enzymes mutantes ont été purifiées en une seule étape par tamis moléculaire. Les rendements de purification pour les enzymes mutantes H66A, H68A et H155A sont respectivement de 22%, 30% et 33% (tableau 9). Un faible rendement de 5% a été obtenu pour le mutant H62A. Les fractions de protéines récoltées ont été lavées, concentrées et conservées dans 5% glycérol à -70°C.

Suite à la purification de l'enzyme sauvage et des mutants, un gel de polyacrylamide et un immunobuvardage de type Western ont été effectués (figure 17). Les anticorps anti-AxeA ont réagi avec l'enzyme, indiquant que l'AxeA_{tr} fait bien partie des fractions purifiées. De plus, l'analyse des protéines mutantes purifiées par gel de polyacrylamide a montré la présence d'une bande majeure à une masse moléculaire apparente de 23 kDa. Une bande mineure à environ 21,5 kDa est également présente et correspond à la masse moléculaire du produit de dégradation de l'AxeA_{tr}.

Tableau 9: Tableau de purification des mutants de l'AxeA_{tr}. L'échantillon de départ provient d'une concentration par ultrafiltration des protéines totales du surnageant de culture.

Mutant	Étape	Volume (mL)	Concentration (mg/mL)	Protéines totales (mg)	Rendement (%)
IAF-H62A	Échantillon de départ	2,0	11,2	22,4	100
	Tamis moléculaire	38	0,03	1,14	5
IAF-H66A	Échantillon de départ	2,0	16,7	33,3	100
	Tamis Moléculaire	62	0,12	7,44	22
IAF-H68A	Échantillon de départ	2,0	13,1	26,3	100
	Tamis moléculaire	72	0,11	7,84	30
IAF-H155A	Echantillon de départ	2,0	13,5	27,1	100
	Tamis moléculaire	72	0,12	8,96	33

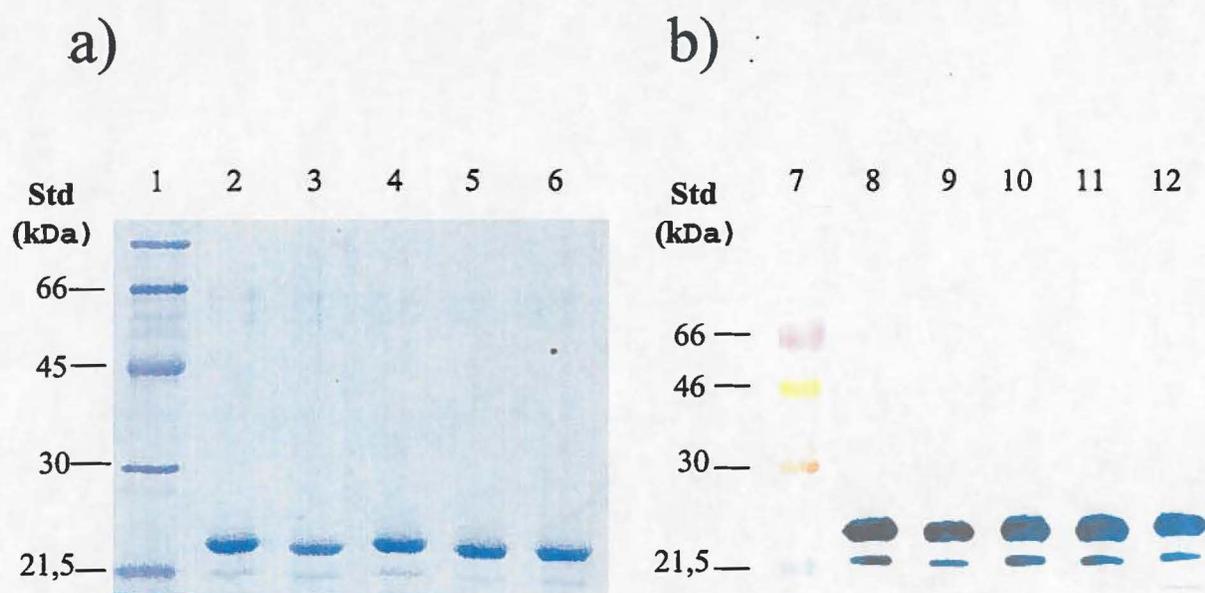


Figure 17 : a) SDS-Page et b) immunobuvardage de type Western de l' $AxeA_{tr}$ sauvage et des quatre enzymes mutantes.

Légende :

- 1 - 7 : Standard de protéines de faible poids moléculaire
- 2 - 8 : $AxeA_{tr}$ sauvage
- 3 - 9 : $AxeA_{tr}$ mutant H62A
- 4-10 : $AxeA_{tr}$ mutant H66A
- 5-11 : $AxeA_{tr}$ mutant H68A
- 6-12 : $AxeA_{tr}$ mutant H155A

6.0 CARACTÉRISATION DES ENZYMES PURIFIÉES

6.1 Caractéristiques physico-chimiques

Différentes caractéristiques physico-chimiques de l'AxeA_{tr} ont été mesurées et comparées avec celles de l'AxeA complète (comportant le domaine de fixation au xylane). Le tableau 10 compare le poids moléculaire apparent, le pI et l'activité spécifique de l'AxeA_{tr} et de l'AxeA complète. Ainsi, l'AxeA_{tr} présente un poids moléculaire apparent de 23 kDa comparativement à l'enzyme complète qui présente un poids moléculaire apparent de 30 kDa. Également, l'enzyme tronquée et l'enzyme complète ont des pI respectifs de 8,1 et 9,0. Les tests d'activité ont été effectués avec du xylane acétylé chimiquement. L'activité spécifique de l'enzyme tronquée représente 72% de celle de l'enzyme complète.

6.2 Activité spécifique des mutants

En utilisant du xylane acétylé chimiquement comme substrat, l'activité spécifique de chacune des enzymes mutantes a été comparée à celle de l'enzyme sauvage (tableau 11). Les résultats montrent qu'il y a une diminution considérable de l'activité spécifique pour trois des quatre mutants. En effet, les mutants H62A, H66A et H155A présentent respectivement des activités de 13%, 12% et 23% comparativement à l'enzyme sauvage alors que chez le mutant H68A cette activité est de 98%. Il est à noter que, lors de l'utilisation du xylane acétylé chimiquement comme substrat, la quantification de l'acide acétique par HPLC est difficile puisque le chromatogramme obtenu n'offre pas une bonne limite de résolution (figure 18 a). En effet, plusieurs composés xylooligosaccharides sont générés lors de l'utilisation du xylane acétylé, ce qui occasionne l'apparition d'un autre pic chevauchant celui de l'acide acétique. Il est donc difficile d'évaluer correctement et précisément la quantité d'acide acétique libéré.

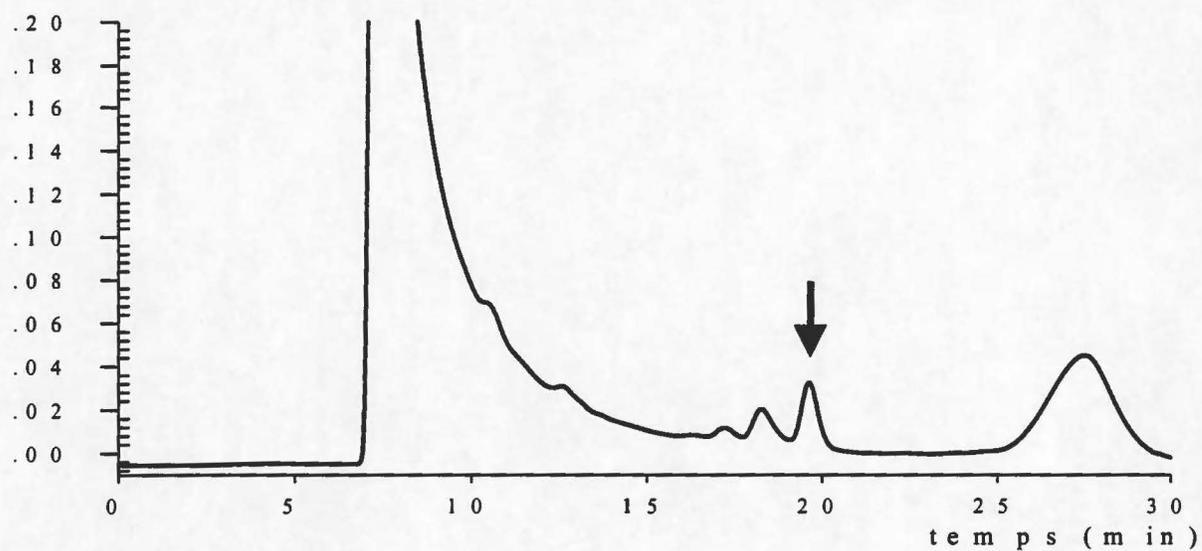
Tableau 10 : Comparaison du poids moléculaire apparent, du point isoélectrique et de l'activité spécifique de l'AxeA_{tr} et de l'AxeA complète.

Caractéristiques physico-chimiques	AxeA _{tr}	AxeA complète
PM apparent (kDa)	23	30
PI	8,1	9,0
Activité spécifique (UI/mg)	517	715

Tableau 11: Activité spécifique des mutants de l'AxeA_{tr}. Les tests d'activité ont été effectués avec 100 ng d'enzyme et en utilisant du xylane acétylé chimiquement 1% (p/v) comme substrat. La réaction enzymatique s'est effectuée pendant 10 min à 50°C. Les tests d'activités ont été effectués en triplicata.

Mutant	Activité spécifique (U.I./mg de protéines)	Rendement de l'activité spécifique en comparaison avec la souche sauvage (%)
AxeA _{tr}	517	100
H62A	67	13
H66A	62	12
H68A	508	98
H155A	120	23

a)



b)

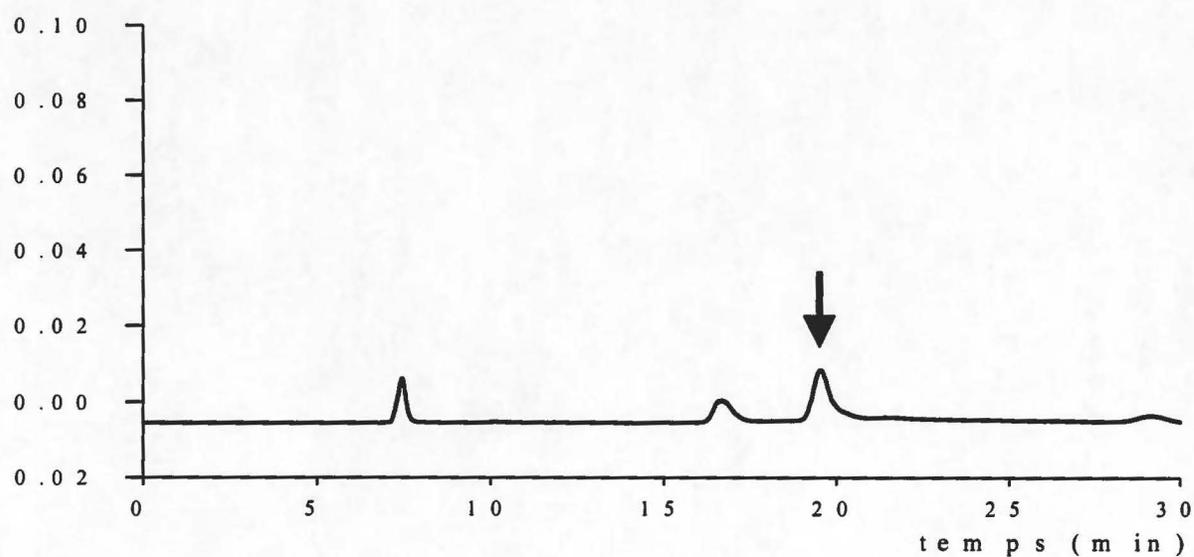


Figure 18 : a) Chromatogramme des composés générés lors de l'hydrolyse du xylane acétylé chimiquement et b) lors de l'hydrolyse du substrat méthyl tri-*O*-acétyl- β -D-xylopyranoside. La flèche indique le pic représentant l'acide acétique.

Une cinétique enzymatique a donc été effectuée en utilisant du méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside comme substrat (figure 19). Les tests d'activités effectués avec ce substrat permettent une mesure plus précise par HPLC de l'acide acétique libéré (figure 18 b). Les mesures d'activité enzymatique obtenues avec les mutants reflètent celles rencontrées avec le xylane acétylé chimiquement. A partir de cette cinétique enzymatique, l'activité spécifique a été calculée (tableau 12). Les mutants H62A, H66A et H155A présentent respectivement des activités de 3%, 14% et 4% comparativement à l'enzyme sauvage.

7.0 MODIFICATION CHIMIQUE DE L'*AxeA_{tr}*

7.1 Modification par le fluorure de benzyle sylfonyle (PMSF)

Afin de vérifier que l'*AxeA_{tr}* comporte une sérine active, l'enzyme a été incubée en présence de différentes concentrations de PMSF, qui est un inhibiteur à sérine protéases. Des tests d'activités spécifiques ont été effectués avec l'enzyme inhibée et les résultats obtenus ont démontrés qu'il y avait une diminution de l'activité enzymatique qui est dépendante de la concentration de l'inhibiteur utilisée (figure 20). Ainsi, une perte d'activité de 65% a pu être notée lorsque l'enzyme était en présence de 10 mM de PMSF pour une durée de 2 heures.

7.2 Modification par le diisopropyl fluorophosphate (DFP)

Le DFP est un inhibiteur puissant qui est reconnu pour se lier spécifiquement à la sérine nucléophile. Suite à une incubation d'une heure de l'enzyme avec le DFP, les tests d'activités spécifiques effectués ont montré qu'il y avait une perte d'activité de 85 % lorsque l'enzyme était en présence de l'inhibiteur (tableau 13). Dans le but de vérifier que l'inhibiteur s'est bien lié de façon spécifique à l'enzyme, des analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées.

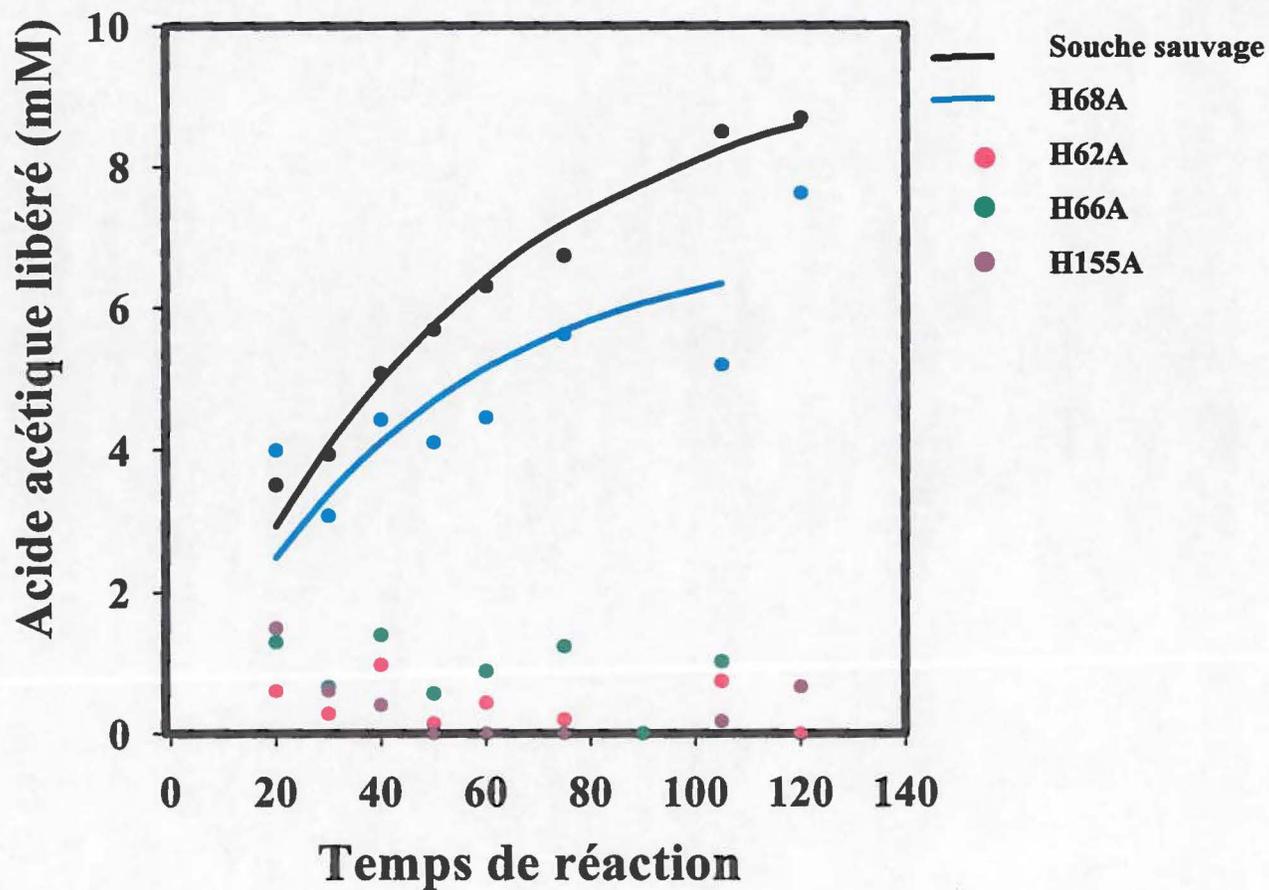


Figure 19 : Cinétique enzymatique de l'AxeA_{tr} et des mutants envers le substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside (14,5 mM). Les tests d'activité ont été effectués avec 75 μ g d'enzyme et à une température de 40° C.

Tableau 12 : Activité spécifique des mutants de l'AxeA_r envers le substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside (14,5 mM). Les tests d'activité ont été effectués avec 75 μ g d'enzyme à 40°C. L'activité spécifique a été mesurée pour un temps de réaction de 105 min.

Mutant	Activité spécifique (U.I./mg de protéines)	Rendement de l'activité spécifique en comparaison avec la souche sauvage (%)
AxeA _r sauvage	0,54	100
H62A	0,016	3
H66A	0,073	14
H68A	0,49	91
H155A	0,019	4

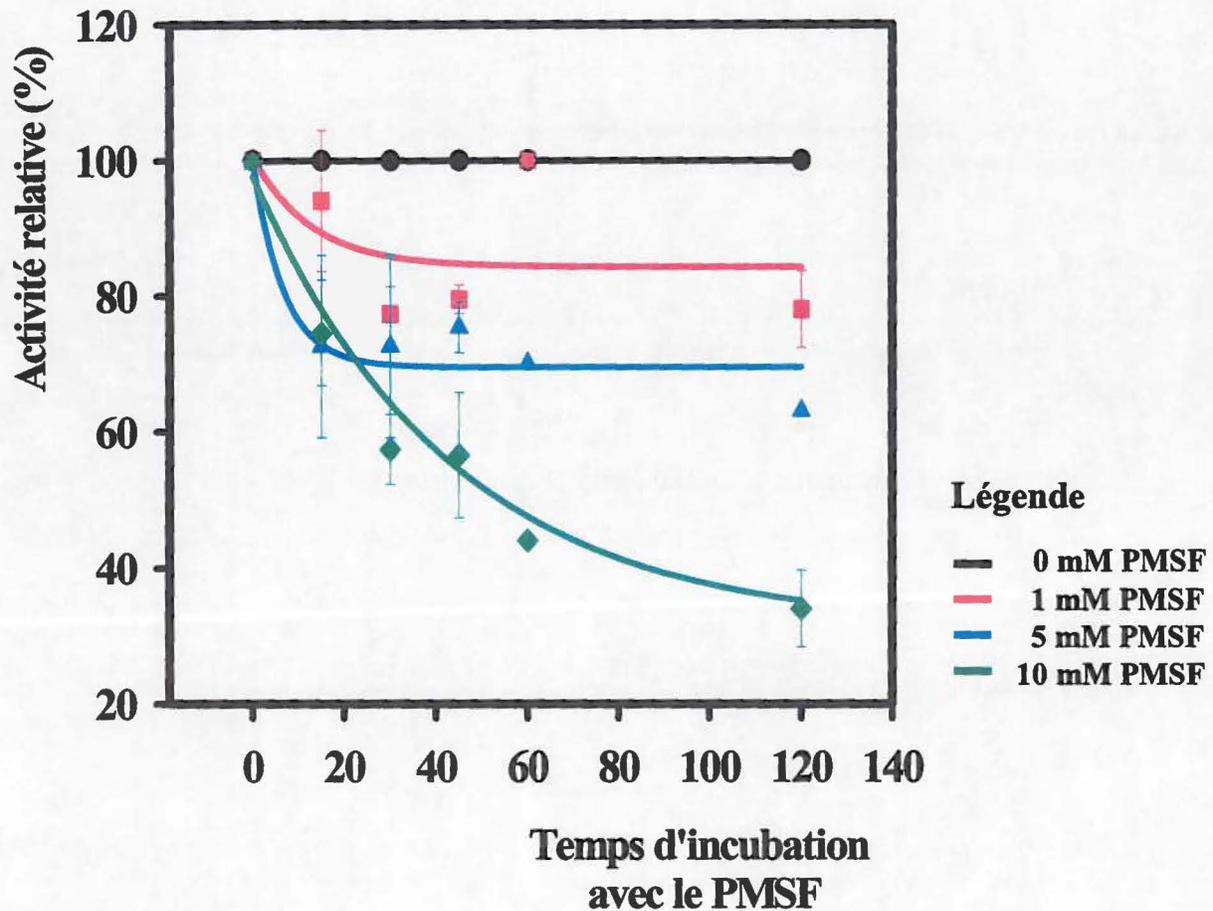


Figure 20 : Cinétique enzymatique de l'AxeA_{tr} inhibée au PMSF. La réaction d'inhibition s'est effectuée à la température de la pièce avec 0,3 μ g d'enzyme et différentes concentrations de PMSF. Après un temps d'incubation déterminée (entre 15 et 120 min) une concentration finale de 1% (p/v) de xylane acétylé chimiquement a été ajoutée. Le temps de réaction avec le substrat était de 30 min à la température de la pièce.

Tableau 13 : Comparaison entre l'activité spécifique de l'AxeA_{tr} inhibée avec le DFP avec l'activité spécifique de l'enzyme non-inhibée. Un rapport de 250 :1 (DFP : AxeA_{tr}) a été utilisé. La réaction d'inhibition a eu lieu pendant 1 heure à la température de la pièce. Les tests d'activité ont été effectués avec 100 ng d'enzyme et en utilisant du xylane acétylé chimiquement 1% (p/v) comme substrat. La réaction enzymatique a eu lieu pendant 10 min à 50°C.

Enzyme	Activité spécifique (U.I./mg)	Pourcentage d'activité (%)
AxeA _{tr} sans DFP	608 ± 80	100
AxeA _{tr} + DFP	93 ± 38	15

8.0 ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

8.1 Analyse par *electrospray*

8.1.1 Analyse de l'AxeA_{tr}

L'AxeA_{tr} purifiée a été injectée dans le spectromètre de masse puis analysée afin de vérifier que le conditionnement de l'appareil était adéquat et que l'enzyme utilisée était exempte de toute impureté. La figure 21 montre le spectre de masse des ions positifs correspondant à l'enzyme. La présence d'ions multiples chargés comportant de 9 à 16 protons liés à l'AxeA_{tr} est observée à la figure 21 aux valeurs m/z correspondantes. Ces dernières ont été ensuite transformées de façon à obtenir le profil de la masse moléculaire de l'enzyme (figure 22). Ce spectre indique que l'AxeA_{tr} a une masse moléculaire de 20 597 Da. De plus, un ion ayant une masse moléculaire de 20 614 Da était présent dans l'échantillon de l'enzyme purifiée.

Figure 21 : Spectre de masse des valeurs m/z de l'AxeA_{tr}. Le spectre a été obtenu avec un spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II en utilisant les conditions suivantes : un voltage de 3,45 kV au capillaire, un voltage de 55 V au cône, un voltage de 8 V pour l'extraction, une température de 80°C au bloc source et une température de 160°C pour la désolvation.

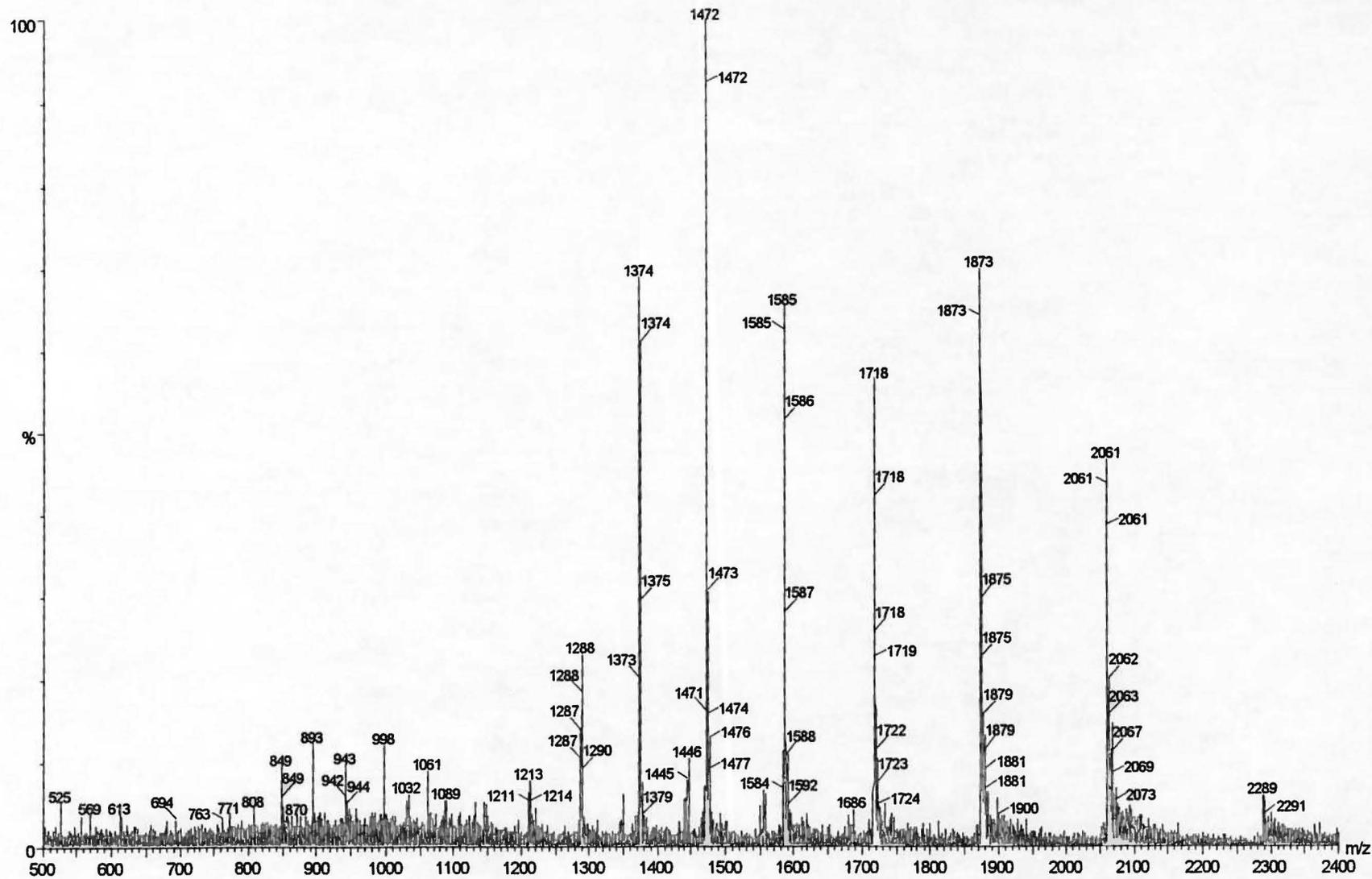
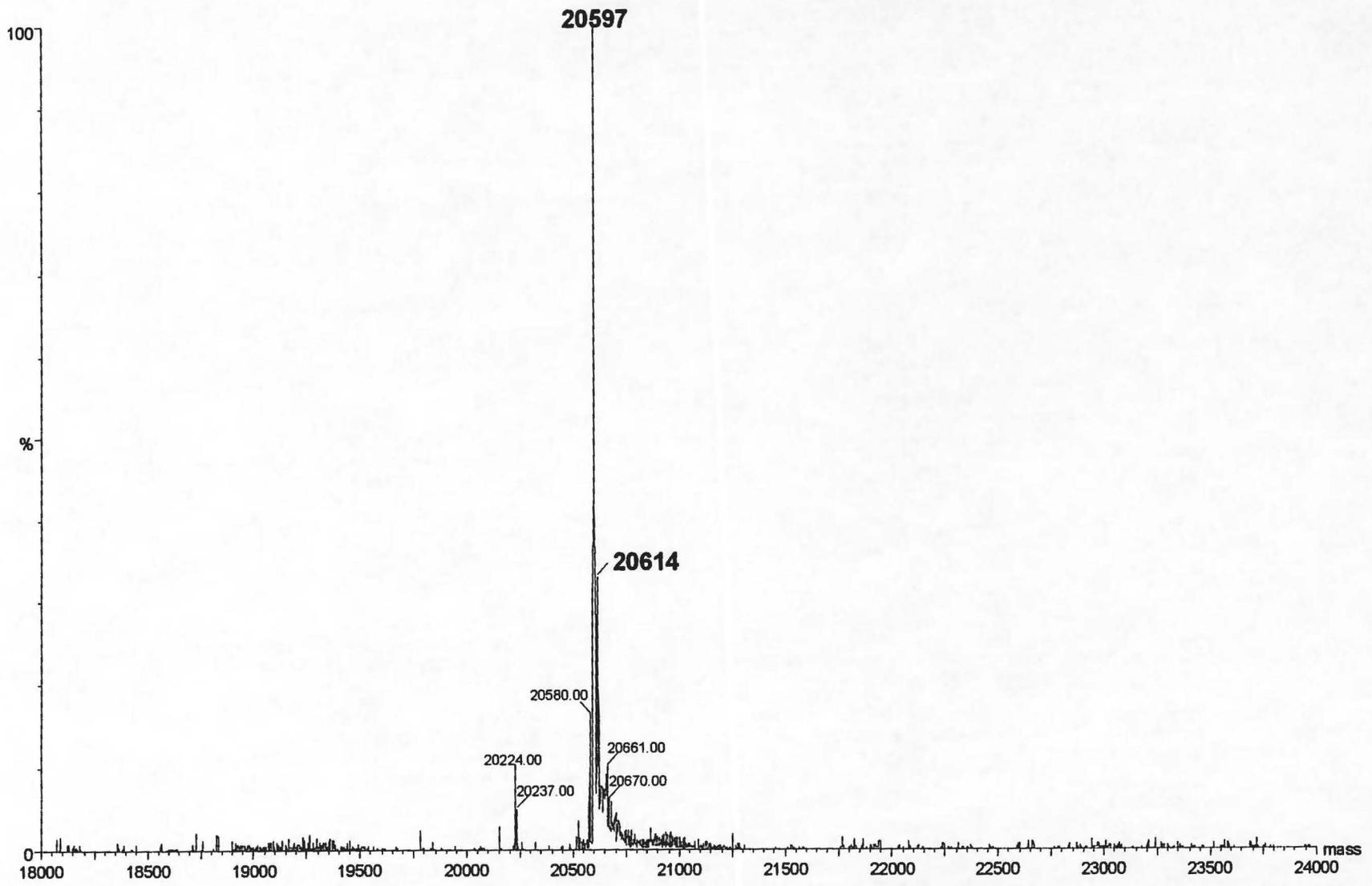


Figure 22 : Profil de la masse moléculaire de l'AxeA_r obtenu à partir de la transformation des valeurs m/z présentées à la figure 21. L'enzyme a été injectée dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 3,45 kV attribué au capillaire, un voltage de 55 V au cône, un voltage de 8 V pour l'extraction, une température de 80°C au bloc source et une température de 160°C attribuée à l'azote pour la désolvatation.



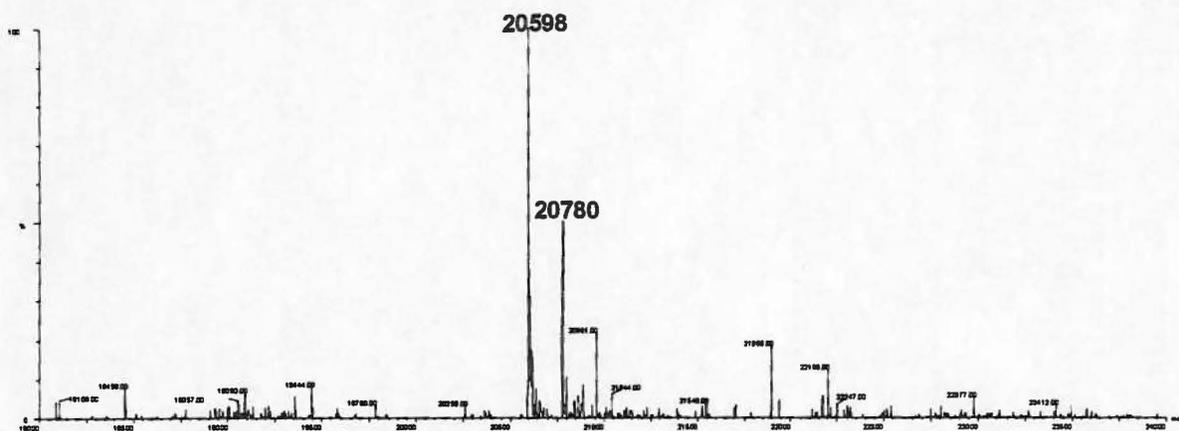
8.1.2 Analyse de l'AxeA_{tr} inhibée avec le DFP

L'AxeA_{tr} a par la suite été incubée pendant une heure en présence de DFP. Après la réaction d'inhibition, l'enzyme a été dialysée avec de l'eau afin d'éliminer le DFP excédentaire. Afin de confirmer l'addition du DFP à l'enzyme, le produit réactionnel dialysé a été injecté dans le spectromètre de masse. La figure 23 montre le spectre de masse electrospray obtenu pour différents voltages appliqué au cône soit de 21 V (figure 23 a) à 16 V (figure 23 b) et à 9 V (figure 23 c).

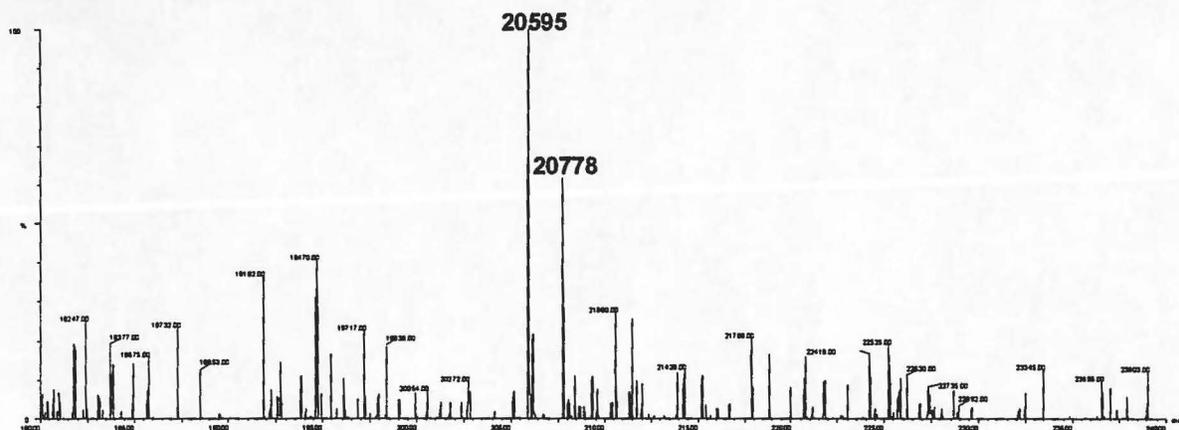
Le spectre de masse obtenu, lorsqu'un voltage de 21 V est appliqué au cône, montre une protéine dont la masse moléculaire 20 599 Da correspondant à la masse moléculaire de l'AxeA_{tr}. Ce spectre de masse montre également la présence d'une protéine à 20 781 Da correspondant à la masse moléculaire de l'AxeA_{tr} ayant un ajout de 182 Da. Ce fragment est présent dans une proportion d'environ 50% par rapport à la molécule de 20 599 Da (figure 23 a) tandis qu'avec un voltage de 16 V, cette proportion augmente à 65% (figure 23 b). Finalement, lorsque le voltage est diminué à 9 V, la proportion d'AxeA_{tr} ayant un ajout de 182 Da augmente à environ 140% (figure 23 c). De plus, ce profil moléculaire montre la présence de protéines ayant plusieurs ajouts de 182 Da. Ainsi, l'ion de 20 965 Da correspond à l'ajout de 2 molécules de 182 Da sur l'AxeA_{tr}; l'ion de 21 148 Da correspond à l'ajout de 3 molécules de 182 Da; l'ion de 21 332 Da correspond à la masse moléculaire de l'AxeA_{tr} avec 4 ajouts de 182 Da et l'ion à 21 514 Da correspond à l'ajout de 5 molécules de 182 Da par rapport à l'AxeA_{tr}.

Figure 23 : Profil moléculaire de l'AxeA_{tr} qui a été inhibée avec le DFP. L'inhibition au DFP a eu lieu en utilisant une concentration de 250 :1 (DFP : AxeA_{tr}). La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. Suite à la réaction d'inhibition, l'enzyme a été analysée au moyen d'un spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes: un voltage de 3,06 kV attribué au capillaire, a) un voltage de 21 V au cône, b) 16 V au cône, c) 9 V au cône, un voltage de 9 V pour l'extraction, une température de 80°C au bloc source et une température de 160°C attribuée à l'azote pour la désolvatation.

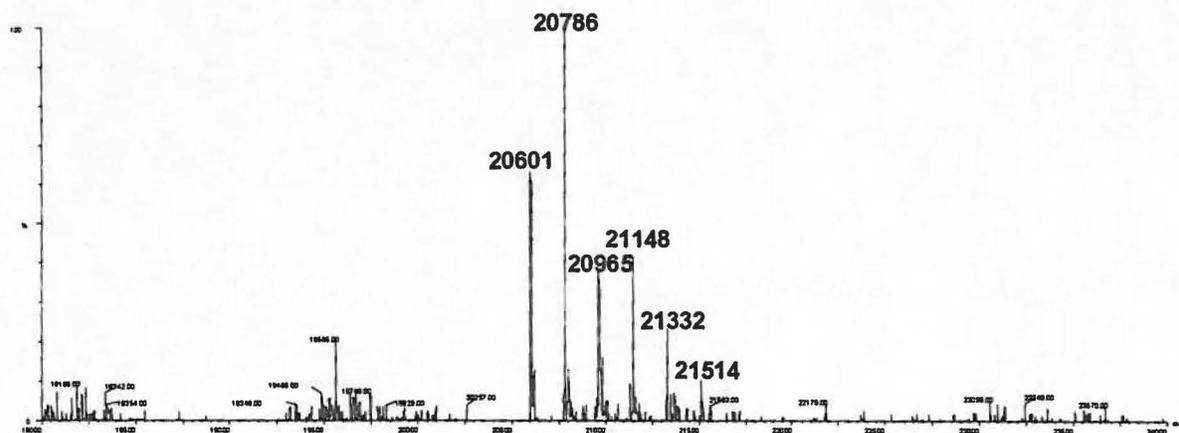
a)



b)



c)



8.2 Analyse en mode *nanoflow*

8.2.1 Analyse des peptides de l'AxeA_{tr}

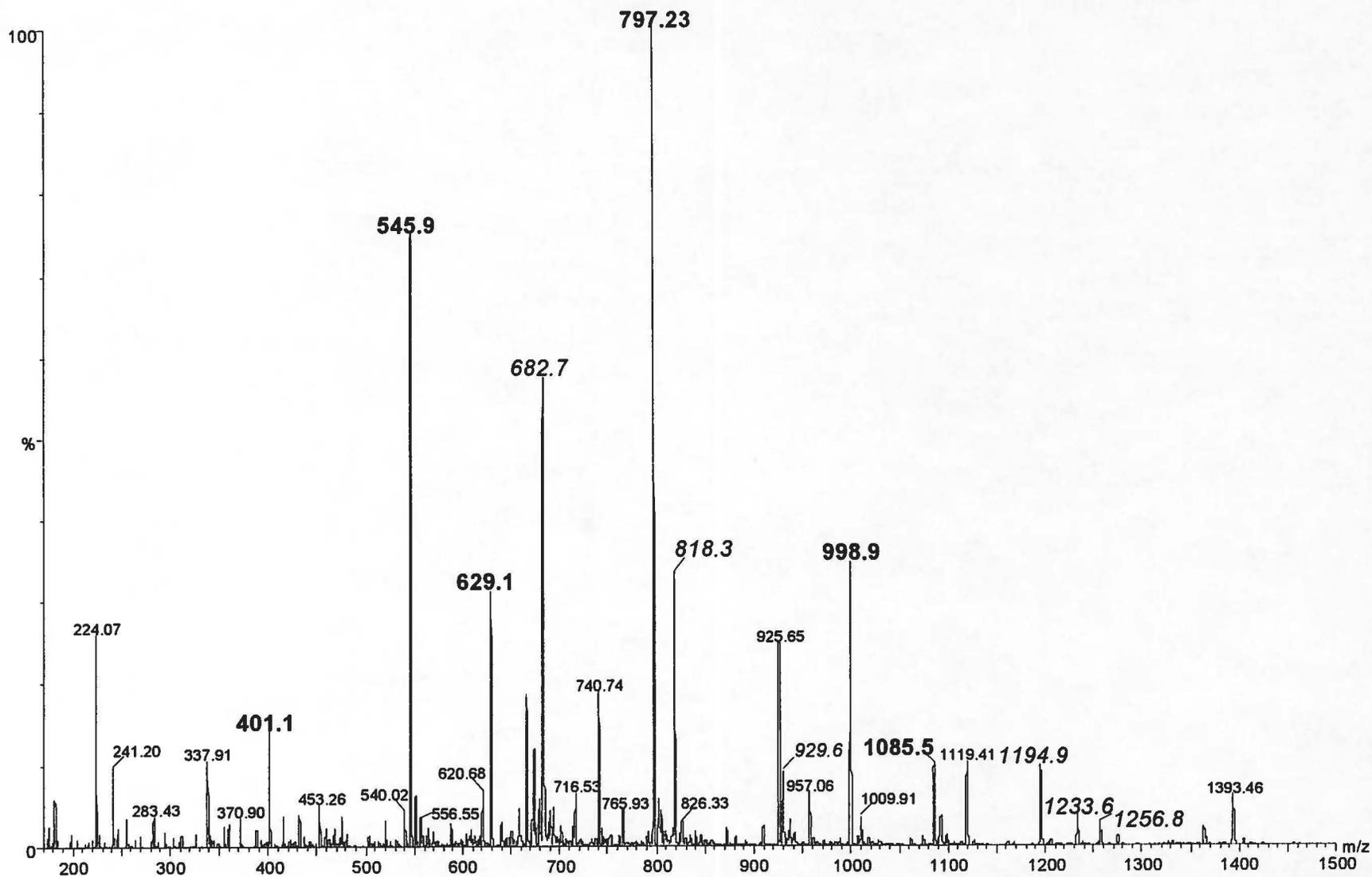
L'AxeA_{tr} a été digérée par la trypsine qui est une endoprotéinase qui clive les protéines du côté C-terminal des lysines et des arginines. Afin d'identifier les peptides générés, ceux-ci doivent être injectés dans le spectromètre de masse en mode *nanoflow*. Ce type d'injection permet d'effectuer le séquençage des ions peptidiques produits à l'intérieur de la cellule de collision du spectre de masse. Les ions fragments sont analysés en balayant le troisième quadrupole de l'appareil permettant le séquençage des peptides.

Les valeurs m/z théoriques correspondant aux ions doublement $(M+2H)^{2+}$ et triplement $(M+3H)^{3+}$ chargés des peptides générés lors de la digestion complète de l'AxeA_{tr} par la trypsine sont présentées au tableau 14. Comme l'indique ce tableau, 12 peptides théoriques peuvent être obtenus lors de la digestion complète de l'AxeA_{tr}. Une fois que l'AxeA_{tr} a été digérée par la trypsine, les peptides ont été purifiés (voir section approche expérimentale section 16.2) puis injectés dans le spectromètre de masse. La figure 24 présente le spectre de masse de la digestion tryptique de l'AxeA_{tr}. L'identité de chacun des peptides tryptiques a été confirmée par spectrométrie de masse en tandem. Les valeurs m/z indiquées en caractères gras sont des ions peptidiques de l'AxeA_{tr} qui ont pu être confirmés par séquençage. Les résultats du séquençage de ces peptides est présenté à l'annexe J. Les valeurs m/z indiquées en italique correspondent à des valeurs m/z théoriques de peptides de l'AxeA_{tr} mais dont le séquençage n'a pu être confirmé.

Tableau 14 : Peptides théoriques générés lors d'une digestion complète de l'AxeA_r par la trypsine. Les valeurs m/z théoriques de ces peptides chargés une fois (M+H) deux fois (M+2H) et trois fois (M+3H) ont été calculées.

No d'acide aminé	Séquences de peptides	Masse théorique	M+H	M+2H	M+3H
1-27	AACNGYVGLTFDDGPSGSTQSLNLR	2783,32	2784,33	1392,67	928,78
28-32	QNGLR	586,32	587,33	294,17	196,45
33-50	ATMFNQGYAAQNPSLVR	1994,96	1995,97	998,49	666,00
51-83	AQVDAGMWVANHSYTHPHMTQLGQAQMDSEISR	3698,10	3699,10	1850,06	1233,71
84-97	TQQAIAAGAGGGTPK	1255,65	1256,66	628,83	419,56
98-111	LFRPPYGETNATLR	1633,86	1634,87	817,94	545,63
112-116	SVEAK	532,29	533,29	267,15	178,44
117-145	YGLTEVIWDVDSQDWNNASTDAIVQAVSR	3251,54	3252,54	1626,78	1084,85
146-167	LGNGQVILMHDWPANTLAAIPR	2386,26	2387,27	1194,14	796,43
168-175	IAQTLAGK	800,48	801,48	401,25	267,83
176-188	GLCSGMISPQTGR	1362,64	1363,65	682,33	455,22
189-195	AVAPDGS	615,29	616,29	308,65	206,10

Figure 24 : Spectre de masse des valeurs m/z des peptides de l'AxeA_{tr} digérée avec la trypsine. La digestion a eu lieu à 37°C pendant 18 heures avec un ratio de trypsine 1:20 (p/p) par rapport à l'AxeA_{tr}. Les peptides ont été injectés dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 0,89 V au capillaire, un voltage de 5 V au cône, un voltage de 3 V pour l'extraction et une température de 80°C au bloc source. Les valeurs illustrées en caractères gras représentent des peptides générés par une digestion complète de l'AxeA_{tr} et qui ont été confirmés par séquençage. Les valeurs indiquées en italique correspondent à des valeurs m/z théoriques de peptides de l'AxeA_{tr} mais dont le séquençage n'a pas pu être confirmé.



8.2.2 Analyse des peptides de l'AxeA_{tr} inhibée au DFP

Les peptides obtenus suite à l'inhibition de l'AxeA_{tr} par le DFP ont été comparés à ceux de l'AxeA_{tr} non-inhibée. Les spectres de masse des valeurs m/z de ces peptides sont présentés à la figure 25. Les valeurs indiquées en caractères gras correspondent aux valeurs de m/z théoriques des peptides issus de la digestion complète de l'AxeA_{tr}. Comme l'indique ces spectres de masse, les ions peptidiques obtenus à partir de l'enzyme inhibée au DFP ne semblent pas présenter de valeurs m/z différentes de celles des ions peptidiques générés à partir de l'enzyme non-inhibée. Il est à noter que, suite à la digestion de l'AxeA_{tr} avec et sans DFP, le séquençage a permis et de confirmer la présence de six peptides.

9.0 INHIBITION AU [³H]DFP

9.1 Analyse des peptides de l'AxeA_{tr} marqués au [³H]DFP

L'analyse des peptides en mode *nanoflow* ne peut être complète puisque seulement six peptides des douze ont pu être identifiés. Ainsi, du DFP marqué au tritium (³H]DFP) a été utilisé dans le but de repérer le positionnement de l'inhibiteur lors de sa réaction avec l'enzyme. Après l'inhibition, l'enzyme inhibée a été digérée et les peptides ont été séparés par HPLC. Différentes fractions ont été récoltées du HPLC et la radioactivité pour chacune de ces fractions a été mesurée. L'histogramme de la figure 26 indique que la fraction correspondant à un temps d'élution de 21 minutes présente l'intensité de radioactivité la plus élevée. Or, le profil HPLC montre également la présence d'un pic à ce même temps d'élution.

Figure 25 : a) Spectre de masse des peptides tryptiques de l'AxeA_{tr} et b) de l'AxeA_{tr} inhibée au DFP. L'inhibition au DFP a eu lieu en utilisant un ratio de concentration inhibiteur/enzyme de 250. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. La digestion a eu lieu à 37°C pendant 18 heures avec un ratio trypsine : AxeA_{tr} de 1:20 (p/p) . Les peptides ont été injectés dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 0,89 V au capillaire, un voltage de 5 V au cône, un voltage de 3 V pour l'extraction et une température de 80°C au bloc source. Les valeurs indiquées en caractères gras correspondent aux valeurs m/z théoriques des peptides issus de la digestion complète de l'AxeA_{tr}.

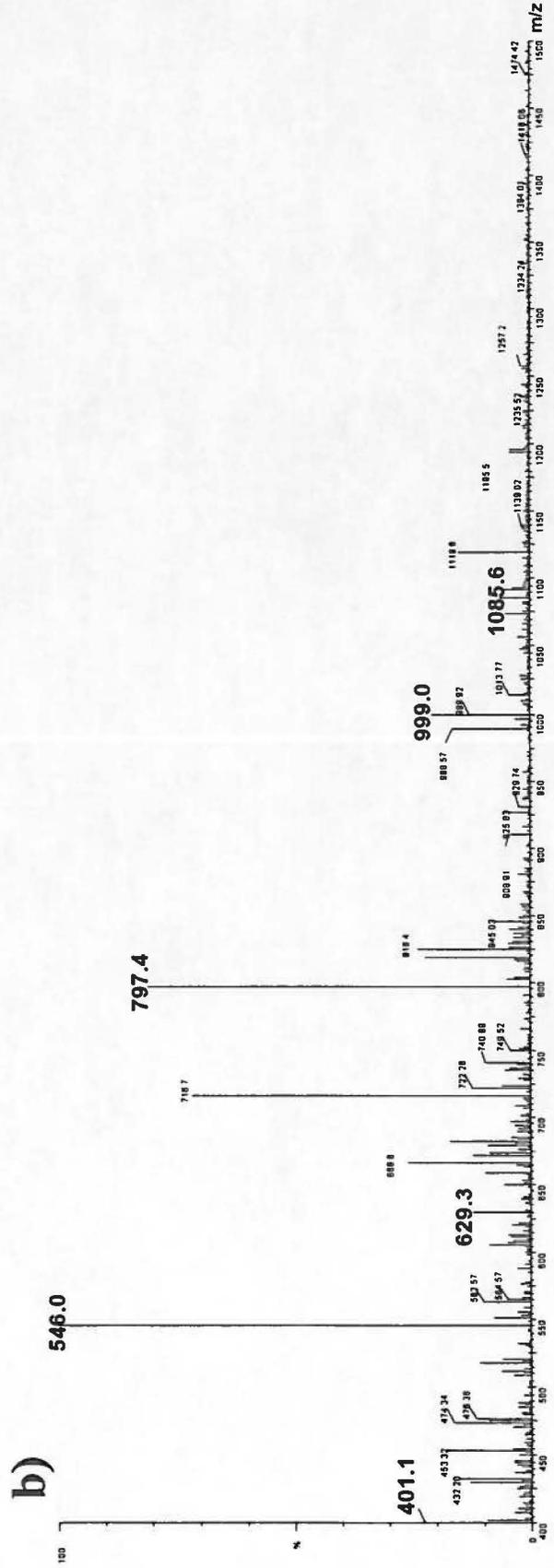
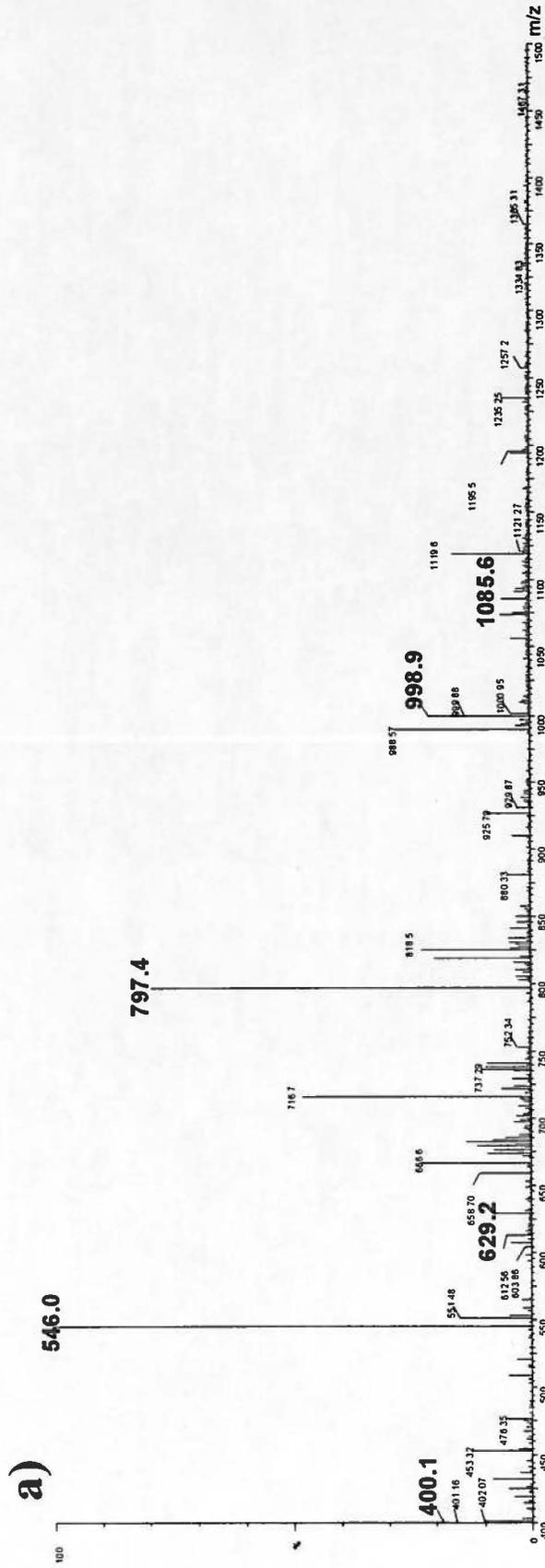
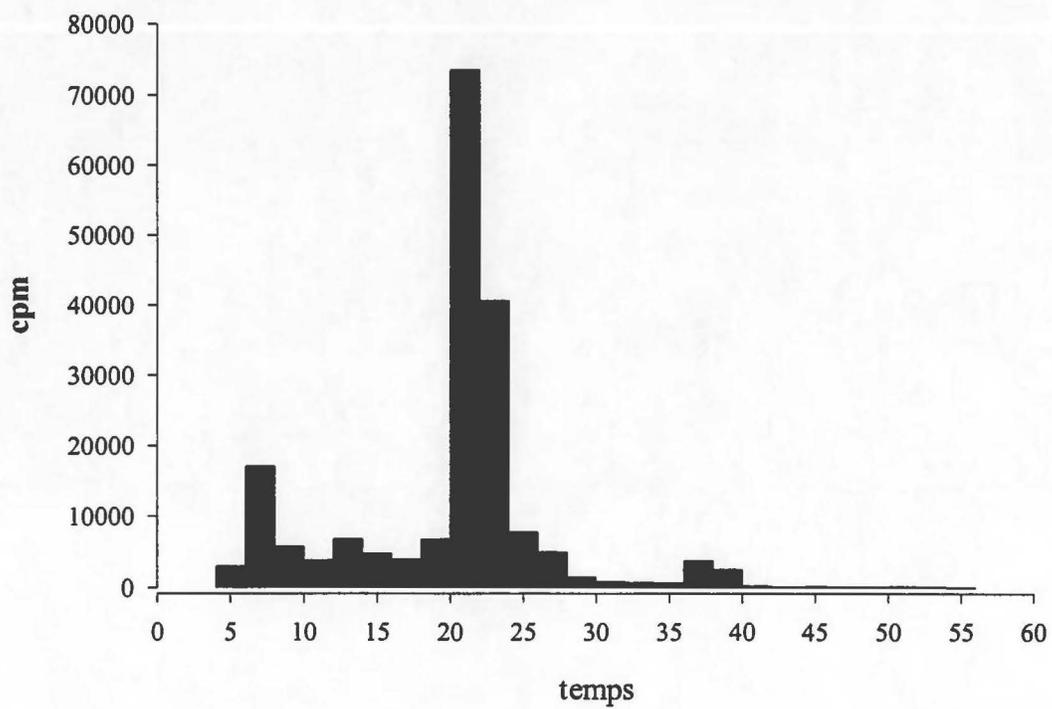


Figure 26 : Chromatogramme des peptides de l'AxeA_{tr} inhibée au [³H]DFP et histogramme représentant la radioactivité des fractions recueillies du HPLC. L'inhibition a eu lieu en utilisant 4,44 MBq de [³H]DFP et une concentration 250 fois plus élevée de DFP froid (non-marqué radioactivement) que d'enzyme. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. La digestion a eu lieu à 37°C pendant 18 heures en utilisant la trypsine comme endoprotéinase dans un ratio 1:20 (p/p) par rapport à l'AxeA_{tr}. Les peptides ont été séparés par HPLC (Waters) en utilisant une colonne à phase inversée C₁₈ de dimensions de 3,9 mm x 150 mm, et de l'acétonitrile comme éluant. Les fractions ont été recueillies à chaque deux minutes et la radioactivité a été mesurée. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 215 nm



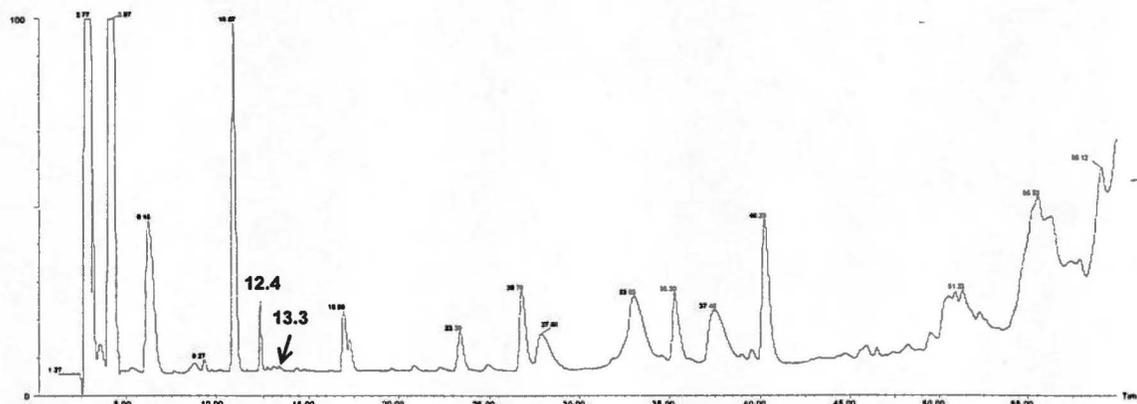
Afin d'identifier ce pic d'élution, un échantillon de peptides issu de la digestion de l'AxeA_{tr} inhibée uniquement avec le DFP non marqué radioactivement, a été analysé par LC/MS. Le LC/MS permet une analyse concomitante du chromatogramme et du spectre de masse des peptides. Une colonne à phase inversée C₁₈ et un détecteur aux ultra-violettes ont été branchés en série avec le spectromètre de masse. Les dimensions de la colonne C₁₈ (4 mm X 125 mm) branchée au spectromètre de masse sont plus petites que la colonne C₁₈ (3,9 X 150 mm) utilisée lors du marquage radioactif (HPLC Waters). Par conséquent, le profil d'élution du chromatogramme obtenu lors de l'analyse par LC/MS diffère de celui obtenu à la figure 26. Ainsi, le peptide obtenu à un temps d'élution de 21,0 min par le système HPLC de Waters correspond à un temps d'élution de 12,4 min dans les conditions utilisées par l'analyse au LC/MS (figure 27 a).

L'analyse du spectre de masse de ce pic à un temps d'élution de 12,4 min indique la présence d'un ion (M+H) à m/z de 616 (figure 27 b) correspondant au peptide AVAPDGS (tableau 14). Ce peptide comporte une sérine qui est située à la position 195 des acides aminés de l'AxeA_{tr}. Il est à noter qu'un ion à m/z 183 correspondant à la masse moléculaire de l'inhibiteur, a également été détecté à un temps d'élution de 13,3 min (figure 27 c). De plus, ce spectre de masse montre la présence d'ions qui sont des multiples de 182 Da.

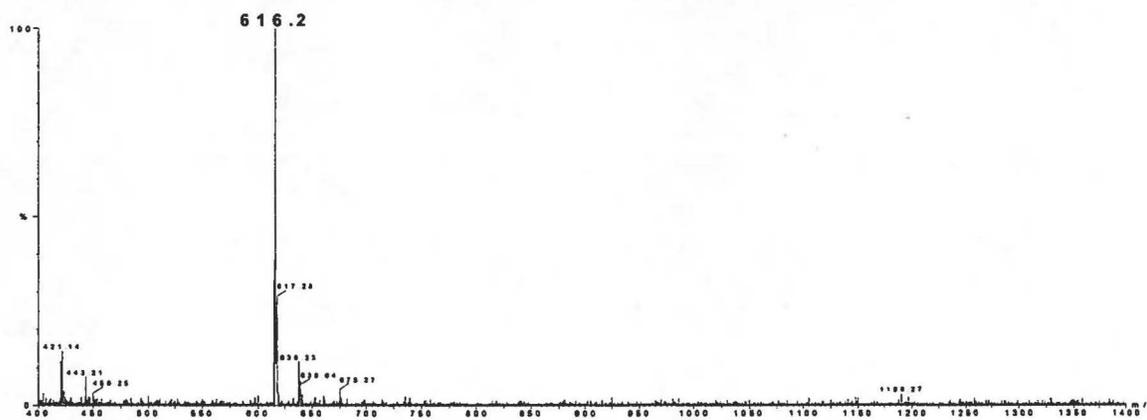
L'analyse par LC/MS a également permis d'identifier les douze peptides qui devaient être théoriquement obtenus lors de la digestion complète de l'AxeA_{tr}. Les valeurs m/z obtenus des peptides sont présentées à l'annexe K.

Figure 27 : a) Chromatogramme des peptides issus de la digestion de l'AxeA_{tr} inhibée au DFP. b) Spectre de masse correspondant au pic d'élution de 12,4 min et c) spectre de masse correspondant au pic d'élution de 13,3 min. L'inhibition a eu lieu en utilisant uniquement du DFP non marqué radioactivement avec un ratio de concentration inhibiteur : enzyme de 250 :1. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. La digestion a eu lieu à 37°C pendant 18 heures en utilisant la trypsine comme endoprotéinase dans un ratio 1 : 20 (p/p) par rapport à l'AxeA_{tr}. L'échantillon de peptides a été injecté au système LC/MS où une colonne à phase inversée C₁₈ branchée sur un HPLC (Hewlett Packard), a été utilisée pour la chromatographie à phase liquide. Le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II a été utilisé pour obtenir la masse moléculaire des peptides. Les conditions utilisées au LC/MS sont les suivantes : un voltage de 3,16 kV attribué au capillaire, un voltage de 12 V au cône, une température de 120°C au bloc source et une température de 180°C pour la désolvatation. Pour la chromatographie, une colonne C₁₈ de dimension 4,0 mm X 125 mm a été utilisée. Un débit linéaire de 48 cm/h a été appliqué et de l'acétonitrile 68% (v/v) a été utilisé comme éluant.

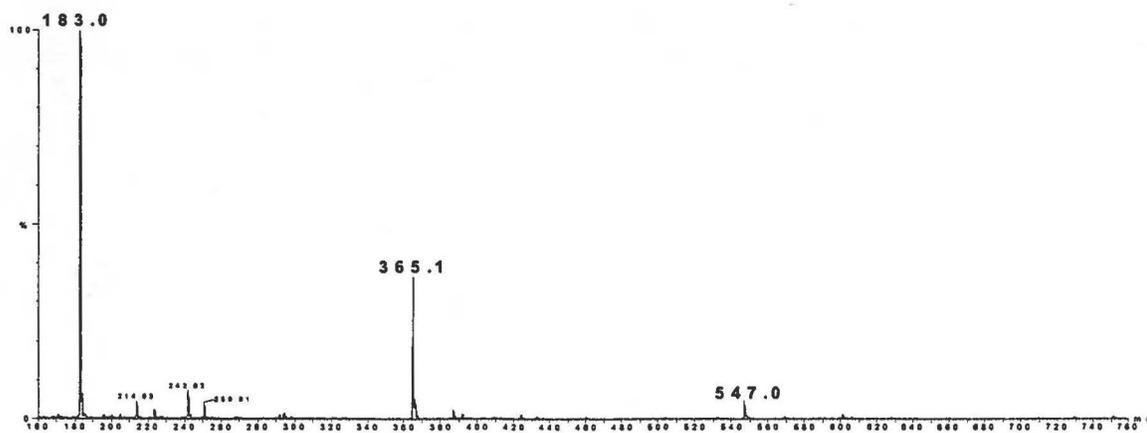
a)



b)



c)



9.2 Analyse de l'AxeA complète inhibée au [³H]DFP

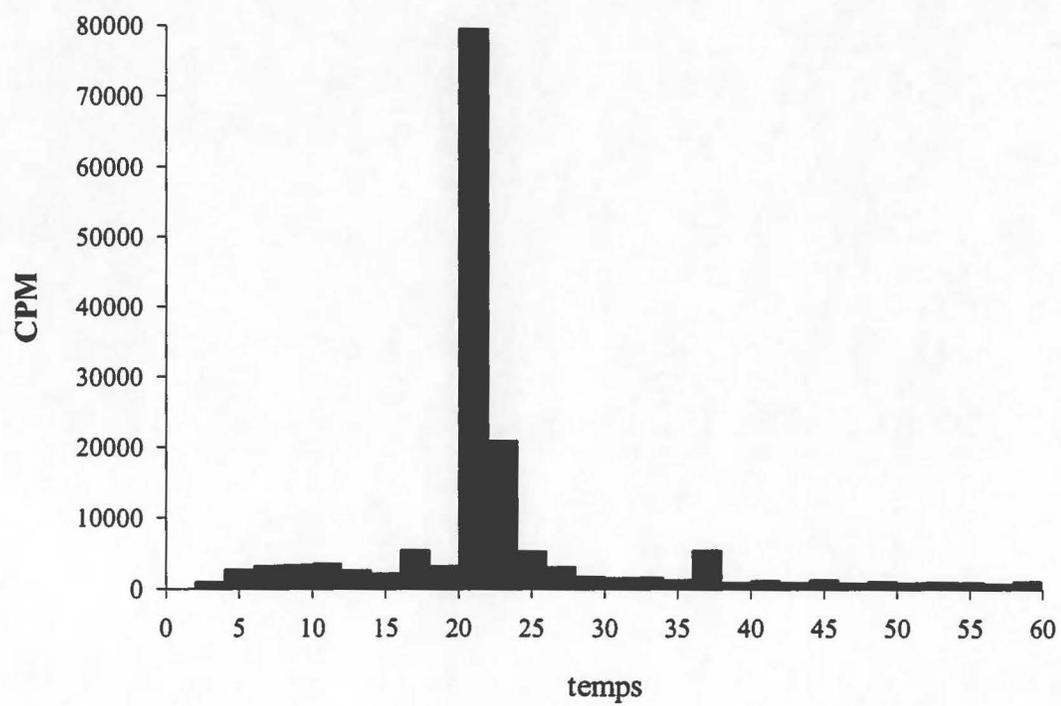
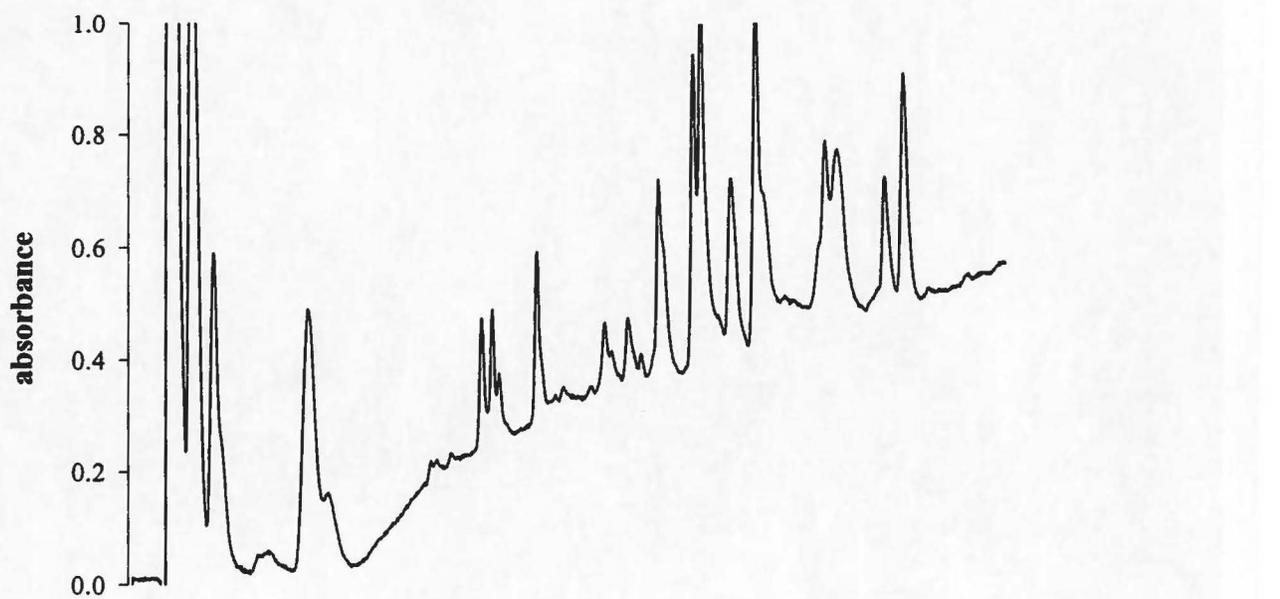
Les analyses effectuées sur l'AxeA_{tr} inhibée au [³H]DFP indiquent que la radioactivité est associée à un peptide de 616 Da. Afin de vérifier que cette radioactivité mesurée est bien associée au peptide AVAPDGS de 616 Da, la réaction d'inhibition et la digestion peptidique ont été effectuées avec l'AxeA complète qui comporte le domaine de fixation au xylane. L'AxeA complète comporte 294 acides aminés comparativement à 195 acides aminés pour l'AxeA_{tr}. Étant donné que la trypsine clive du côté C-terminal des lysines et des arginines, il n'y aura pas la formation du peptide AVAPDGS lors de la digestion de l'AxeA complète. Les peptides théoriques issus de cette digestion de l'AxeA complète sont présentés au tableau 15. Ainsi, la sérine à la position 195 fait maintenant partie d'un peptide de 30 acides aminés ayant une masse moléculaire de 2474 Da suite à la digestion peptidique de l'AxeA complète.

L'AxeA complète a été incubée en présence de [³H]DFP. Après l'inhibition, l'enzyme a été digérée et les peptides ont été séparés par HPLC. Différentes fractions ont été récoltées du HPLC et la radioactivité pour chacune de ces fractions a été mesurée (figure 28). Le chromatogramme du profil d'élution des peptides montre qu'il n'y a plus de pic à un temps d'élution de 21 min comme c'était le cas lors de la digestion de l'AxeA_{tr}. Toutefois, l'histogramme représenté à cette figure indique que c'est toujours la fraction correspondant à un temps d'élution de 21 min qui présente l'intensité de radioactivité la plus élevée.

Tableau 15 : Peptides théoriques générés lors de la digestion complète de l'AxeA complète par la trypsine. Les valeurs de m/z théoriques de ces peptides chargés une fois (M+H) deux fois (M+2H) et trois fois (M+3H) ont été calculées. La sérine 195 est indiquée en caractère gras.

No d'acide aminé	Séquences de peptides	Masse théorique	M+H	M+2H	M+3H
1-27	AACNGYVGLTFDDGPSGSTQSLNLR	2783,32	2784,33	1392,67	928,78
28-32	QNGLR	586,32	587,33	294,17	196,45
33-50	ATMFNQGYAAQNPSLVR	1994,96	1995,97	998,49	666,00
51-83	AQVDAGMWVANHSYTHPHMTQLGQAQMDSEISR	3698,10	3699,10	1850,06	1233,71
84-97	TQQAIAAGGGGTPK	1255,65	1256,66	628,83	419,56
98-111	LFRPPYGETNATLR	1633,86	1634,87	817,94	545,63
112-116	SVEAK	532,29	533,29	267,15	178,44
117-145	YGLTEVIWDVDSQDWNNASTDAIVQAVSR	3251,54	3252,54	1626,78	1084,85
146-167	LGNGQVILMHDWPANTLAAIPR	2386,26	2387,27	1194,14	796,43
168-175	IAQTLAGK	800,48	801,48	401,25	267,83
176-188	GLCSGMISPQTGR	1362,64	1363,65	682,33	455,22
189-218	AVAPDGSGGGGDGGGGGGGACTATLSAGQR	2474,08	2475,09	1238,05	825,70
219-222	WGDR	532,24	533,25	267,13	178,42
223-246	YNLNVSVSGASDWTVTMNVPSPAK	2536,23	2537,23	1269,12	846,42
247-266	VLSTWNVNASYPSAQTLTAK	2150,10	2151,11	1076,06	717,71
267-294	SNGSGGNWGATIQANGNWTWPSVSCTAG	2836,23	2837,23	1419,12	946,42

Figure 28 : Chromatogramme des peptides de l'AxeA complète inhibée au [³H]DFP et histogramme représentant la radioactivité des fractions recueillies du HPLC. L'inhibition a eu lieu en utilisant 4,44 MBq [³H]DFP et une concentration 250 fois plus élevée de DFP froid que d'enzyme. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. La digestion a eu lieu à 37°C pendant 18 heures en utilisant la trypsine comme endoprotéinase dans un ratio 1/20 (p/p) par rapport à l'AxeA_{tr}. Les peptides ont été séparés par HPLC en utilisant une colonne à phase inversée C₁₈ (3,9 mm X 150 mm) et de l'acétonitrile comme éluant. Les fractions ont été recueillies à chaque deux minutes et la radioactivité a été mesurée.



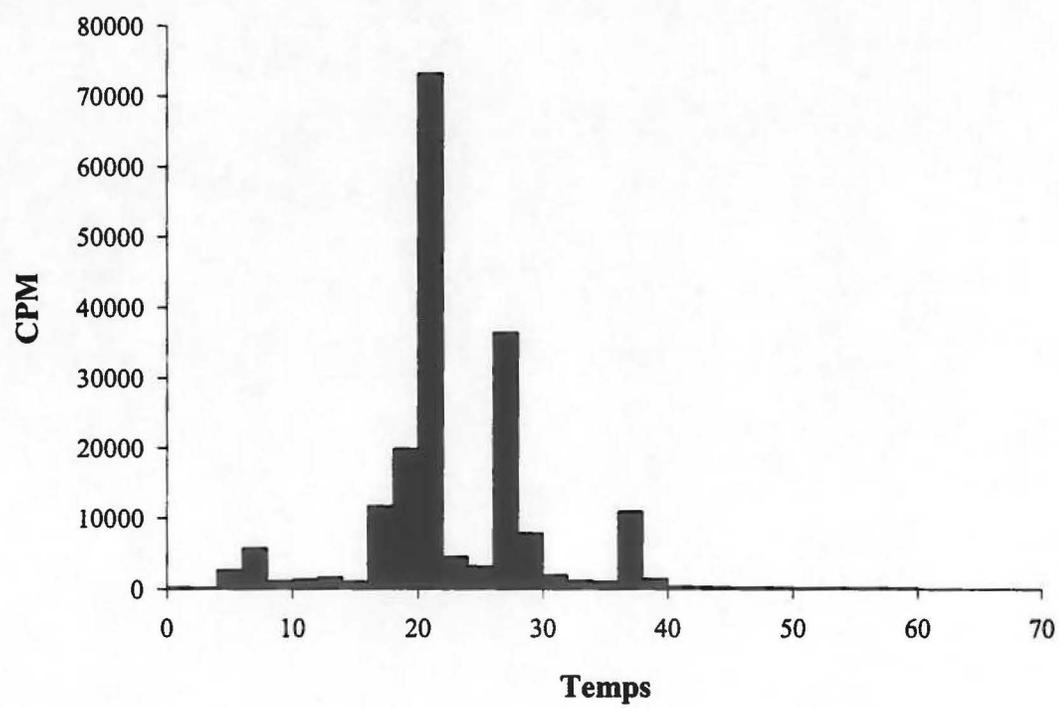
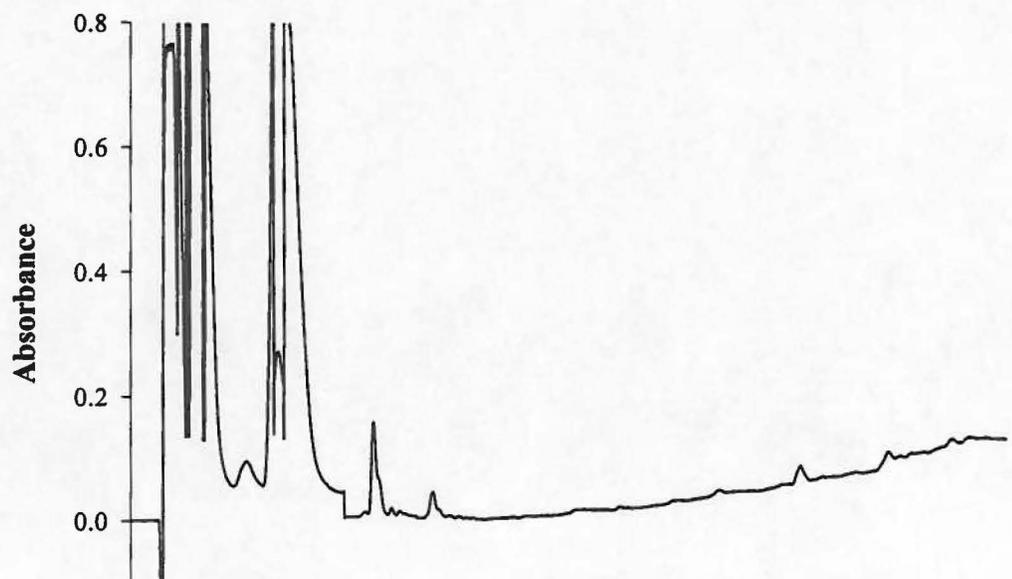
9.3 Analyse du [H^3]DFP seul par HPLC

Suite au résultat présenté à la section précédente (section 9.2), du [H^3]DFP seul a été injecté dans le système HPLC et les mêmes conditions d'élution utilisées pour la séparation des peptides ont été appliquées. Les fractions ont été récoltées du HPLC et la radioactivité pour chacune de ces fractions a été mesurée (figure 29). Comme l'indique l'histogramme de cette figure, l'intensité de radioactivité la plus élevée a été mesurée à un temps d'élution de 21 min.

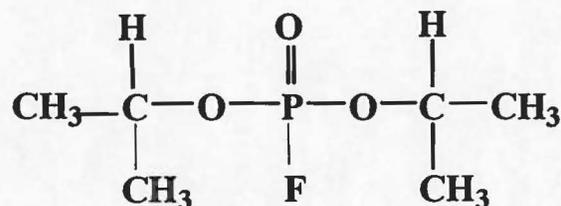
10.0 INHIBITION DE L'Ax_eA_{tr} AVEC LE PHOSPHATE DE DIISOPROPYLE (DP)

Il a été démontré par spectrométrie de masse, que l'Ax_eA_{tr} inhibée au DFP présente des ajouts de 182 Da (figure 23 c). Le DFP a une masse moléculaire de 185 Da et a un temps de demi-vie de une heure lorsqu'il est incubé dans de l'eau. L'hydrolyse du DFP forme du diisopropyl phosphate (DP) qui a une masse moléculaire de 183 Da (figure 30). Les résultats précédents semblent indiquer que l'inhibiteur hydrolysé aurait une certaine affinité pour l'enzyme. Pour vérifier si les ajouts de 182 Da observés proviennent d'une affinité du DP envers l'enzyme, du DFP a été hydrolysé contre de l'eau pendant 18 heures et l'Ax_eA_{tr} a par la suite été ajoutée. Après une période d'incubation d'une heure avec le DP, l'enzyme a été dialysée contre de l'eau afin d'éliminer l'excédent de DP. Les tests d'activité effectués ont montré qu'il y avait une diminution de 68% de l'activité lorsque l'enzyme est mise en présence de DP (tableau 16).

Figure 29 : Chromatogramme du [³H]DFP et histogramme représentant la radioactivité des fractions recueillies du HPLC. Une quantité de 4,44 MBq d'inhibiteur radioactif a été injecté dans le HPLC. Les fractions ont été recueillies à chaque deux minutes et la radioactivité a été mesurée.



a)

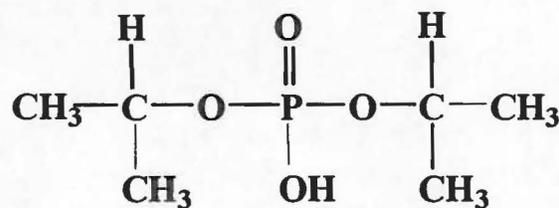


P.M. 185 Da

(184 Da pour le DFP + 1 Da pour la protonation lors de l'injection au spectromètre de masse)

$t_{1/2}$: 1 heure

b)



P.M. 183 Da

(182 Da pour le DP + 1 Da pour la protonation lors de l'injection au spectromètre de masse)

Figure 30 : a) Molécule chimique du fluorophosphate de diisopropyle sous sa forme non-hydrolysée et b) sous sa forme hydrolysée pour former du phosphate de diisopropyle (DP).

Tableau 16 : Comparaison de l'activité spécifique de l'AxeA_{tr} inhibée avec le DP avec celle de l'enzyme non-inhibée. Une concentration de 250 fois plus de DP par rapport à l'enzyme a été utilisée. La réaction d'inhibition a eu lieu durant 1 heure à la température de la pièce. Les tests d'activité ont été effectués avec 100 ng d'enzyme et en utilisant du xylane acétylé chimiquement 1% (p/v) comme substrat. La réaction enzymatique a eu lieu pendant 10 min à 50°C.

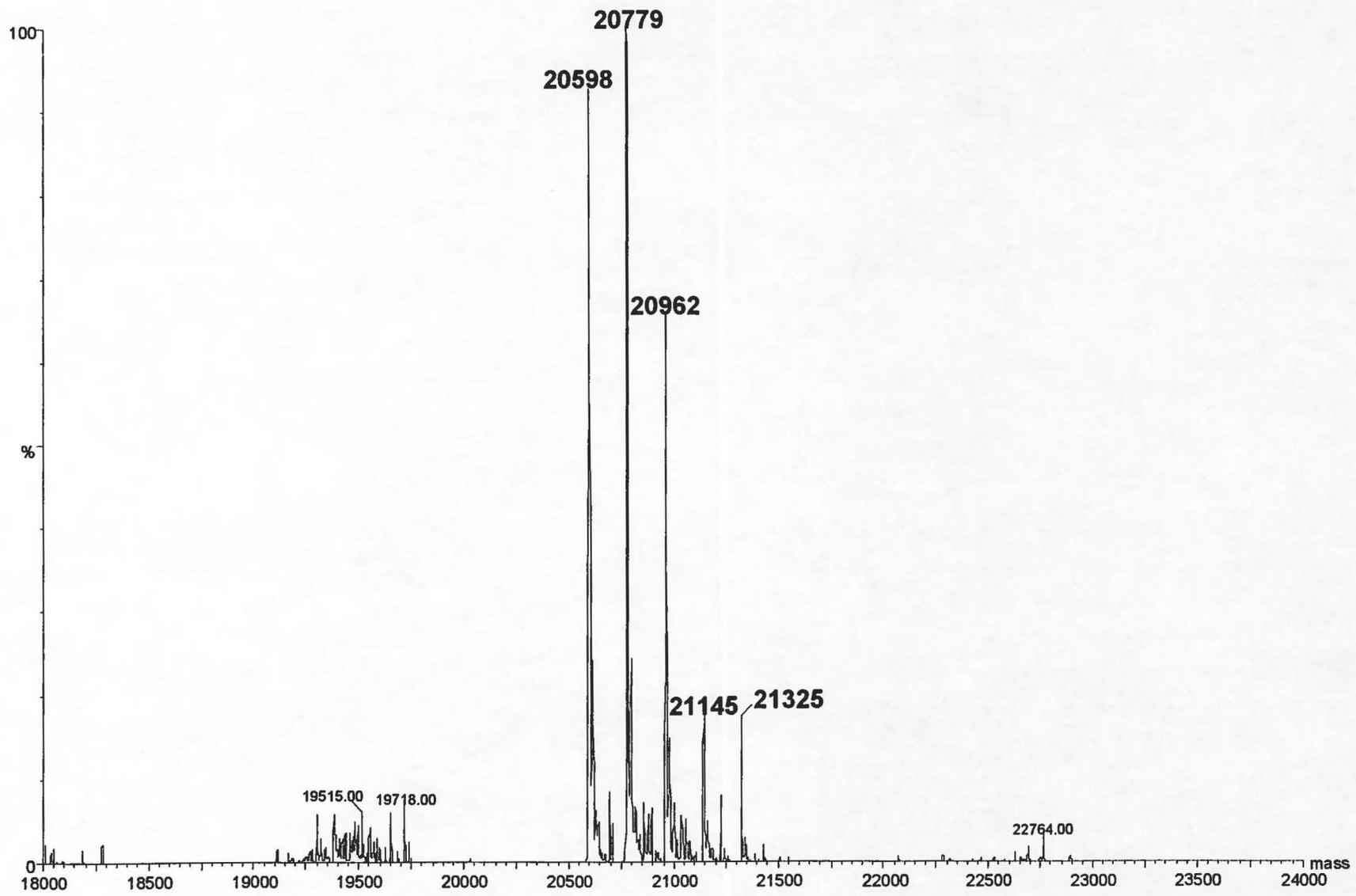
Enzyme	Activité spécifique (U.I./mg)	Pourcentage d'activité (%)
AxeA _{tr} non inhibée	462 ± 44	100
AxeA _{tr} + DP	147 ± 27	32

L'AxeA_{tr} inhibée au DP a également été analysée par spectrométrie de masse. Le profil moléculaire obtenu (figure 31) montre la présence d'une protéine à 20 598 Da correspondant à la masse moléculaire de l'AxeA_{tr}. Ce spectre de masse montre également la présence d'adduits de 182 Da tel 20 779, 20 962, 21 455 et 21 325 Da correspondant respectivement à l'ajout d'un, deux, trois et quatre molécules de DFP sur l'AxeA_{tr}.

11.0 INHIBITION DE LA TRYPSINE PAR LE DFP

Dans le but de vérifier que le protocole d'inhibition utilisé pour l'AxeA_{tr} était adéquat, ce même protocole a été appliqué pour l'inhibition de la trypsine. Plusieurs études effectuées sur la trypsine ont démontré que cette enzyme possédait un mécanisme d'action basé sur une triade catalytique impliquant la participation d'une sérine nucléophile (Keshavarz-Shokri *et al.*, 1999). De ce fait, la trypsine a été incubée en présence de DFP et ce, dans les mêmes conditions utilisées pour l'inhibition de

Figure 31 : Spectre de masse de l'AxeA_r inhibée avec le DP. Le DP, qui est la forme hydrolysée du DFP, a été obtenu en incubant du DFP dans de l'eau pendant 18 heures. L'inhibition au DP a eu lieu en utilisant une concentration de 250 fois plus élevée de DP que d'enzyme. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. L'enzyme a été injectée au spectre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes: un voltage de 3,06 kV attribué au capillaire, un voltage de 9 V au cône, un voltage de 9 V pour l'extraction, une température de 80°C au bloc source et une température de 160°C attribuée pour la désolvation.



l'AxeA_r. Une fois que l'inhibition a eu lieu, des tests d'activité ont été effectués. Les résultats présentés au tableau 17 montre qu'il y a une diminution de l'activité de 95% lorsque la trypsine a été mise en présence de DFP.

Par spectrométrie de masse, le spectre electrospray de la trypsine inhibée au DFP (figure 33) a été comparée avec celle de la trypsine non-inhibée (figure 32). La masse moléculaire de la trypsine ainsi que son produit réactionnel suite à l'inhibition par le DFP a pu être calculé à partir des ions multiples chargés. Ainsi une valeur de 23 286 Da a été obtenue, correspondant à la masse moléculaire de la trypsine provenant d'un pancréas de bovin. Lorsque cette enzyme est incubée avec du DFP, la masse moléculaire du produit réactionnel est de 23 451 Da (figure 33). Cette masse moléculaire correspond à un ajout d'une masse 165 Da par rapport à l'enzyme non-inhibée.

Tableau 17 : Comparaison de l'activité spécifique de la trypsine inhibée avec le DFP avec celle de la trypsine non-inhibée. Une concentration de 250 fois plus élevée de DFP par rapport à l'enzyme a été utilisée. La réaction d'inhibition s'est effectuée durant une heure à la température de la pièce. Le test d'activité a eu lieu en utilisant de l'azocaséine 1% (p/v) comme substrat.

Enzyme	Activité (U. d'activité/mg)	Pourcentage d'activité (%)
Trypsine non inhibée	774	100
Trypsine + DFP	41	5

Figure 32 : Spectre de masse représentant les valeurs m/z de la trypsine pancréatique bovine. L'enzyme a été analysée au moyen d'un spectromètre de masse Finnigan MAT SSQ 7000 dans les conditions suivantes: une température de 210°C attribuée au capillaire; une température de 70°C au bloc source et une pression de 4,35 kPa attribuée à l'azote pour la désolvation. L'injection de l'échantillon s'est effectuée par infusion directe avec l'appareil Harvard Apparatus 22 syringe pump.

Bovine Trypsin ($M_r = 23286.2 \pm 1.6$)

cd000302try#1-9 RT: 0.04-0.71 AV: 9 NL: 6.94E4
T: + p ESI ms [1399.97-2599.97]

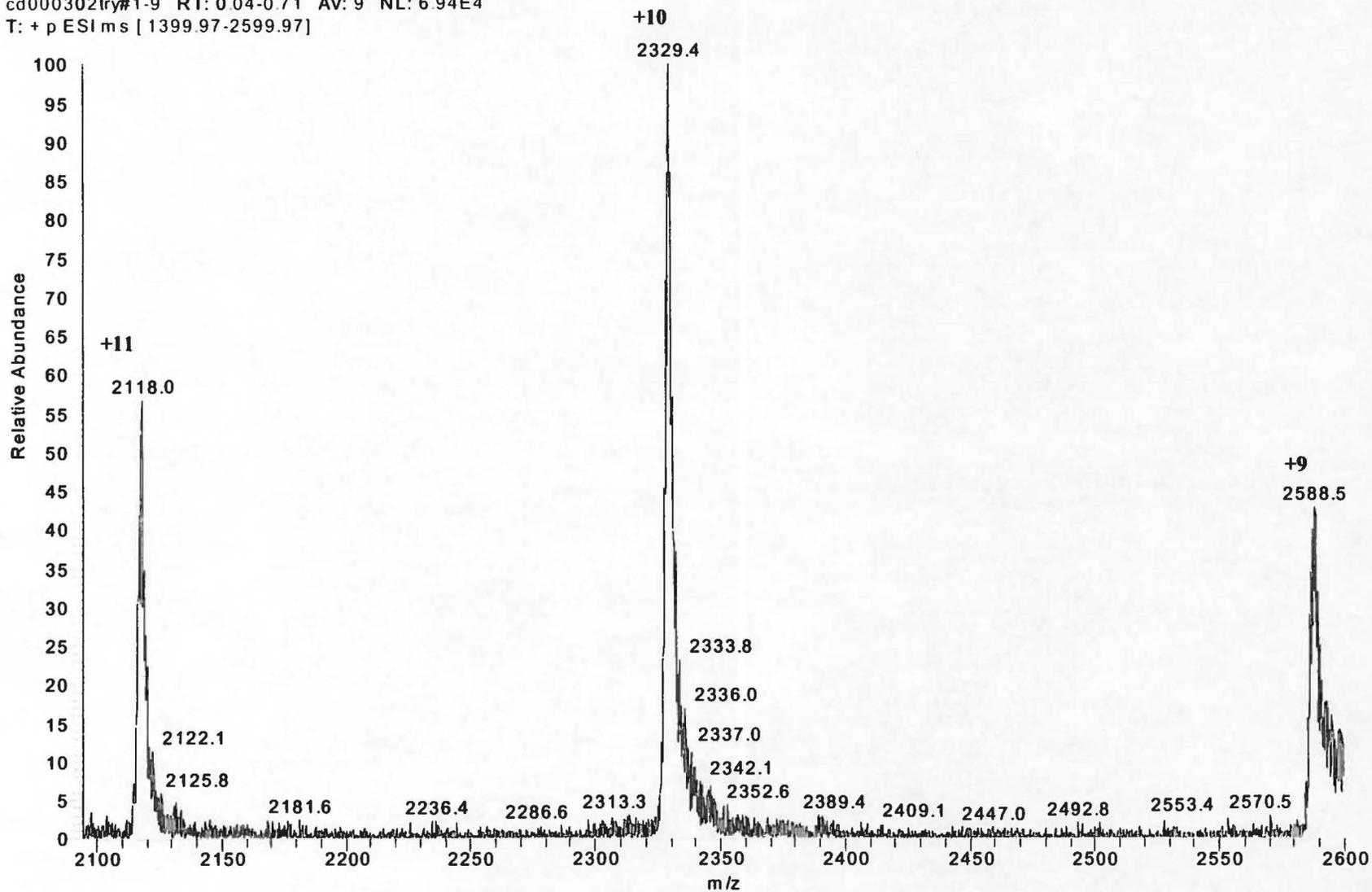
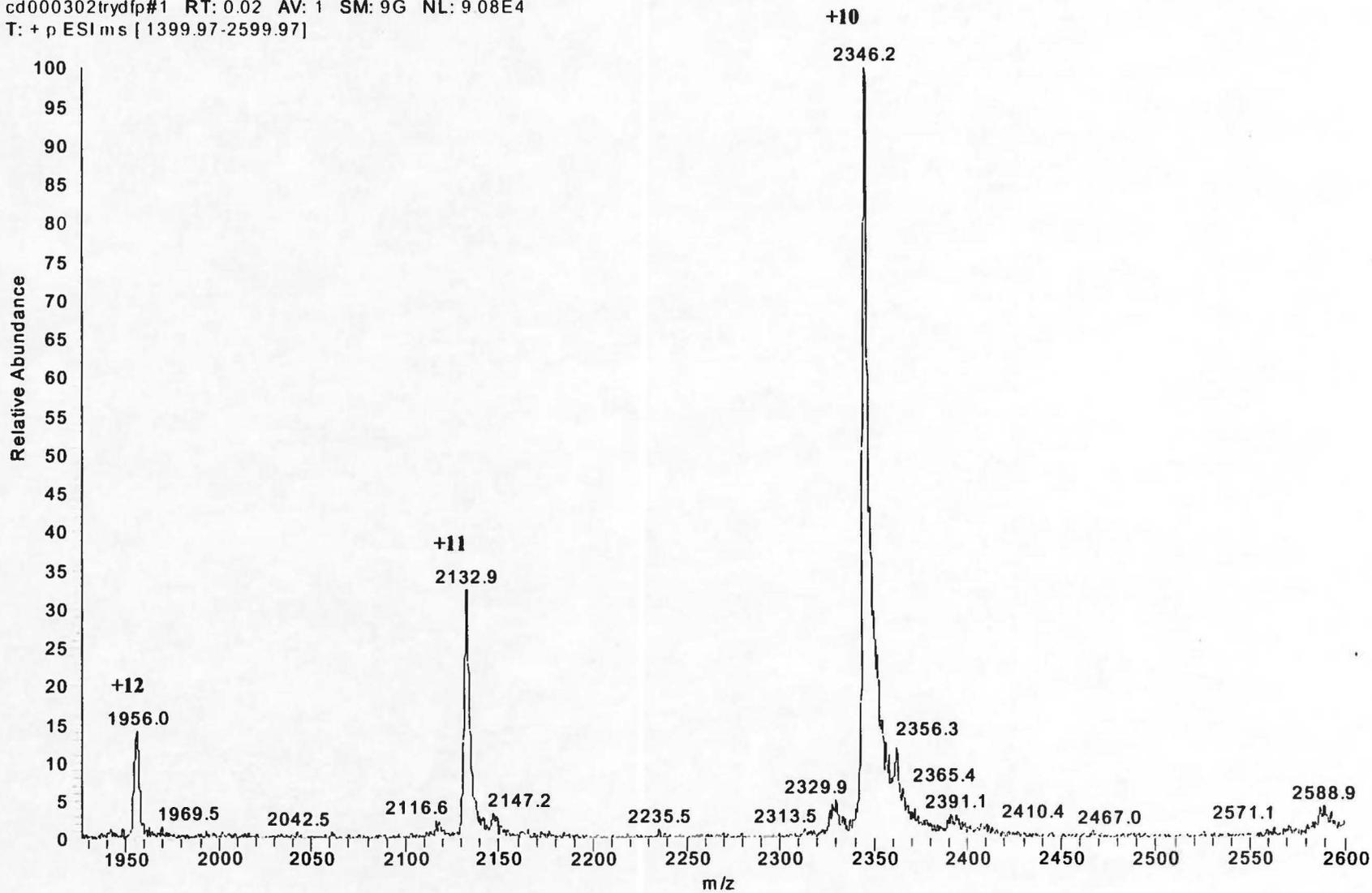


Figure 33 : Spectre de masse représentant les valeurs m/z de la trypsine pancréatique bovine qui a été inhibée avec le DFP. L'inhibition au DFP a eu lieu en utilisant une concentration de 250 fois plus élevée d'inhibiteur que d'enzyme. La réaction d'inhibition s'est effectuée pendant une heure à la température de la pièce. L'enzyme a été analysée au moyen d'un spectromètre de masse Finnigan MAT SSQ 7000 dans les conditions suivantes: une température de 210°C attribuée au capillaire; une température de 70°C au bloc source et une pression de 4,35 kPa attribuée à l'azote pour la désolvatation. L'injection de l'échantillon s'est effectuée par infusion directe avec l'appareil Harvard Apparatus 22 syringe pump.

Bovine Trypsin + DFP (Mr = 23451.5 ± 0.55)

cd000302trydfp#1 RT: 0.02 AV: 1 SM: 9G NL: 9 08E4
T: + p ESI ms [1399.97-2599.97]



DISCUSSION

1.0 GÉNÉRATION DES GÈNES MUTANTS HISTIDINE

Le gène de l'*axeA* a été amplifié à partir du plasmide caractérisé pIAF42 (Shareck *et al.*, 1995). Afin de conserver uniquement le domaine catalytique de l'enzyme, c'est une forme tronquée de l'AxeA qui a été amplifiée. Cette forme d'enzyme comporte une délétion du domaine de liaison au substrat. Les tests d'activité effectués sur l'AxeA_{tr} montrent que cette forme d'enzyme est catalytiquement active (tableau 10). L'*axeA*_{tr} a par la suite été cloné dans le plasmide de *E. coli* pTZ19U afin d'obtenir suffisamment d'ADN matrice pour la mutagenèse dirigée. Cette méthode a été utilisée pour la mutation des codons histidine pour des codons alanine.

Chez les sérines estérases, l'histidine impliquée dans une triade catalytique joue un rôle lors de l'hydrolyse du substrat, dans la capture du proton du groupement hydroxyle de la sérine, rendant cette dernière nucléophile. Ainsi, pour le choix des mutants histidine, il se devait de choisir un acide aminé neutre ne pouvant pas avoir un rôle d'accepteur de proton. Les codons histidine ont donc été mutés pour des codons alanine. L'alanine est un acide aminé neutre qui n'apporte pas un caractère chargé à l'enzyme.

L'analyse des séquences de nucléotides des gènes mutés a permis de confirmer la présence de la mutation des quatre codons histidine pour les codons alanine. L'analyse des séquences a également démontré la présence de trois nucléotides de plus par rapport à la séquence originale (figure 14). Le séquençage des nucléotides de la séquence originale de l'*axeA* avait été effectué en 1995, par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Shareck *et al.*, 1995). Cette méthode peut présenter quelques difficultés lorsque le gène à analyser a un contenu en guanidine (G) – cytosine (C) élevé. Ces nucléotides peuvent être comprimés sur le gel, ce qui rend la détection de ces nucléotides plus difficile. Au cours du présent projet de recherche, le séquençage de l'*axeA*_{tr} a été effectué par électrophorèse sur capillaire. Pour les gènes ayant un fort contenu en G-C, cette méthode offre l'avantage de mieux discerner les nucléotides guanidine et cytosine.

L'insertion de trois nucléotides a changé le cadre de lecture pour les nucléotides situés entre les positions 403 et 436 de l'axeA_{tr}. Cependant, l'ajout de ces trois nucléotides n'a pas généré la présence d'histidines supplémentaires au niveau de la séquence primaire d'acides aminés de l'enzyme.

2.0 PRODUCTION ET PURIFICATION DES ENZYMES MUTANTES

Le plasmide pC109 a été utilisé pour le sous-clonage des quatre gènes mutants de l'AxeA_{tr}. Ce plasmide comporte le promoteur c109 qui n'est pas réprimé par le glucose. Le glucose est un sucre simple, peu dispendieux et largement utilisé comme source de carbone. Malgré le fait que le plasmide pC109 ne soit pas réprimé par le glucose, les productions en fermenteur ont été effectuées en milieu xylose. En effet, lorsque le glucose était utilisé comme source de carbone lors de la production des enzymes, une faible augmentation de la biomasse était observée. Cette faible croissance n'était pas observée lorsque du xylose était utilisé comme source de carbone. Il a été émis comme hypothèse que le grand taux d'aération (10 L/min) attribué au fermenteur aurait une influence sur les productions utilisant le glucose comme source de carbone (François Shareck, communication personnelle).

La purification de l'AxeA_{tr} sauvage a eu lieu en deux étapes soit par chromatographie cationique et par tamis moléculaire et ce, afin de rencontrer les besoins de la spectrométrie de masse. Le passage de l'échantillon de protéines sur FPLC (chromatographie cationique) a permis d'éliminer le Triton résiduel présent dans l'échantillon. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse de l'AxeA_{tr} purifiée uniquement par tamis moléculaire, a relevé la présence de ce détergent dans l'échantillon d'enzyme. La présence de Triton dans l'échantillon purifiée d'AxeA_{tr} n'influence pas l'activité enzymatique mais entrave les analyses d'enzyme par spectrométrie de masse. De ce fait, une deuxième étape de purification devait avoir lieu afin de s'assurer que les échantillons d'enzyme sauvage étaient exempts de toute impureté.

Le passage de l'échantillon de protéines totales sur FPLC est l'étape qui a causé la plus grande perte d'échantillon. L'échantillon de départ contenait les protéines totales du surnageant de culture. Ainsi, les protéines ne comportant pas les caractéristiques physico-chimiques requises pour la purification par chromatographie cationique n'ont pas été retenues sur la colonne. Le passage de l'échantillon sur tamis moléculaire a eu moins de répercussion sur le pourcentage de récupération de protéines totales. Étant donné que l'échantillon injecté sur tamis moléculaire provenait d'une purification préalable par chromatographie, les protéines totales de cet échantillon comportaient donc une plus grande proportion d'AxeA_r.

Les enzymes mutantes n'ont pas été analysées par spectrométrie de masse. De ce fait, la purification des enzymes mutantes s'est effectuée en une seule étape, soit par tamis moléculaire. Le faible rendement obtenu pour le mutant H62A (5%) a été causé par une perte au niveau du collecteur de fraction du tamis moléculaire.

L'immunobuvardage de type Western obtenu (figure 17) indique la présence de deux bandes, ayant des masses moléculaires apparentes de 23 kDa et de 22 kDa, qui ont réagi avec les anticorps anti-AxeA. La présence de la deuxième bande provient probablement d'un produit de dégradation de l'AxeA par des peptidases.

3.0 CARACTÉRISATION DES MUTANTS PURIFIÉS

L'activité spécifique de l'AxeA_r représente 72% de celle de l'AxeA complète, qui comporte un domaine de fixation au xylane. Ce domaine n'est pas nécessaire à la catalyse enzymatique mais contribue à la fixation de l'enzyme au substrat. Dans le cas de l'AxeA complète, le domaine de fixation au substrat est lié à la chaîne principale de xylose, ce qui permet un rapprochement des substitués acétyles au domaine catalytique. La masse moléculaire de l'AxeA_r (20 597 Da) est moins élevée que celle de l'AxeA complète (30 332 Da). De ce fait, l'activité spécifique de l'AxeA_r aurait dû être supérieure à l'activité spécifique de l'AxeA complète puisque cette activité est mesurée en UI/mg d'enzyme. Comme l'activité de l'AxeA_r est inférieure à celle de l'AxeA complète, ceci indique que le rôle du domaine de fixation au substrat est considérable.

Les tests d'activité effectués avec du xylane acétylé chimiquement indiquent qu'il y a une diminution considérable de l'activité enzymatique pour les mutants histidine situés aux positions 62, 66 et 155.

Une cinétique enzymatique a également été effectuée avec le substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside synthétisé par Biely *et al.* (1996). Ce substrat monosaccharide est acétylé aux positions 2, 3 et 4 des résidus xyloses. La structure de ce substrat et les composés générés par l'action de l'AxeA sont illustrés à la figure 34. À partir des données cinétiques enzymatiques, l'activité spécifique a été calculée et comparée avec celle obtenue par Biely *et al.* (1996), qui ont travaillé avec l'Axe complète (avec le domaine de fixation). Étant donné, que l'AxeA_r a une masse moléculaire différente de l'AxeA complète, il est nécessaire pour comparer directement l'activité des enzymes, de transformer les niveaux d'activité obtenus en UI/ μ mol. De ce fait, l'activité spécifique de l'AxeA_r est de 11 134 UI/ μ mol ce qui est inférieure à l'activité de 16 060 UI/ μ mol obtenue pour l'AxeA complète. Donc, en plus d'agir sur l'effet de proximité des groupements acétyles sur les substrats polymériques, le domaine de fixation au xylane pourrait avoir un effet de stabilisation du domaine catalytique ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'activité lors de l'utilisation d'un substrat monosaccharide.

Les mesures d'activité spécifique des mutants envers le substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside reflètent celles obtenues avec le substrat xylane acétylé chimiquement. Ainsi, ce sont les mutants histidine situés aux positions 62, 66 et 155 qui

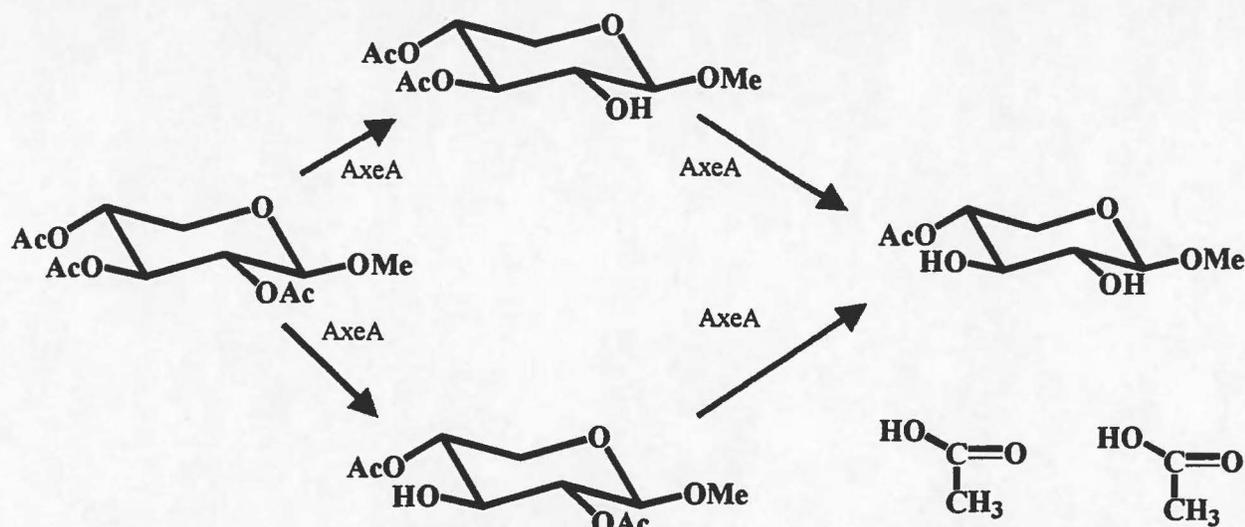


Figure 34 : Étapes de déacétylation proposées du substrat méthyle tri-*O*-acétyle- β -D-xylopyranoside par l'acétyl-xylane estérase de *S. lividans* (Biely *et al.*, 1996).

présentent les plus fortes diminutions de l'activité enzymatique. Toutefois, les histidines situées aux positions 62 et 155 sont les résidus qui sont les plus susceptibles d'avoir un rôle catalytique puisqu'une mutation à ces positions engendre des diminutions de plus de 95% de l'activité spécifique (tableau 12).

Dans le contexte où on assume que l'AxeA de *S. lividans* possède un mécanisme d'action basé sur une triade catalytique, l'histidine 62 ou l'histidine 155 pourrait faire partie de la triade catalytique. Il est à noter que la mutation de ces histidines n'a pas entraîné une perte totale de l'activité enzymatique. De ce fait, l'activité résiduelle de ces mutants peut s'expliquer par une hydrolyse non spécifique du substrat. Cette hypothèse a également été émise par (Pazirandeh *et al.*, 1991), pour expliquer la présence d'une activité résiduelle de 2% lors de la mutation de l'histidine catalytique d'une thioestérase produite chez le poulet. En effet, les tests d'activité enzymatique sont effectués à une température de 50°C. Or, cette chaleur provoque une hydrolyse spontanée du substrat acétylé. Malgré le fait qu'un échantillon contrôle soit utilisé afin d'évaluer la quantité

d'acide acétique libérée de façon spontanée, une faible marge d'erreur peut être prise en considération lors du calcul de l'acide acétique libérée par les mutants.

Les pertes d'activité engendrées par la mutation des autres histidines pourraient être attribuées à la présence d'histidines essentielles chez l'AxeA_r. Ainsi, ces histidines auraient d'importantes fonctions chez l'AxeA_r sans toutefois faire partie de la triade catalytique.

Une des fonctions d'une histidine essentielle pourrait être attribuée à son implication dans la reconnaissance du substrat. Cette hypothèse a également été suggérée par Emmerich *et al.*, (1992) qui ont effectué des études sur une lipase humaine. Les recherches effectuées sur cette lipase ont démontré que le mécanisme d'action de cette enzyme est basé sur une triade catalytique impliquant une sérine (S132) une histidine (H241) et un acide aspartique (D156). Toutefois, la mutation de l'histidine 93 par une alanine a entraîné une perte d'activité de 90% de l'enzyme. Les auteurs de ces recherches ont associé cette perte d'activité à l'implication de l'histidine 93 dans l'interaction de l'enzyme avec le substrat. Il a également été suggéré que la mutation de l'histidine 93 pour une alanine pourrait avoir introduit un changement conformationnel mineur à l'enzyme, entraînant une diminution de l'activité. Afin de vérifier si la mutation a engendré une modification de la structure de l'AxeA_r, des analyses sur la conformation de l'enzyme par dichroïsme circulaire devraient être effectuées.

Il est également probable, que la mutation apportée à une histidine essentielle, affecte le positionnement et l'état de transition d'un résidu catalytique. Cette hypothèse a été émise par Brok *et al.* (1995) pour expliquer le rôle possible d'une histidine essentielle chez une phospholipase humaine. Les études effectuées sur le mécanisme d'action de cette phospholipase ont démontré que la sérine 144 de cette enzyme réagissait avec un inhibiteur spécifique à sérine nucléophile (Horrevoets *et al.*, 1991). D'après ces résultats, ces chercheurs ont conclu que le mécanisme d'action de cette phospholipase humaine était basé sur une triade catalytique impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique. Dans le but d'identifier l'histidine catalytique, Brok *et al.* (1995) ont

muté, par mutagenèse dirigée, quatre histidines de la phospholipase. La mutation de l'histidine 142 a entraîné une diminution importante de l'activité enzymatique. Étant donné que cette histidine est située à seulement deux acides aminés de la sérine nucléophile (S144), ces auteurs ont jugé peu probable que l'histidine 142 fasse partie de la triade catalytique. Il a donc été suggéré par ces auteurs, que la perte d'activité pouvait être attribuée à un rôle structural de l'histidine 142 pour maintenir la sérine catalytique dans une position pouvant permettre son activation par un autre acide aminé. Ces chercheurs ont également établi que cette histidine essentielle pouvait avoir un rôle dans la participation d'interactions de liens hydrogènes et électrostatiques qui peuvent être responsables du maintien de l'état de transition des résidus catalytiques.

Il est également possible que deux histidines agissent comme résidus catalytiques. Cette hypothèse a été émise par Qiu *et al.*, (1996) qui suggèrent la présence d'une tétrade catalytique d'une protéase provenant d'un cytomégalovirus. La structure cristallographique de cette enzyme indique que le site catalytique comprend une sérine (S132), deux histidines (H63 et H157) et un acide aspartique (D65). L'histidine 157 de cette tétrade catalytique agirait comme un composant de plus dans le réseau de relais de charge des résidus catalytiques.

4.0 MODIFICATION CHIMIQUE

4.1 Modification par le fluorure de benzyle sulfonyle (PMSF)

Généralement, chez les cutinases, lipases, protéases, hydrolases et estérases, la sérine nucléophile est retrouvée au niveau d'une séquence consensus G-X-S-X-G. L'AxeA_{tr} ne comporte pas cette séquence consensus. De plus, un alignement de séquence des acides aminés du domaine catalytique de l'AxeA_{tr} avec les enzymes de la famille 4 des estérases carbohydrates (Coutinho et Henrissat, 1999) n'a pas permis de repérer une sérine consensus. De ces faits, il était donc difficile de cibler la sérine nucléophile pour la mutagenèse dirigée. La méthode de mutagenèse dirigée n'a donc pas été retenue pour l'identification de la sérine nucléophile de l'AxeA_{tr} puisque cette enzyme comporte 14 sérines. La génération de 14 mutants, ainsi que la production et la purification de ces

mutants auraient été trop laborieuse. De plus, l'activité de ces mutants aurait probablement été trop ambiguë à interpréter.

Ainsi, c'est une méthode de modification chimique de la sérine catalytique par un inhibiteur spécifique qui a été utilisée. L'organisation spatiale de l'enzyme fait en sorte que c'est uniquement la sérine nucléophile qui devrait réagir avec l'inhibiteur spécifique. Afin de vérifier la présence d'une sérine catalytique chez l'AxeA_{tr}, cette enzyme a été incubée en présence de fluorure de benzyle sulfonyle (PMSF) qui est un inhibiteur spécifique à la sérine nucléophile. Les données cinétiques indiquent la présence d'une sérine active chez l'AxeA_{tr} puisqu'il y a une inhibition de l'activité enzymatique qui est proportionnelle à la concentration d'inhibiteur utilisée. Ces résultats reflètent ceux obtenus par Abbas *et al.* (1989) où une perte d'activité de 85% d'une protéase de *Penicillium charlessii* avait été notée lorsque l'enzyme avait été incubée en présence de PMSF pendant 48 heures (concentrations de l'inhibiteur et de l'enzyme non mentionnées). Ces résultats suggèrent que cette protéase de *Penicillium charlessii* fait partie de la famille des sérines protéases. De même, l'activité enzymatique d'une Axe produite par *Trichoderma reesei* est inhibée à 98% lorsque cette enzyme est mise en présence de 5 mM de PMSF durant une heure (concentration de l'enzyme non mentionnée) (Margolles-Clark *et al.*, 1996). D'après ces résultats, ces chercheurs ont suggéré que l'Axe de *T. reesei* était une sérine estérase.

4.2 Modification par le fluorophosphate de diisopropyle (DFP)

L'identification de cette sérine active a d'abord été effectuée en analysant la protéine inhibée par spectrométrie de masse (MS). Par la suite, l'enzyme inhibée a été digérée avec une endoprotéinase, soit la trypsine, afin de générer des peptides. Ces peptides ont par la suite été analysés, puis séquencés par un tandem de spectrométrie de masse (MS / MS). Toutefois, les manipulations apportées à l'enzyme modifiée chimiquement avant son passage au spectromètre de masse et les paramètres utilisés par cet appareil (voltage, température) obligent que le lien formé entre l'enzyme et l'inhibiteur soit très stable. De ce fait, un puissant inhibiteur formant des liens covalents avec les sérines nucléophiles a été utilisé.

Le DFP est un inhibiteur fort qui se lie spécifiquement à la sérine nucléophile d'une enzyme. Il a été démontré, chez les enzymes comportant une sérine nucléophile, qu'une inhibition par un composé organophosphoré était accompagnée par la phosphorylation exclusive de la sérine catalytique sans affecter les autres résidus. Les enzymes susceptibles d'être inhibées par le DFP sont les sérines protéases et estérases (Cohen *et al.*, 1967). Les résultats présentés au tableau 13 indiquent une perte de 85% de l'activité de l'enzyme inhibée au DFP. Cette perte d'activité n'est pas aussi notable que celles encourues par une hydrolase de foie de porc (Lenher et Verger, 1997) et par une endopeptidase de *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto *et al.*, 1980). L'incubation de ces enzymes en présence de DFP a engendré une inhibition complète de l'activité enzymatique. Toutefois, il a été rapporté que certaines enzymes, faisant partie de la famille des sérines protéases, n'étaient que partiellement inhibées par le DFP. Ainsi, l'incubation d'une protéase d'un cytomégalovirus d'humain en présence de DFP résulte en une perte d'activité enzymatique de 87 % (Stevens *et al.*, 1994). Telesa *et al.*, (1999) ont noté une faible inhibition enzymatique (40%) d'une acétylcholinestérase de calmar de l'espèce *Loligo opalescens* lors de la réaction de cette enzyme avec le DFP. Ces chercheurs ont justifié cette absence d'inhibition par un surplus d'acides aminés polaires dans la poche catalytique de l'enzyme, ce qui préviendrait l'accès du DFP au site actif. Également, une modification chimique par le DFP a été apportée à la sous-unité catalytique d'une acétyl hydrolase de bovin (Hattori *et al.*, 1995); les résultats ont démontré que le DFP s'était faiblement lié à l'enzyme. Il a été émis comme hypothèse que la sérine active de cette acétyl hydrolase n'était probablement pas accessible au DFP.

La perte d'activité de 85 % obtenue avec l'AxeA_r lors de son incubation avec le DFP semble indiquer qu'il y a eu une réaction entre l'inhibiteur et la sérine catalytique de l'AxeA_r. Comme il a été suggéré par les auteurs mentionnés ci-haut, l'activité résiduelle obtenue pourrait s'expliquer par une polarité élevée de la poche catalytique ou par un état de protonation particulier de l'enzyme. Il est également probable que l'accès à la sérine active par le DFP soit difficile.

5.0 SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est un outil d'analyse offrant la capacité de déterminer la masse moléculaire de protéines et de peptides. En spectrométrie de masse, il est d'abord nécessaire de charger les analytes (protéines/peptides) qui se trouvent dans un environnement aqueux. L'échantillon est tout d'abord passé à travers un capillaire sur lequel un voltage est appliqué. Avec l'aide d'un jet d'azote le liquide est nébulisé, c'est-à-dire qu'il est pulvérisé en fines gouttelettes chargées. Ces gouttelettes sont ensuite exposées à un bain d'azote très chaud, ce qui a pour conséquence de diminuer par évaporation, la taille des gouttelettes. Les charges qui se trouvent sur la gouttelette sont transférées à l'analyte qui est expulsé de la gouttelette. Cet analyte chargé passe ensuite à travers un cône où un voltage est appliqué. Ce cône est situé à l'entrée du spectromètre et a pour fonction d'attirer les molécules chargées vers le quadropole afin de déterminer la masse moléculaire de l'analyte (Yates, 1998). La formation d'ions contenant plusieurs charges permet de diminuer les valeurs m/z à une échelle facilement mesurable. La masse moléculaire d'une protéine peut être calculée à l'aide d'un logiciel de déconvolution en utilisant les divers états de charge observés.

Le profil moléculaire de la figure 22 a été obtenu, suite à la déconvolution des valeurs m/z présentées à la figure 21. Celui-ci (figure 22) indique une protéine de masse de 20 597 Da, correspondant à la valeur théorique de l'AxeA_r. La présence sur ce spectre de masse d'un second ion à 20 614 Da, soit une différence de 17 Da, pourrait correspondre à la masse moléculaire de l'AxeA_r contenant une méthionine oxydée. L'oxydation d'une méthionine est possible si cet acide aminé se retrouve à la surface de la structure de l'enzyme. Ainsi, la liaison d'un oxygène au soufre de la méthionine augmenterait la masse moléculaire de l'enzyme de 16 Da. La présence d'une molécule d'eau résiduelle pourrait également expliquer le pic à 20 614 Da.

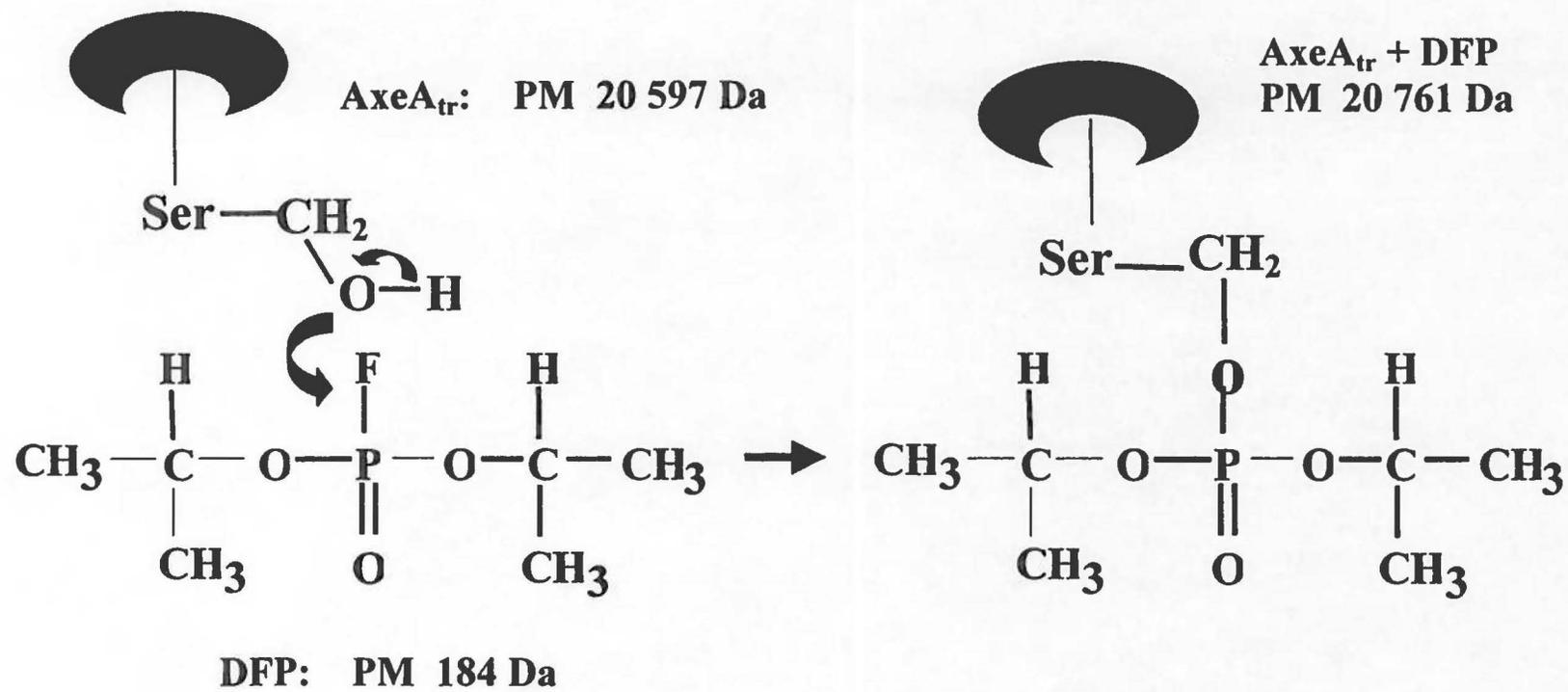
Le marquage chimique qui se produit entre le DFP et une enzyme comportant une sérine active est dû au déplacement du fluore du DFP par le groupement hydroxyle

nucléophile de la sérine. La masse moléculaire attendue de l'AxeA_{tr} marquée au DFP est illustrée à la figure 35. Ainsi, le marquage chimique au DFP devrait augmenter la masse moléculaire de l'enzyme à 20 761 Da.

Les analyses des spectres de masse de l'AxeA_{tr} inhibée au DFP montrent qu'un abaissement du voltage attribué au cône augmente la proportion d'enzyme présentant des ajouts de 182 Da. Il est possible qu'une charge trop élevée appliquée au niveau du cône ait pour effet de fragmenter des liens chimiques. Ainsi, le lien formé entre l'oxygène de la sérine active et le phosphate de l'inhibiteur ne résisterait pas à un voltage trop intense. Cette fragmentation de lien chimique entre l'enzyme et l'inhibiteur a été constatée par DiIanni *et al.* (1994). Ces chercheurs n'ont toutefois pas associé cette fragmentation à un voltage trop élevé appliqué au cône mais ce phénomène pourrait être l'explication de leurs observations.

Le marquage chimique de l'AxeA_{tr} par le DFP ne semble pas être spécifique à la sérine active de l'enzyme puisque le spectre de masse n'indique pas la présence d'un ion à 20 761 Da. Cependant, l'AxeA_{tr} comporte des ajouts de multiple de 182 Da (figure 23 c), ce qui peut correspondre à la masse moléculaire du phosphate de diisopropyle (DP). Cette incorporation de plus d'un seul inhibiteur a été constatée par Stevens *et al.*, (1994). En effet, l'analyse du spectre de masse d'une protéase d'un cytomégalovirus humain a indiqué qu'il y avait présence de deux molécules d'inhibiteur sur l'enzyme. Selon ces chercheurs, l'incorporation d'un second inhibiteur à l'enzyme serait due à la forte concentration de DFP requise pour l'inactivation de l'enzyme.

Figure 35 : Schéma représentant le marquage chimique de l'AxeA_r par le DFP



Les résultats présentés à la figure 23 c semblent indiquer que le DFP ne réagit pas avec une sérine de l'AxeA_r mais que c'est plutôt le DP, issu de l'hydrolyse du DFP, qui se lie de façon non covalente avec l'enzyme. En fait, il est probable que le DP présente des interactions de type ionique avec l'enzyme. Plus précisément, il y aurait un transfert des électrons d'atomes, provenant du DP et de l'AxeA_r, qui ont une grande différence d'électronégativité. Il est également probable que le DP présente des interactions hydrophobiques avec l'enzyme. Il est probable que l'AxeA_r possède une poche hydrophobique et qu'il y aurait une association entre cette poche et un groupement du DP. Ces types de liens, ioniques et hydrophobiques, seraient suffisamment fort pour résister aux trois dialyses effectuées après la réaction d'inhibition et à certaines conditions utilisées en spectrométrie de masse.

Ainsi, selon l'analyse du spectre de masse de l'AxeA_r inhibée au DFP, il ne semble pas avoir eu une réaction entre le DFP et l'enzyme mais plutôt une interaction non covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme. Dans le but d'identifier où cette interaction pouvait avoir lieu, l'AxeA_r inhibée par le DFP a été digérée par la trypsine, qui est une endoprotéinase coupant les protéines du côté C-terminal des lysines et des arginines. Les peptides générés ont été analysés puis séquencés.

L'identification et le séquençage de peptides en spectrométrie de masse doivent s'effectuer en utilisant un spectre de masse en tandem. Dans cette technique, le premier quadrupole ne sélectionne qu'un seul ion de valeur m/z connue. Cet ion est introduit dans une cellule de collisions. Cette cellule permet de multiples collisions de l'ion avec le gaz. Ces collisions induisent la dissociation de l'ion précurseur et les fragments obtenus sont analysés en balayant le troisième quadrupole de l'appareil. En ce qui a trait aux peptides, des fragments sont obtenus par la coupure de liens peptidiques. Lors de la coupure de lien peptidique, la charge peut être retenue du côté N-terminal du fragment ionique; dans ce cas il y a génération d'un fragment de type b. Par contre, si la charge est retenue du côté C-terminal du fragment ionique, il y a génération de fragments de type y (figure 36).

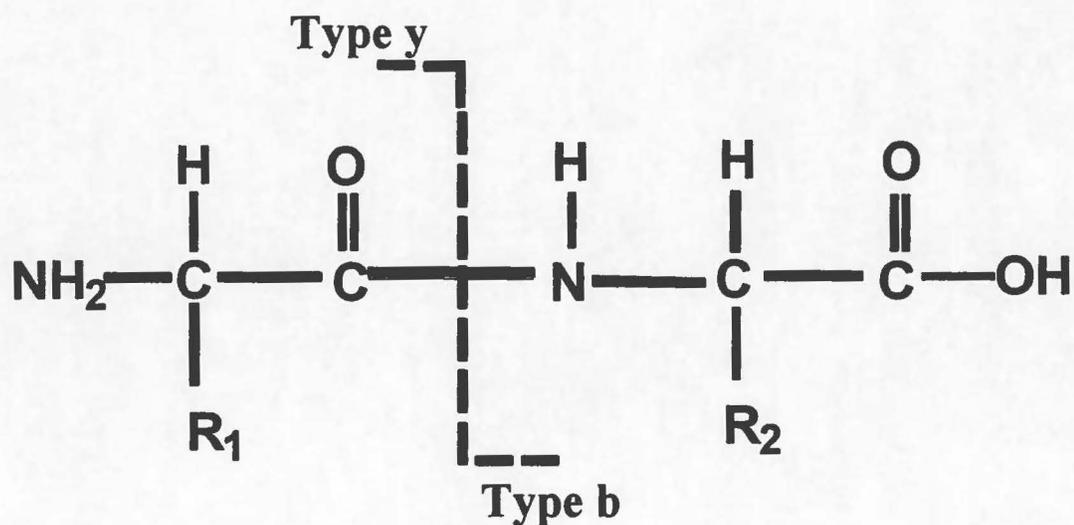


Figure 36 : Génération de fragments de type b et de type y lors des coupures de liens peptidiques au niveau de deuxième quadrupole.

La différence de masse entre chaque fragment consécutif de même type de coupure (fragment de type b ou y) peut être calculée. De cette façon, une séquence de fragments ioniques peut définir la séquence en acides aminés (Yates, 1998).

Le spectre de masse présenté à la figure 24 montre les valeurs m/z des fragments ioniques des peptides de l'axe A_r issus d'une digestion tryptique. Malgré le fait que ce spectre de masse présente plusieurs fragments ioniques dont la valeur m/z correspond aux

valeurs m/z théoriques de peptides de l'AxeA_{tr}, le séquençage de seulement six ions peptidiques a pu être effectué (annexe J). Théoriquement, 12 ions peptidiques auraient dû être générés puis séquencés à partir de la digestion tryptique de l'AxeA_{tr}. Le séquençage des ions peut présenter quelques difficultés lorsque la séquence en acides aminés est plus petite que sept acides aminés ou plus grande que vingt acides aminés.

Les peptides générés suite à l'inhibition de l'AxeA_{tr} par le DFP ne présentent pas de valeurs m/z différentes comparativement à ceux générés à partir de l'enzyme non-inhibée. Étant donné que seulement six peptides ont pu être confirmés par séquençage, il n'est pas possible de conclure que le DFP ne s'est pas lié à une sérine ou n'a pas interagi avec un autre acide aminé de l'AxeA_{tr}.

6.0 INHIBITION AU [³H]DFP

L'AxeA_{tr} a été inhibée avec du DFP marqué au tritium ([³H]DFP) afin de repérer la sérine modifiée avec l'inhibiteur. L'incorporation du [³H]DFP a été calculée et 0,94 moles de [³H]DFP réagissait avec 1 mole d'AxeA_{tr}. Ces résultats reflètent une incorporation stœchiométrique consistante avec la présence d'une sérine nucléophile chez l'AxeA_{tr}. Afin de repérer le résidu modifié par le [³H]DFP, une digestion peptidique de l'AxeA_{tr} a été effectuée et la radioactivité pour chaque peptide a été mesurée.

La radioactivité la plus intense a été repérée à un temps d'élution de 21 min. L'analyse de ce pic d'élution par LC/MS a permis d'identifier deux ions, soit un à 616 Da et un second à 183 Da. L'ion de 616 Da correspond à un peptide de sept acides aminés (AVAPDGS). Toutefois, ce peptide ne contient pas un ajout de 164 Da correspondant à la masse moléculaire du DP lié à une la sérine. Il est également à noter que la sérine d'intérêt de ce peptide se trouve à la dernière position de la séquence primaire de l'enzyme tronquée, soit à la position 195. Généralement, les derniers acides aminés de la séquence primaire d'une protéine se retrouvent, dans la structure en trois dimensions, sous forme d'une queue déliée à la structure. Il est donc peu probable, mais non exclu,

que cette sérine soit dans un environnement favorable à son activation, c'est-à-dire à proximité d'une histidine et d'un acide aspartique.

L'ion de 183 Da ne correspond pas à la masse moléculaire du DFP qui est de 185 Da (184 Da + 1 Da pour la protonation). Toutefois, l'ion de 183 Da correspond à la masse moléculaire du DP qui est de 183 Da (182 Da + 1 Da pour la protonation). Le fait que la radioactivité ait été repérée simultanément avec le peptide de 616 Da, ne peut s'expliquer que par une co-élution fortuite de ce peptide avec le DP radioactif lors de la séparation des peptides par le système HPLC de Waters.

Afin de s'assurer que l'inhibiteur n'avait pas réagi avec un acide aminé provenant d'un peptide autre que celui de 616 Da, les masses moléculaires de tous les peptides obtenus au chromatogramme, illustré à la figure 27 (a), ont été analysées. L'analyse par LC/MS a permis d'identifier les douze ions peptidiques qui devaient être théoriquement obtenus lors de la digestion de l'AxeA_{tr}. Malgré le fait que ces ions n'ont pas été séquençés, l'analyse des ions peptidiques obtenus n'a pas permis d'identifier un ion ayant un ajout correspondant à la masse moléculaire du DP lié avec une sérine. Il fallait cependant s'assurer que cette absence d'ajout ne soit pas due à l'effet d'un voltage trop élevé au cône, ce qui aurait pu provoquer la dissociation du lien de l'inhibiteur avec l'enzyme.

Le chromatogramme issu de la digestion tryptique de l'AxeA complète ne présente pas de pic à un temps d'élution de 21 min comme s'était le cas pour le peptide de 616 Da. Ces sept acides aminés font partie, lors de la digestion de l'AxeA complète, d'un peptide de 30 acides aminés avec une hydrophobicité plus élevée. Le fait que la radioactivité se retrouve encore à un temps d'élution de 21 min confirme que le [³H]DFP ne s'est pas lié ou n'a pas interagi avec la sérine de ce peptide de 616 Da.

Le passage du [³H]DFP seul dans le système de séparation des peptides a confirmé que le [³H]DFP est retenu sur la colonne. Cet inhibiteur présente donc des interactions

hydrophobes avec la résine de la colonne C₁₈ utilisée et éluerait avec 14 % (v/v) d'acétonitrile.

L'inhibition de l'AxeA_{tr} avec le DFP marqué radioactivement n'a pas permis d'identifier la sérine catalytique de l'enzyme. Pourtant, cette méthode d'identification est couramment utilisée pour cibler le résidu catalytique. Ainsi, une prolyle endopeptidase de *Flavobacterium meningosepticum* a été inhibée par le [³H]DFP. Cette enzyme inhibée a été digérée par la trypsine et les peptides générés ont été analysés par spectrométrie de masse. Les analyses ont permis de déterminer que la sérine 536 était l'acide aminé qui comportait un ajout de 164 Da, ce qui correspond à la masse moléculaire du DP lié (Chevallier *et al.*, 1992).

De même, l'analyse par spectrométrie de masse d'une protéase d'un virus herpes simplex inhibée au DFP a indiqué la présence d'un ion à 26 694 Da, ce qui correspond à un ajout de 164 Da par rapport à la protéase non inhibée (26 530 Da). Cette enzyme a par la suite été incubée en présence de [³H]DFP. Les peptides générés par la digestion à la chymotrypsine ont été analysés par spectrométrie de masse. Les analyses ont permis de repérer un peptide qui présentait un ajout de 164 Da. Ce peptide comportait une seule sérine (S129) qui fut donc désignée comme étant la sérine catalytique (Dilanni *et al.*, 1994).

Le fait que le [³H]DFP ne se soit pas intégré à l'AxeA_{tr} pourrait s'expliquer par diverses raisons. Premièrement il est possible que des composés supplémentaires soient requis pour la réaction d'inhibition. De ce fait, il a été rapporté par Holwerda *et al.*, (1994) que l'incorporation du [³H]DFP chez une protéase d'un cytomegalovirus humain avait lieu seulement lorsque du dithiothréitol (5mM) était ajouté dans le mélange réactionnel. L'ajout obligatoire du dithiothréitol suggère la présence d'un pont disulfure chez la protéase, causant un encombrement stérique pour l'accès à la sérine catalytique par le DFP. Toutefois, en ce qui a trait à l'AxeA_{tr}, cette hypothèse est peu probable. En effet, si l'inhibiteur, de faible poids moléculaire, est affecté par un encombrement stérique, il en devrait être ainsi pour le substrat naturel de l'enzyme qui comporte un

poids moléculaire supérieur au DFP. Or, l'accès du substrat xylane acétylé à l'AxeA_r de *S. lividans* n'est pas limité par la présence de pont disulfure. Deuxièmement, il est possible que les paramètres utilisés au spectromètre de masse (voltage- température) engendrent une coupure du lien de l'inhibiteur avec l'enzyme. Afin de vérifier cette hypothèse, l'enzyme inhibée au DFP pourrait être analysée sur un spectre de masse de type MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption / ionisation – time of flight). Ce type d'analyse permet la mesure d'un ion selon son temps de vol qui est directement relié à son rapport m/z. Ainsi, aucun voltage n'est appliqué à l'ion pouvant favoriser la dissociation d'un lien chimique ou électrostatique. Toutefois, l'énergie du laser appliquée à l'ion afin de permettre son vol peut aussi être la source de bris de liens covalents scissiles.

7.0 INHIBITION AU DP

L'inhibition de l'AxeA_r avec le DP a provoqué une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme de 68%. Cette perte d'activité est du même ordre de grandeur que celle encourue par le DFP (85%). D'après ces résultats, il semble que se soit le DP qui se lie de façon non-covalente à l'enzyme. Cette liaison du DP peut avoir eu lieu dans le site catalytique de l'enzyme entraînant ainsi une diminution de son activité. De même, il est possible que le DP se soit attaché à une partie de l'enzyme autre que le site catalytique, ce qui peut causer des changements conformationnels conduisant à une perte d'activité catalytique.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. Il est probable que l'état de protonation de l'enzyme soit particulier ce qui fait que le caractère nucléophile de la sérine catalytique est difficilement atteint. Ainsi, à défaut de créer un lien covalent avec le DFP, son produit d'hydrolyse soit le DP, se lierait de façon non-spécifique au site actif de l'enzyme. Compte tenu du temps de demi-vie relativement court du DFP (30 min) celui-ci s'hydrolyserait et resterait ainsi associé à l'AxeA_r sous forme de DP. Il est également probable que le DP se soit lié de façon non covalente dans la poche catalytique de l'enzyme et/ou dans des sites responsables de la reconnaissance du substrat, ce qui empêcherait l'hydrolyse du substrat. Il est aussi possible que le DP se

soit lier dans des sites qui contiennent des acides aminés qui, par des liens hydrogènes, maintiennent la structure des résidus catalytiques. La liaison du DP à ces acides aminés affecterait donc l'organisation spatiale des résidus catalytiques et, par le fait même, le potentiel nucléophile de la sérine. Ainsi, le simple attachement d'un dérivé du DFP dans d'autres sites impliqués indirectement dans la catalyse enzymatique, pourrait provoquer des réarrangements conformationnels conduisant à une diminution de l'activité. Aussi, l'Axe est une enzyme qui reconnaît les liens esters, or le DP comporte deux liens phosphoester (figure 30). Il est donc possible que le DP se fixe sur le site actif de l'enzyme sans que cette dernière puisse hydrolyser l'inhibiteur. De ce fait, le DP resterait fixé de façon non covalente à l'intérieur du site actif.

Le spectre de masse obtenu à la figure 31 indique que des molécules de DP sont associées à l'AxeA_{tr}. Ces liaisons non-covalentes de DP avec l'enzyme seraient assez fortes pour résister à la dialyse effectuée après la réaction d'inhibition. Toutefois, les résultats obtenus de l'inhibition au [³H]DFP semblent montrer que le lien formé entre l'inhibiteur et l'enzyme est défait suite à la digestion peptidique puisque l'inhibiteur radioactif ne semble pas associé à aucun peptide.

8.0 INHIBITION DE LA TRYPSINE PAR LE DFP

Ce test d'activité avec la trypsine a été effectué comme contrôle positif, afin de vérifier si le protocole d'inhibition au DFP était adéquat. La trypsine est une sérine protéase dont le mécanisme d'action est basé sur une triade catalytique impliquant une sérine nucléophile. Le protocole d'inhibition pour l'AxeA_{tr} a été appliqué pour la trypsine. Il est à noter que le protocole d'inhibition a été effectué avec le même réactif DFP (même numéro de lot) et avec un même temps d'inhibition que ceux utilisés pour l'AxeA_{tr}. Les tests d'activité enzymatique indiquent que la trypsine a été inhibée par le DFP. De plus, le spectre de masse de la trypsine inhibée au DFP indique la présence d'un ion à 23 451 Da, ce qui correspond à une masse moléculaire de 164 Da plus élevée que la trypsine non inhibée. La présence de cet ion indique que le DFP a réagi avec la sérine

nucléophile de la trypsine. Ainsi, le protocole utilisé pour l'inhibition de l'AxeA_r était adéquat.

CONCLUSIONS

Le mécanisme d'action de l'AxeA de *S. lividans* n'est pas connu. La classification de cette enzyme, basée sur la similarité de séquences des acides aminés n'a pas permis de repérer d'homologie de séquences d'acides aminés catalytiques. De ces faits, il est intéressant d'élucider la relation structure/fonction de l'enzyme puisque l'AxeA peut être utilisée dans plusieurs domaines de la biotechnologie, notamment au niveau de l'industrie des pâtes et papiers et de l'amélioration de la nourriture animale.

Plusieurs études sur le mécanisme d'action d'enzymes estérases ont été effectuées. Ces études suggèrent que le mécanisme d'action de ces enzymes implique la participation de trois acides aminés (Ser/His/Asp) regroupés pour former une triade catalytique. En se basant sur ces études, l'hypothèse que le mécanisme d'action de l'AxeA de *S. lividans* soit également basé sur une triade catalytique a été émise.

À partir de cette hypothèse, les quatre histidines retrouvées dans la séquence primaire de l'enzyme ont été substitués, par mutagenèse dirigée, pour des alanines. Les enzymes mutantes ont été exprimées et purifiées jusqu'à homogénéité. Par la suite, des tests d'activité spécifique ont été effectués afin de repérer le mutant histidine causant la plus grande perte d'activité.

Par la suite, afin de cibler la sérine nucléophile, l'AxeA_r a été incubée en présence d'inhibiteurs spécifiques à sérine nucléophile. L'activité spécifique de l'enzyme modifiée chimiquement a été mesurée. De même, des analyses de l'AxeA_r et des peptides de cette enzyme modifiée chimiquement ont été effectuées par spectrométrie de masse.

Les données cinétiques recueillies sur l'activité spécifique des mutants histidine semblent démontrer la présence d'une sérine nucléophile chez l'AxeA_r. En effet, les pertes importantes d'activité encourues par deux des quatre mutants (H62A et H155A) font en sorte que ces résidus histidines sont susceptibles de faire partie de la triade catalytique. De même, les pertes d'activité encourues, lors de l'inhibition de l'AxeA_r par le PMSF ainsi que par le DFP, indiquent que cette enzyme comporte une triade catalytique puisque ces inhibiteurs sont spécifiques à la sérine nucléophile.

Toutefois, les données recueillies par spectrométrie de masse de la modification chimique de l'AxeA_r par le DFP ne semblent pas indiquer la présence d'une sérine catalytique chez cette enzyme. Plusieurs hypothèses ont été proposées pouvant expliquer la difficulté de repérer la sérine active. Ainsi, des hypothèses au niveau de l'encombrement stérique du site catalytique de l'enzyme, des paramètres utilisés au spectromètre de masse (voltage-température), de l'accès limité à la sérine catalytique, de l'état de protonation de l'enzyme et de la polarité de la poche catalytique ont été évoquées pour expliquer les difficultés rencontrées pour la modification chimique.

Cependant, il ne faut pas écarter la possibilité que le mécanisme d'action de l'AxeA_r ne soit pas basé sur une triade catalytique impliquant une sérine nucléophile. Dans ce cas, le PMSF et le DP présenteraient une affinité particulière envers l'AxeA_r sans toutefois réagir avec une sérine catalytique. Ainsi, le mode d'action de l'AxeA de *S. lividans* pourrait être basé sur un mécanisme autre que celui de la triade catalytique impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique. Les études menées à ce jour par Biely *et al.* (1996) sur l'AxeA de *S. lividans*, indiquent que cette enzyme aurait la capacité de déacétyler deux groupements acétyles d'un substrat xylopyranoside et ce, de façon simultanée. Ce mode d'action suggère donc que l'AxeA aurait la capacité de catalyser le déplacement d'un groupement acétyle entre les positions 2 et 3 du substrat tri-*O*-acétyle- β -D xylopyranoside. Ainsi, cette double fonction de l'AxeA impliquerait un mécanisme d'action particulier.

L'obtention de la structure en trois dimensions de l'AxeA_r de *S. lividans* permettrait de vérifier si le mécanisme d'action de cette enzyme est basé sur une triade catalytique. La présence d'une sérine, d'une histidine et d'un acide aspartique maintenus très près les uns des autres dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme suggérerait la présence d'une triade catalytique.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Claude Dupont pour la confiance accordée lors de la réalisation de ce projet et aussi pour l'aide financière apportée. Merci aussi aux professeurs François Shareck et Rolf Morosoli pour leurs nombreux conseils. Je désire également remercier le professeur François Lépine pour la formation donnée en spectrométrie de masse et aussi pour avoir répondu à mes innombrables questions.

Je désire remercier Lisette Duval, technicienne de laboratoire, pour sa bonté infinie et pour toute l'aide apportée. C'est une personne que je n'oublierai jamais. Merci à Roger Dubuc pour son brio en biologie moléculaire et pour son talent fou en pédagogie. Merci aussi à Roger Ebanks qui n'a jamais montré un signe d'impatience pour toutes les fois où j'avais des questions à poser. Merci aussi à Serge Durand pour toutes les minutieuses corrections d'anglais apportées pour les présentations par affiches.

Je voudrais aussi remercier Pascale, Christine, Patrick, Pascal, Stéphanie et tous mes autres amis du groupe de biologie des streptomycètes pour la magnifique ambiance qui régnait dans le laboratoire.

Merci aussi à ma mère qui m'a constamment soutenue dans mes projets d'études. Je lui serai toujours reconnaissante de son support. Merci aussi à mon père pour avoir respecté mon choix de poursuivre mes études. Sa confiance en moi dans ce long projet a été grandement appréciée.

Finalement, je voudrais remercier Martin qui a été l'une de mes plus belles rencontres de l'institut. Merci pour ton support, ton attention et pour les révisions apportées à mon mémoire. Merci tout simplement d'être là avec moi.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, C. A., Groves, S., Gander, J. E. 1989. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease. *J. Bacteriol.* **171**: 5630-5637.
- Bacon, J. S. D., Gordon, A. H., Morris, E. J. 1975. Acetyl groups in cell-wall preparations from higher plants. *Biochem. J.* **149**: 485-187.
- Bascaran, V., Hardisson, C., Brana, A. F. 1990. Regulation of extracellular production in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 208-213.
- Biely, P., MacKenzie, C. R., Puls, J., Schneider, H. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnol.* **4**: 731-733.
- Biely, P., Côté, G. L., Kremnický, L., Grenne, R. V., Dupont, C., Kluepfel, D. 1996. Substrate specificity and mode of action of acetylxylyl esterase from *Streptomyces lividans*. *FEBS.* **396**: 257-260.
- Blum, D. L., Li, X-L., Chen, H., Ljungdahl, L. G. 1999. Characterization of an acetyl xylane esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3990-3995.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derevendá, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature.* **343**: 767-770.
- Brok, R. G. P. M., Dekker, N., Gerrits, N., Verheij, H. M., Tommassen, J. 1995. A conserved histidine residue of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A is important for activity. *Eur. J. Biochem.* **234**: 934-938.
- Chevallier, S., Goeltz, P., Thibault, P., Banville, D., Gagnon, J. 1992. Characterization of a propyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* **267**: 8192-8199.
- Christgau, S., Sandal, T., Kauppinen, M. S., Halkier, T., Dalboge, H. 1995. An enzyme with acetyl esterase activity. World intellectual property organization publication number W095/02689 international.
- Christov, L. P., Prior, B. A. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties, and significance. *Enz. Microb. Technol.* **15**: 460-475.
- Cohen, J. A., Oosterbaan, R. A., Berends, F. 1967. Organophosphorus compounds. *Methods. Enzymol.* **11**: 686-702.

- Coutinho, P. M., Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
- Degrassi, G., Okeke, B. C., Bruschi, C. V., Venturi, V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 789-792.
- DiIanni, C. L., Stevens, J. T., Bolgar, M., O'Boyle, D. R., Weinheimer, S. P., Colonna, R. J. 1994. Identification of the serine residue at the active site of the herpes simplex virus type 1 protease. *J. Biol. Chem.* **269**: 12672-12676.
- Dupont, C., Clarke, A. J. 1991. Dependence of lysosyme-catalysed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of *O*-acetylation. *Eur. J. Biochem.* **195**: 763-769.
- Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem.* **319**: 881-886.
- Egana, L., Gutierrez, R., Caputo, V., Peirano, A., Steiner, J., Eyzaguirre, J. 1996. Purification and characterization of two acetyl xylan esterase from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**: 33-39.
- Egelhoff, T. T., Fisher, R. F., Jacobs, T. W., Mulligan, J. T., Long, S. R. 1985. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. *DNA.* **4**: 241-248.
- Emmerich, J., Beg, O. U., Peterson, J., Previato, L., Brunzell, J. D., Brewer, H. B., Santamarina-Fojo, S. 1992. Human lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **6**: 4161-4165.
- Ferreira, L. M. A., Wood, T. M., Williamson, G., Faulds, C., Hazlewood, G. P., Black, G. W., Gilbert, H. J. 1993. A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain. *Biochem. J.* **294**: 349-355.
- Ghazaleh, F. A., Omburo, G. A., Colman, R. W. 1996. Evidence for the presence of essential histidine and cysteine residus in platelet cGMP-inhibited phosphodiesterase. *Biochem. J.* **317**: 495-501.
- Ghosh, D., Erman, M., Sawicki, M. W., Lala, P., Weeks, D. R., Li, N., Pangborn, W., Thiel, D. J., Jornvall, H., Eyzaguirre, J. 1998. National center for biotechnology information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Gusek, T. W., Kinsella, J. E. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**: 247-260.

- Halgasova, N., Kutejova, E., Timko, J. 1994. Purification and some characteristics of the acetyl xylan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem. J.* **298**: 751-755.
- Hattori, M., Adachi, H., Aoki, J., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K. 1995. Cloning and expression of a cDNA encoding the β -subunit (30-kDa subunit) of bovine platelet activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **270**: 31345-31352.
- Hayashi, H., Takehara, M., Hattori, T., Kimure, T., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K. 1998. Cloning and sequencing of *Clostridium thermocellum* xylanase genes. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
- Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J. 1993. Molecular biology of hemicellulases *dans*: Hemicellulose and Hemicellulases. Coughlan, M. P., Hazlewood, G. P. (Eds). Portland Press, London. pp-103-126.
- Higuchi, R. 1990. Recombinant PCR. *dans*: PCR Protocols. A guide to methods and applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. White, T. J. (Eds). Academic Press. pp-177-183.
- Holwerda, B. C., Wittwer, A. J., Duffin, K. L., Smith, C., Toth, M. V., Carr, L. S., Wiegand, R. C., Bryant, M. L. 1994. Activity of two-chain recombinant human cytomegalovirus protease. **269**: 25911-25915.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. Kieser, T., Bruton, C. J. Kieser, H. M. Lydiate, D. J. Smith, C. P. Ward, J. M. 1985. Genetic manipulation of streptomycetes. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.
- Horrevoets, A. J., Verheij, H. M., Haas, G. H. 1991. Inactivation of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A by the affinity label hexadecanesulfonyl fluoride. Evidence for an active-site serine. *Eur. J. Biochem.* **198**: 247-253.
- John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Schell, J. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 625-629.
- Johnson, K. G., Fontana, J. D., MacKenzie, C. R. 1988. Measurement of acetylxylan esterase in *Streptomyces*. *Methods Enzymol.* **160**: 551-560.
- Jones, K. L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* **57**: 141-145.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N., Bouriotis, V. 1993a. cDNA cloning of chitin deacetylase of *Mucor rouxii*. *dans*: Chitin Enzymology. Muzzarelli, R. A. A (Ed) Ancona, pp.-431-436.

- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N., Bouriotis, V. 1993b. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8005-8008.
- Katz, E., Thompson, C. J., Hopwood, D. A. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-2714.
- Keller, F. 1992. Purification and characterization of acetyl xylan esterases from *Streptomyces rubiginosus*. Thèse de doctorat, Swiss Federal Institute of Technology, Diss. ETH 9911.
- Keshavarz-Shokri, A., Suntornwat, O., Kitos, P. A. 1999. Identification of serine esterases in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* **267**: 406-411.
- Koller, W., Kolattukudy, P. E. 1982. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases. *Biochem.* **21**: 3083-3090.
- Komerlink, F. J. M., Lefebvre, B., Strozyk, F., Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* **27**: 267-282.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lehner, R., Verger, R. 1997. Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. *Biochemistry.* **36**: 1861-1868.
- Lindberg, B., Rosell, K. G., Svensson, S. 1973. Positions of the O-acetyl groups in birch xylan. *Svensk Papperstid.* **76**: 30-32.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lüthi, E., Jasmat, N. B., Bergquist, P. L. 1990. Overproduction of an acetylxylan esterase from the extreme thermophile «*Caldocellum saccharolyticum*» in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 214-219.
- Magnuson, T. S., Crawford, D. L. 1992. Comparaison of extracellular peroxidase- and esterase-deficient mutants of *Streptomyces viridosporus* T7A. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1070-1072.
- Margoles-Clarke, E., Tenkanen, M., Soderlund, H., Penttila, M. 1996. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose binding domain. *Eur. J. Biochem.* **237**: 553-560.

- Mc Dermid, K. P., Forsberg, C. W., MacKenzie, C. R. 1990. Purification and properties of an acetylxylan esterase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3805-3810.
- Messing, J., Crea, R., Seeburg, P. H. 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**: 309-321.
- Miles, E. W. 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods. Enzymol.* **47**: 431-443.
- Millward-Sadler, S. J., Poole, D. M., Henrissat, B., Hazlewood, G. P., Clarke, J. H., Gilbert, H. J. 1994. Evidence for a general role for high-affinity non catalytic cellulose binding domain in microbial plant cell wall hydrolases. *Mol. Microbiol.* **11**: 375-382.
- Millward-Sadler, S. J., Davidson, K., Hazlewood, G. P., Black, G. W., Gilbert, H. J., Clarke, J. H. 1995. Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Biochem. J.* **312**: 39-48.
- Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene.* **49**: 323-329.
- Nagamine, T., Takenaka, A., Aminov, R. I., Ogata, K., Sugiura, M., Tajima, K., Itabashi, H. Cloning, molecular analysis and expression of xylanase gene from *Ruminococcus albus* 7. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
- Pazirandeh, M., Chirala, S. S., Wakil, S. J. 1991. Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. **266**: 20946-20952.
- Puls, J., Tenkanen, M., Korte, H. E., Poutanen, K. 1991. Products of hydrolysis of beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and an acetyl xylan esterase. *Enz. Microb. Technol.* **13**: 483-486.
- Qiu, X., Culp, J. S., DiLella, A. G., Hellmig, B., Hoog, S. S., Janson, C. A., Smith, W. W., Abdel-Meguid, S. S. 1996. Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. *Lett. Nature.* **383**: 275-279.
- Ross, N. W., Johnson, K. G., Braun, C., MacKenzie, R., Schneider, H. 1992. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complex from *Populus deltoides*: Effects of combinations of β -mannases xylanase, and acetyl xylan esterase. *Enz. Microb. Technol.* **14**: 90-95.

- Sakai, S., Fukuba, M., Hasui, Y., Moriyoshi, K., Ohmoto, T., Fujota, T., Ohe, T. 1998. Purification and characterization of an esterase involved in poly(vinyl alcohol) degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 2000-2007.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467
- Shao, W., Wiegel, J. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 729-733.
- Shareck, F., Biely, P., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1995. Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene.* **153**: 105-109.
- Stevens, J. T., Mapelli, C., Tsao, J., Hail, M., O'Boyle, D., Weinheimer, S. P., DiIanni, C. L. 1994. *In vitro* proteolytic activity and active-site identification of the human cytomegalovirus protease. *Eur. J. Biochem.* **226**: 361-367.
- Talesa, V., Grauso, M., Arpagaus, M., Giovannini, E., Romani, R., Rosi, G. 1999. Molecular cloning and expression of a full-length cDNA encoding acetylcholinesterase in optic lobes of the squid *Loligo opalescens*: a new member of the cholinesterase family resistant to diisopropyl fluorophosphate. *J. Neurochem.* **72**: 1250-1258.
- Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Iio, T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M., 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.
- Wang, A., Loo, R., Chen, Z., Dennis, E. A. 1997. Regiospecificity and catalytic triad of lysophospholipase I. *J. Biol. Chem.* **272**: 22030-22036.
- Ward, V. K., Bonning, B. C., Huang, T., Shiotsuki, T., Griffeth, W. N., Hammock, B. D. 1992. Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.* **24**: 1933-1941.
- Whittaker, R. G., Manthey, M. K., Le Brocque, D. S., Hayes, P. J. 1994. A microtiter plate assay for the characterization of serine proteases by their esterase activity. *Anal. Biochem.* **220**: 238-243.
- Yates, J. R. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass. Spectro.* **33**: 1-19.

Yoshimoto, T., Walter, R., Tsuru, D. 1980. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. J. Biol. Chem. **255**: 4786-4792.

ANNEXES

Annexe A : Liste des produits chimiques utilisés au cours de cette étude.

Acétate de sodium (Fluka)
Acide acétique glacial (Fisher)
Acide formique (J.T. Baker)
Acétonitrile (OmniSolv)
Acide borique (BioRad)
Acide N-Tris [Hydroxyméthyl] méthyl-2-aminoéthanesulfonique (Sigma)
Acide sulfurique (Fisher)
Acrylamide (BioRad)
Agar (Difco)
Agarose (Boehringer Mannheim)
Ampicilline (Boehringer Mannheim)
Anhydride acétique (Sigma)
Anticorps anti-lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim)
ATP : Adénosine triphosphate (Pharmacia LKB)
Azide de sodium (Fisher)
Azocaséine (Sigma)
Bacto Simmons-Citrate Agar (Difco)
Bacto-tryptone (Difco)
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Boehringer Mannheim)
Bleu de bromophénol (Bio-Rad)
Bleu de Coomassie (BioRad)
Bicarbonate-d'ammonium (MCIB)
Borate de sodium (J.T. Baker)
Bormure d'éthidium (BioRad)
Casamino acid (Difco)
Chloroforme (BDH)
Chlorure de calcium (BDH)
Chlorure de cobalt (J.T. Baker)
Chlorure de cuivre (Fisher)
Chlorure de fer (Anachemia)
Chlorure de magnésium (BDH)
Chlorure de potassium (Mallinckrodt Chemical works)
Chlorure de sodium (BDH)
Chlorure de zinc (Fisher)
Citrate de sodium (Anachemia)
2'-Déoxyadénine-5'-triphosphate :dATP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxycytosine-5'-triphosphate :dCTP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxyguanine-5'-triphosphate :dGTP (Pharmacia LKB)
2'-Déoxythymidine-5'-triphosphate :dTTP (Pharmacia LKB)
Diméthylformamide (BDH)
DFP : Fluorophosphate de diisopropyle (Calbiochem)
[³H]DFP : Fluorophosphate de diisopropyle marqué au tritium (Mandel Scientifics)
DTT : Dithioérythritol (BioRad)
DMSO : Diméthylsulfoxyde (Sigma)

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique (BDH)
Ethanol (BDH)
Extrait de bœuf (Difco)
Extrait de levure (Difco)
Gélatine (BioRad)
Glucose (BDH)
Glycérol (ICN)
Glycine (ICN)
Guanidine-HCl (Boehringer mannheim)
Huile de paraffine (BDH)
Hydroxyde de sodium (Fisher)
Hydroxyquinoline (Sigma)
Iodoacétamide (Sigma)
IPTG : Isopropylthio- β -D-galactoside (Gibco BRL)
Isopropanol (BDH)
Lait écrémé déshydraté (Difco)
Liquide à scintillation Eco Lite (ICN)
Maltose (Difco)
 β -mercaptoéthanol (Pharmacia)
Mes : acide (2-[N-morpholino] éthanesulfonique) (Sigma)
Méthanol (OmniSolv)
Méthionine (Sigma)
NBT : nitro bleu tétrazolium (Boehringer Mannheim)
NZ-amine A (Sheffields Products)
PEG : polyéthylène glycol (Boehringer Mannheim)
Persulfate d'ammonium (BioRad)
Phosphate de sodium monobasique (Fluka)
Phosphate de sodium dibasique (Fluka)
Phosphate de potassium monobasique (BDH)
Phosphate de potassium dibasique (BDH)
PMSF : Fluorure de benzyle sulfonyle (Sigma)
L-proline (Gibco BRL)
Phénol (Boeigringer Mannheim)
Polyéthylène glycol 6000 (Sigma)
Propionamide (Aldrich Chemical Co)
SDS : Dodécyl sulfate de sodium (BDH)
Standard de masse moléculaire d'ADN « 1 KB plus ladder » (Gibco BRL)
Standard de poids moléculaire de protéines Rainbow mix (Amersham)
Sucrose (BDH)
Sulfate d'ammonium (Fisher)
Sulfate de cuivre (J.T. Baker)
Sulfate de fer (J.T. Baker)
Sulfate de magnésium (Fisher)
Sulfate de potassium (Anachemia)
Sulfate de zinc (J.T. Baker)

Tampon One-Phor-All 10 X (Pharmacia LKB)
TCA : Acide trichloro acétique (BDH)
TEMED : N,N,N',N'-tétra méthyléthylène diamine (BioRad)
TFA : Acide trifluoroacétique (Fluka)
Thiostreptone (Sigma)
Tris-Base (Boehringer Mannheim)
Triton (Bio Rad)
Trypsine de pancréas de bovin (Boehringer Mannheim)
Trypsine « Sequencing grade » (Promega)
TSB : Typtic Soy Broth (Difco)
Tween 20 (BioRad)
Tween 80 (Fisher)
Tyrosine (Gibco BRL)
Xylène Cyanol (BioRad)
Xylane de bouleau (Fluka)
Xylose (Sigma)

Enzymes

ARNase A (Pharmacia LKB)
Lysosyme (Pharmacia LKB)
Pfu ADN polymérase (Stratagene)
S1 nucléase (Pharmacia LKB)
T4 ADN ligase (Pharmacia LKB)
Enzymes de restriction (Pharmacia LKB)

Trousses

Flexi Prep Kit (Pharmacia)
Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia)

Annexe B : Milieu de sporulation Bennett-thiostrepton (Jones. 1949)

Extrait de levure	1,0 g
Extrait de bœuf	1,0 g
NZ amine A	2.0 g
Maltose	10,0 g

Ajuster le pH à 7,3 avec du NaOH

Bacto-Agar	20,0 g
------------	--------

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Laisser refroidir jusqu'à ce que la température soit de 55°C

Ajouter stérilement 1 mL d'une solution de thiostrepton 50 mg/mL

Répartir 20 mL par plaque de Pétri

Annexe C : Milieu 2XTY

Bacto-tryptone	16,0 g
Extrait de levure	10,0 g
NaCl	5,0 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Pour le milieu solide, ajouter 15 g d'agar par litre de milieu

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Répartir 20 mL par plaque de Pétri pour le milieu solide

Annexe D : Milieu solide de culture Simmons-Citrate

Bacto Simmons-Citrate Agar 24,2 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Ajouter stérilement

0,4 % glucose (p/v)

0,01 % thiamine (p/v)

Répartir 20 mL par plaque de Pétri

Annexe E : Milieu de régénération R5 (Hopwood *et al.*, 1985)

Agar	22,0 g
Casamino acid	100 mg
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	10,0 g
K ₂ SO ₄	250 mg
MgCl ₂ •6H ₂ O	10,12 g
Sucrose	103,0 g
Tampon TES	5,73 g
Solution d'éléments trace	2,0 mL

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Ajouter stérilement

KH ₂ PO ₄ (p/v) 0,5 %	10,0 mL
CaCl ₂ 5M	4,0 mL
L-proline 20 % (p/v)	15,0 mL
CuSO ₄ 5 mg/mL	1,0 mL
Méthionine 1 % (p/v)	10,0 mL
Tyrosine (40 % (p/v) dans NaOH 1N)	5,0 mL

Verser 20 mL par plaque de Pétri et laisser sécher à 85% du poids original (environ 5 jours à la température de la pièce)

Solution éléments trace

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ •6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ •2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ •4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O	10 mg

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Annexe F : Milieu TSB

Tryptic Soy Broth 27,5 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Ajouter du thioestreptone de façon à obtenir une concentration finale de 5 mg/L

Annexe G : Milieu M14

K_2HPO_4	5,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,4 g
Tween 80	2,0 mL
Solution de sels minéraux (sels de Mandels)	1,0 mL

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Ajuster le pH à 7,4

Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Ajouter stérilement

$MgSO_4$ (solution 5 % (p/v) autoclavée)	6,0 mL/L
$CaCl_2$ (solution 3% (p/v) autoclavée)	10,0 mL/L

Sels de Mandels

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	140 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	160 mg
$FeSO_4 \cdot H_2O$	500 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200 mg

Compléter avec 10 mL d'eau distillée

Annexe H : Milieu H

Agar	12,0 g
Bacto-tryptone	10,0 g
NaCl	8,0 g

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée
Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Répartir 20 mL par plaque de Pétri

Annexe I : Gélose molle

Bacto-tryptone	10 g
NaCl	8 g
Agar	8 g

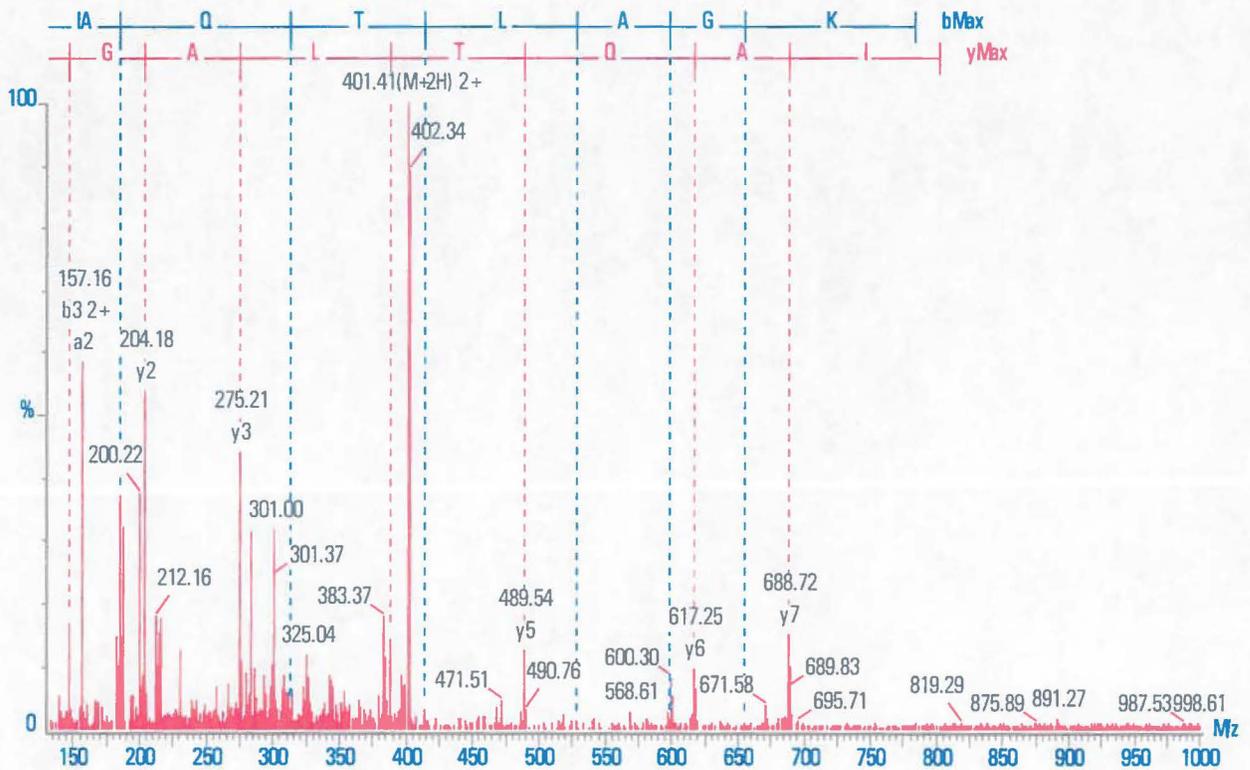
Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

Répartir 3 mL de milieu par éprouvette

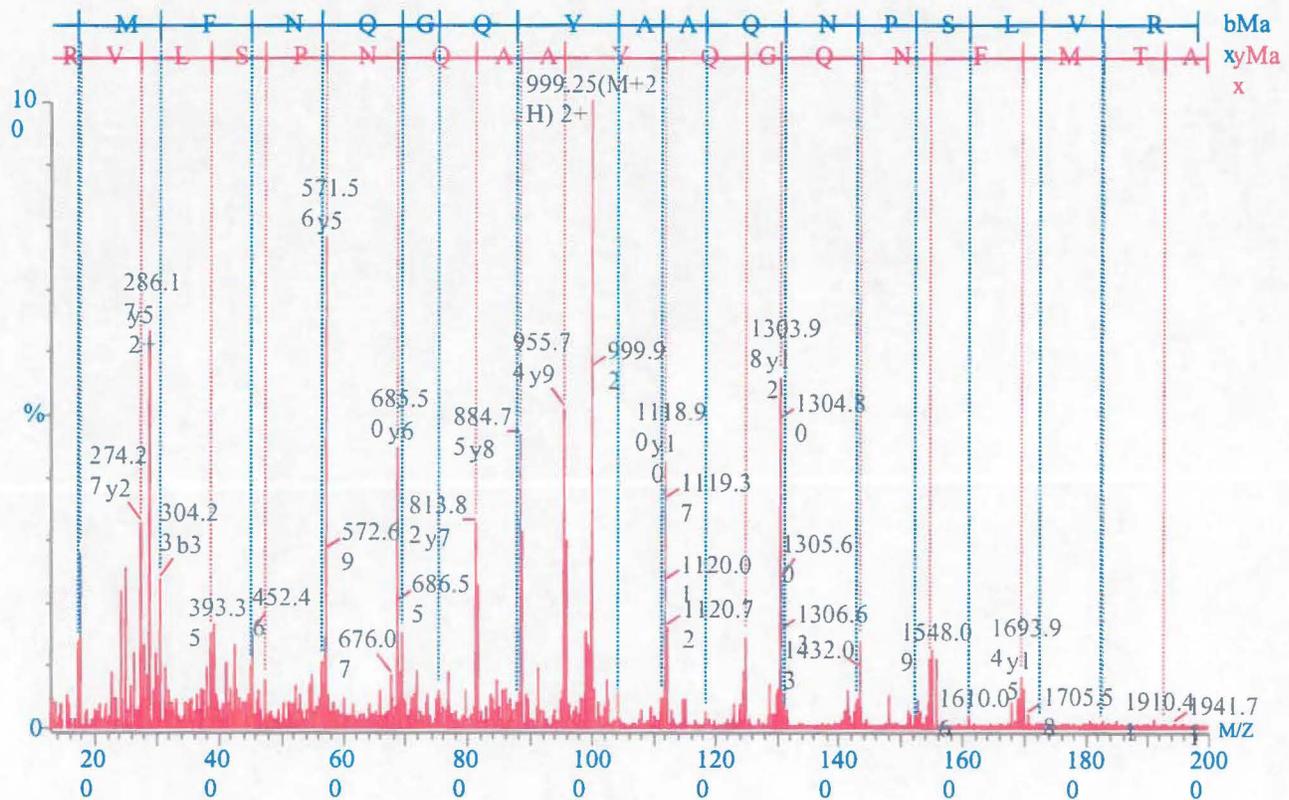
Autoclaver : 95 kPa à 121°C pendant 15 min

Annexe J : Spectre de masse des valeurs m/z provenant de la fragmentation d'ions peptidiques. Les peptides sont issus d'une digestion de l'AxeA_{tr} par la trypsine en utilisant un ratio trypsine : AxeA_{tr} de 1/20 (p/p). Les peptides sont injectés dans le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II dans les conditions suivantes : un voltage de 1,41 kV attribué au capillaire, un voltage de 36 V au cône, une température de 100°C au bloc source, une température de 160°C attribuée à l'azote pour la désolvatation et une énergie de collision de 34,5 V attribuée à la cellule de collision. Les acides aminés indiqués en bleus et rouges proviennent d'une fragmentation de type b et y respectivement.

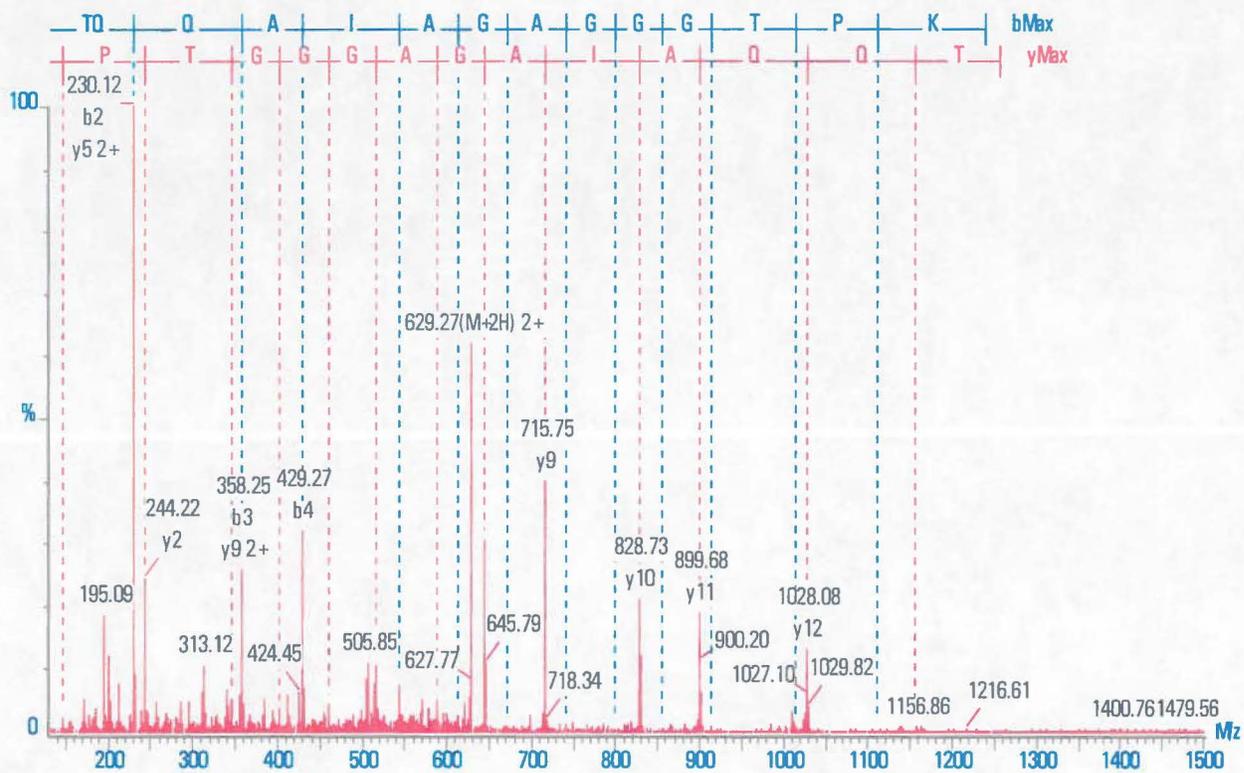
Annexe J-1 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 401 Da représentant le peptide IAQTLAGK



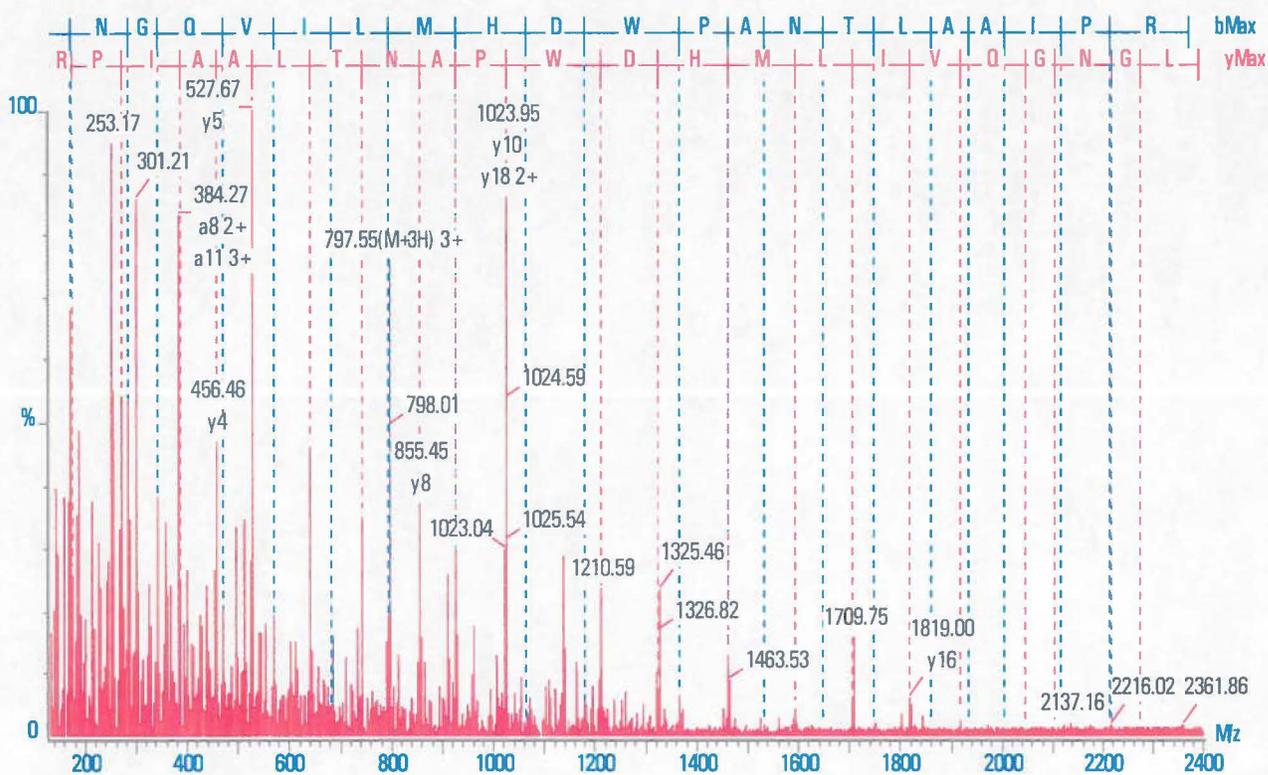
Annexe J-2 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 999 Da représentant le peptide
 ATMFNQGYAAGNQGNPSLVRTA



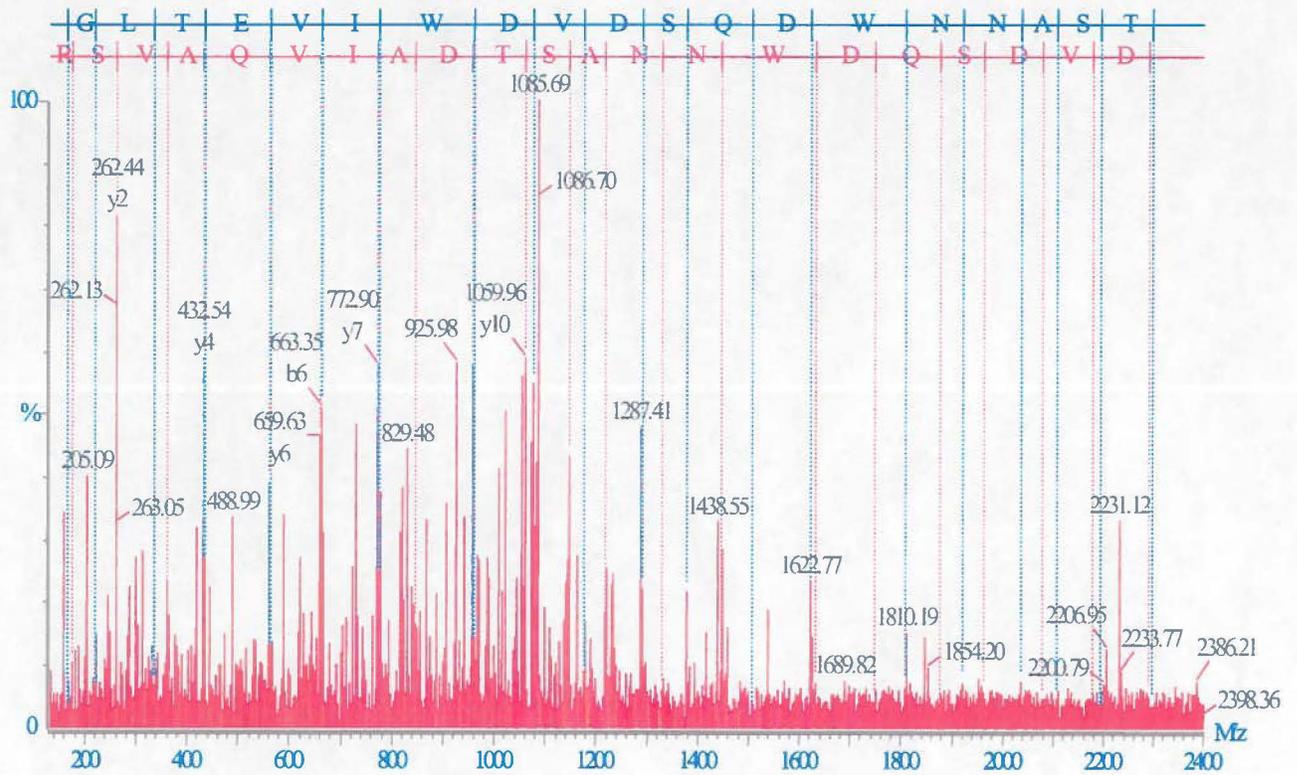
Annexe J-3 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 629 Da représentant le peptide
TQQAIAAGGGTPK



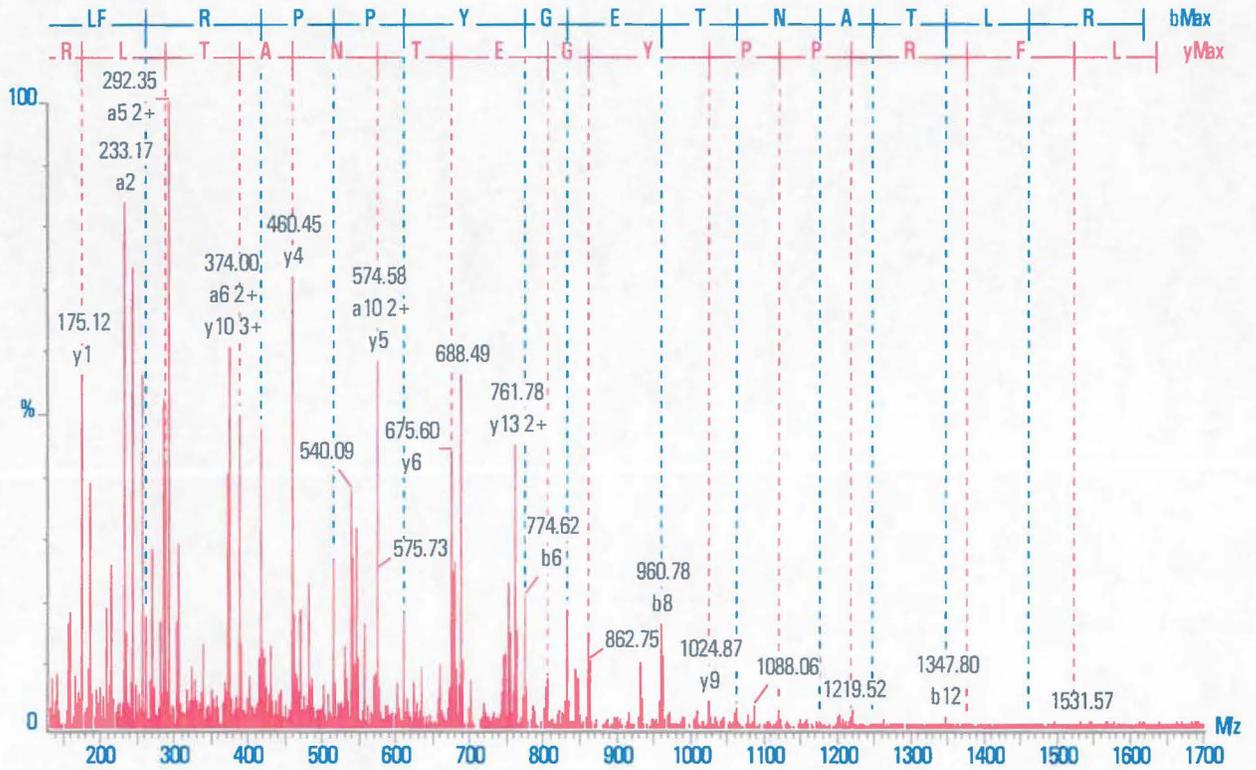
Annexe J-4 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 797 Da représentant le peptide
 LGNGQVILMHDWPANTLAAIPR



Annexe J-5 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 1085 Da correspondant au peptide
 YGLTEVIWDVDSQDWNNASTDAIVQAVSR

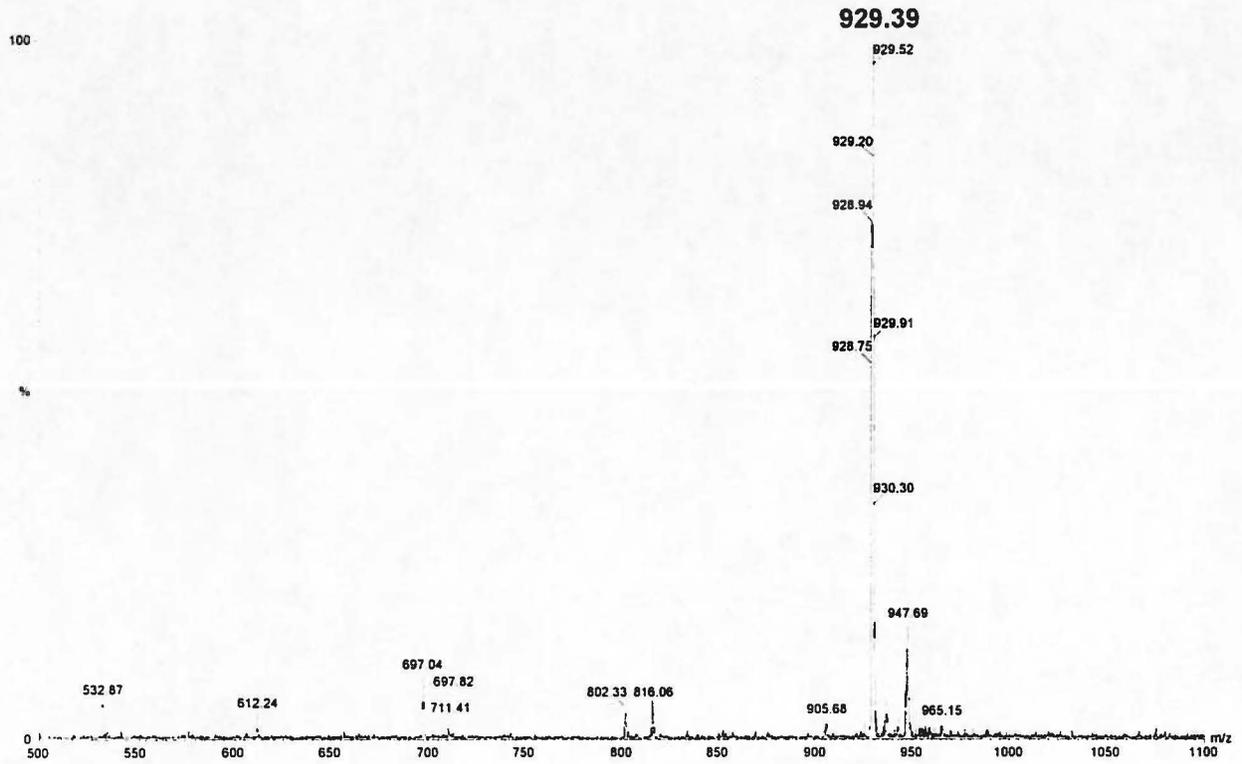


Annexe J-6 : Fragmentation de l'ion de valeur m/z de 546 Da correspondant au peptide LFRPPYGETNATLRL

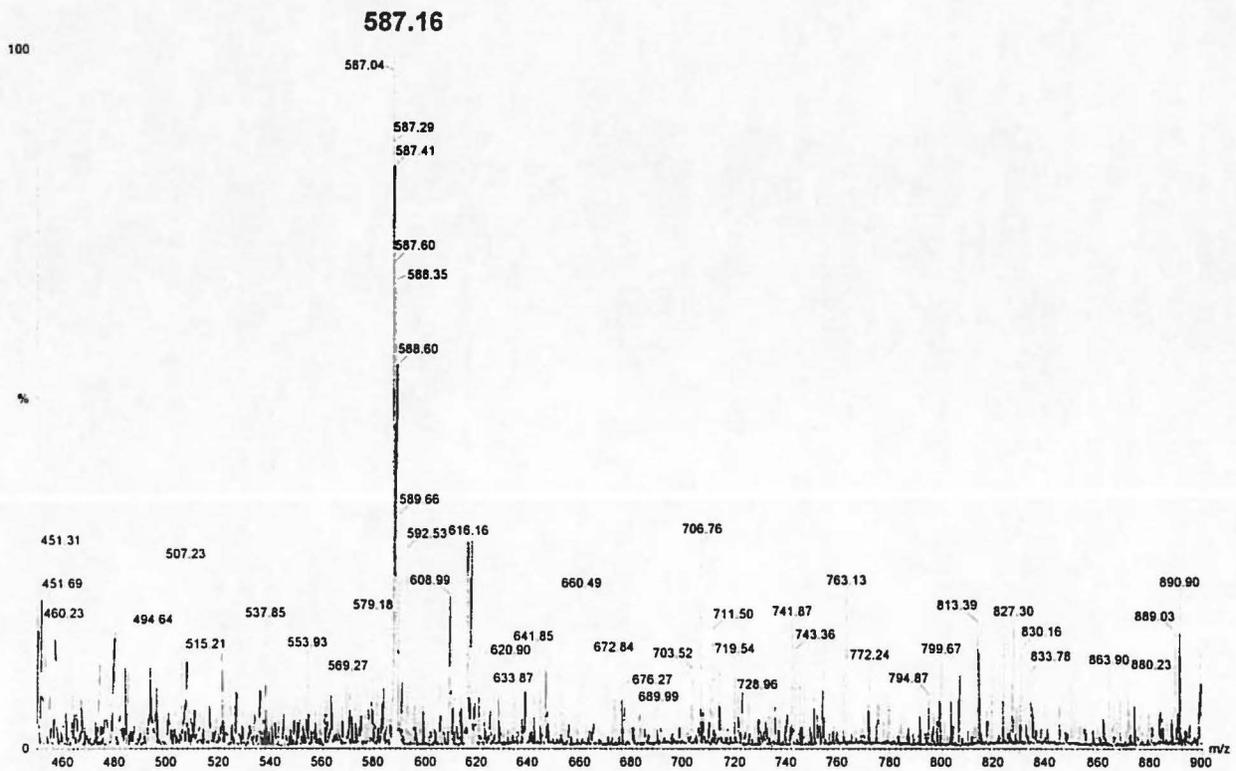


Annexe K : Spectre de masse des valeurs m/z des ions peptidiques issus d'une digestion de l'AxeA_r inhibée au DFP, par la trypsine en utilisant un ratio trypsine : AxeA_r de 1/20 (p/p). L'échantillon de peptides a été injecté au système LC/MS. Une colonne à phase inversée C₁₈ branchée sur un HPLC (Hewlett Packard), a été utilisée pour la chromatographie à phase liquide. Le spectromètre de masse Micromass modèle Quattro II a été utilisé pour obtenir la masse moléculaire des peptides. Les conditions utilisées au LC/MS sont les suivantes : un voltage de 3,16 kV attribué au capillaire, un voltage de 12 V au cône, une température de 120°C au bloc source et une température de 180°C attribuée à l'azote pour la désolvatation. Pour la chromatographie, une colonne C₁₈ de dimension 4,0 mm X 125 mm a été utilisée. Un débit linéaire de 48cm/h a été appliqué et de l'acétonitrile 68% (v/v) a été utilisé comme éluant.

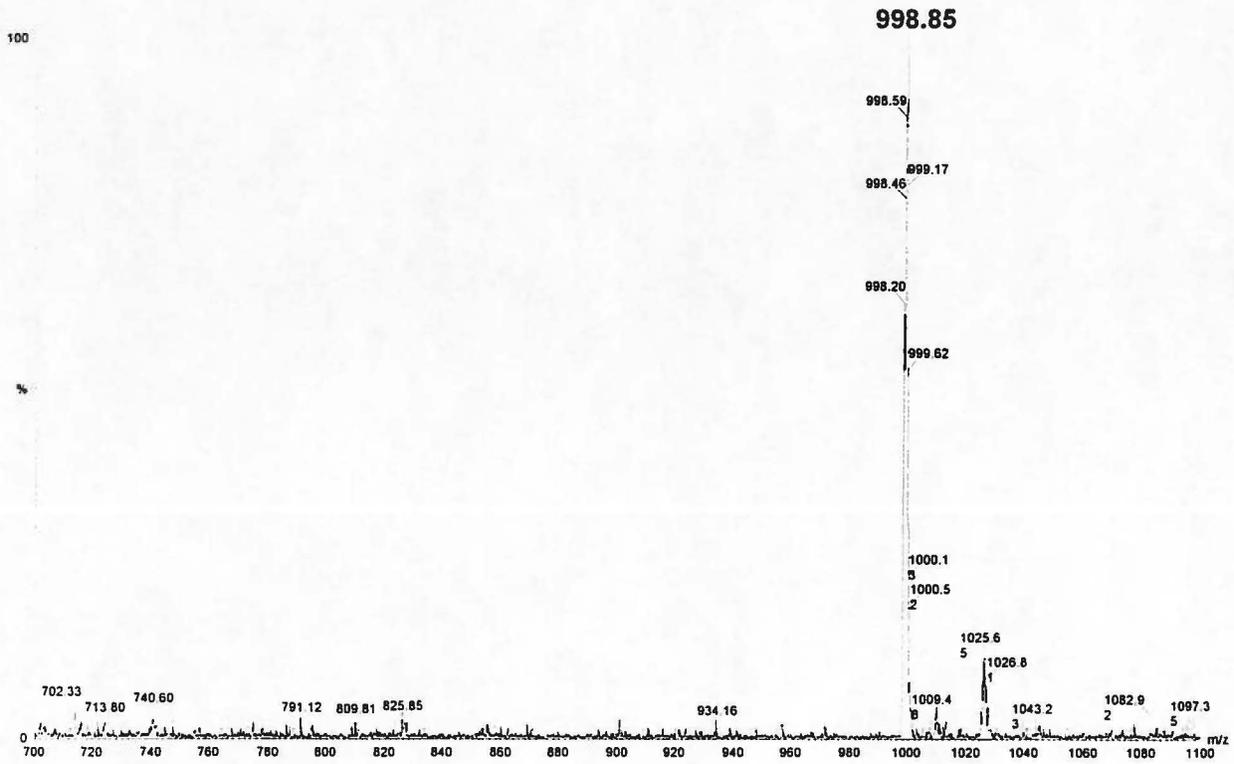
Annexe K-1 : Ion de valeur m/z de 929,39 Da apparaissant à un temps d'élution de 35,3 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide AACNGYVGLTFDDGPSGSTQSLNLR



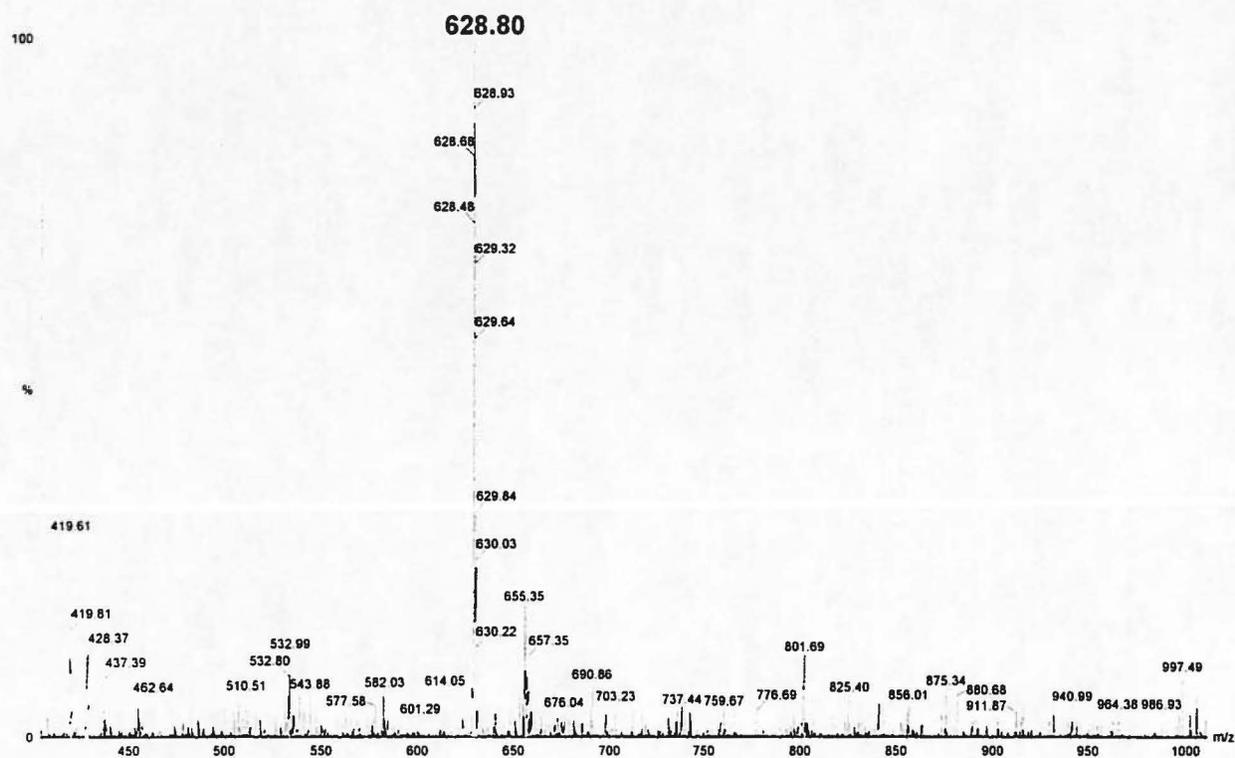
Annexe K-2 : Ion de valeur m/z de 587,16 Da apparaissant à un temps d'élution de 13.3 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide QNGLR



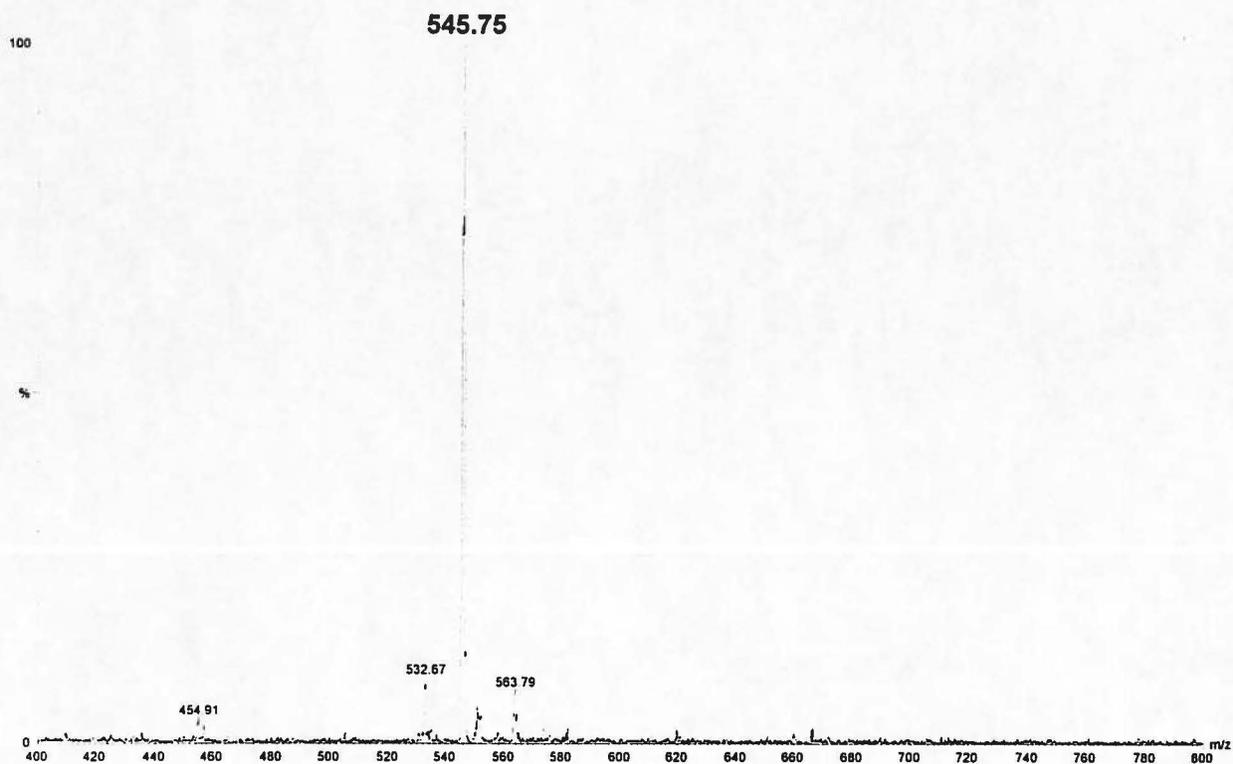
Annexe K-3 : Ion de valeur m/z de 998,85 Da apparaissant à un temps d'éluion de 26.8 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide ATMFNQGYAAQNPSLVR



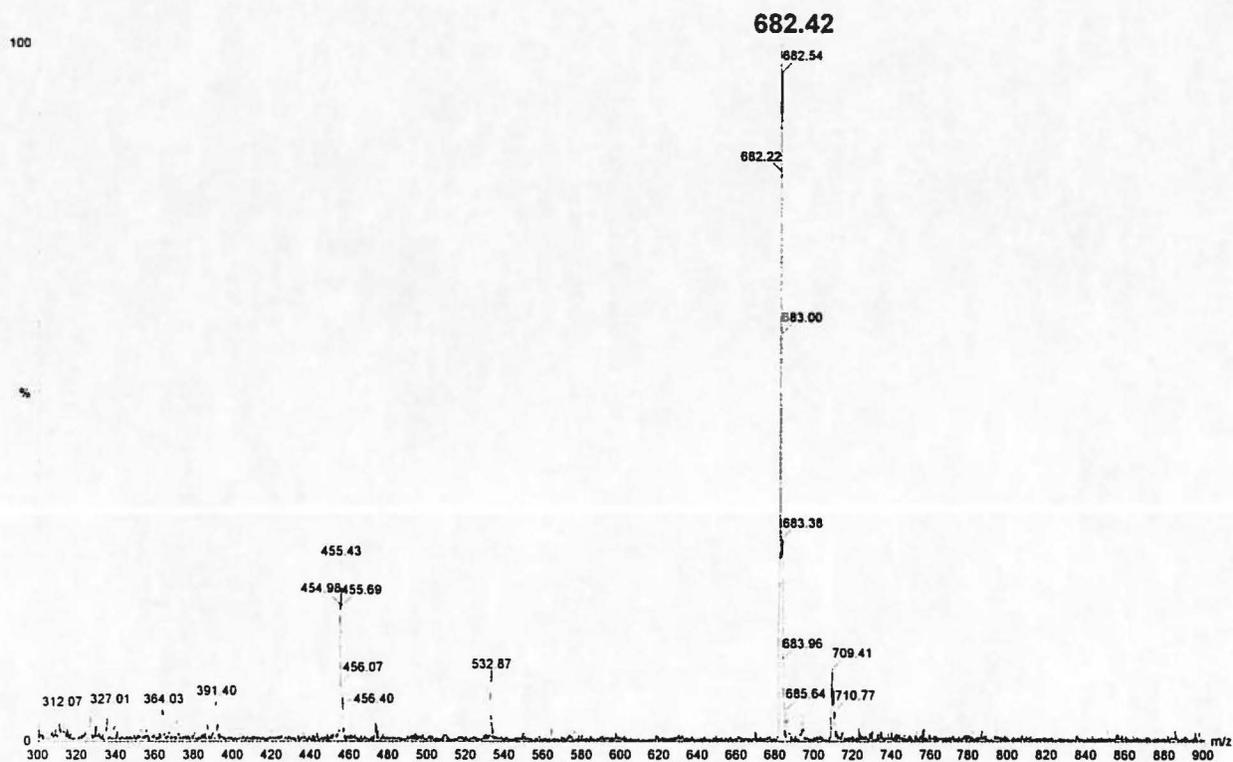
Annexe K-4 : Ion de valeur m/z de 628,80 Da apparaissant à un temps d'élution de 17.02 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide TQQAIAGAGGGTPK



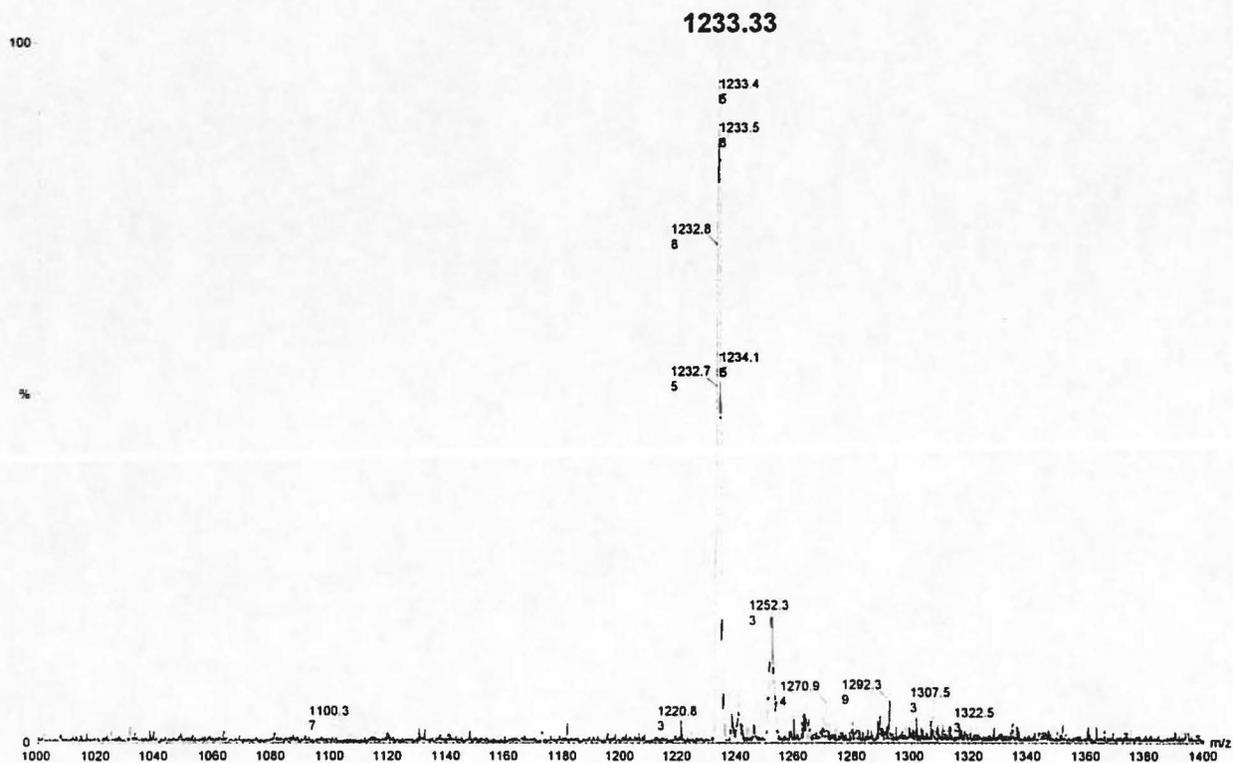
Annexe K-5 : Ion de valeur m/z de 545,75 Da apparaissant à un temps d'élution de 27,99 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide LFRPPYGETNATLR



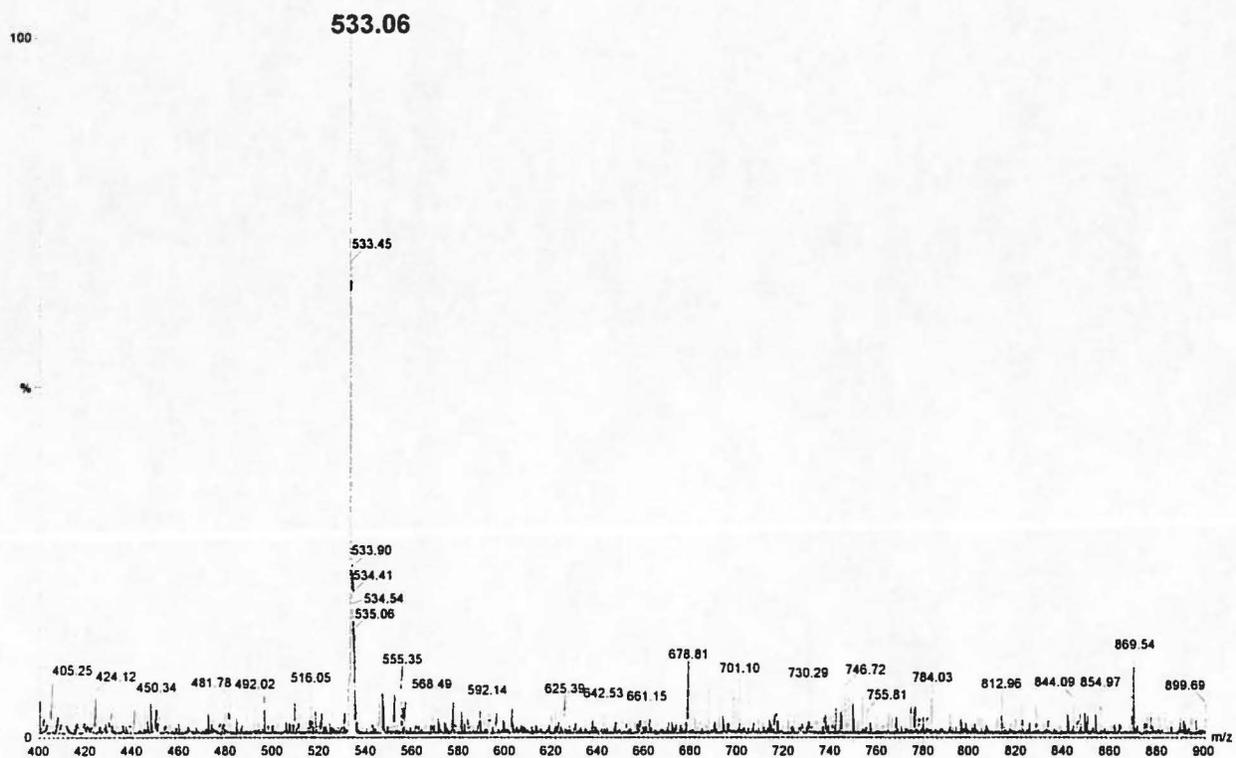
Annexe K-6 : Ion de valeur m/z de 682,42 Da apparaissant à un temps d'élution de 23,40 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide GLCSGMISPQTGR



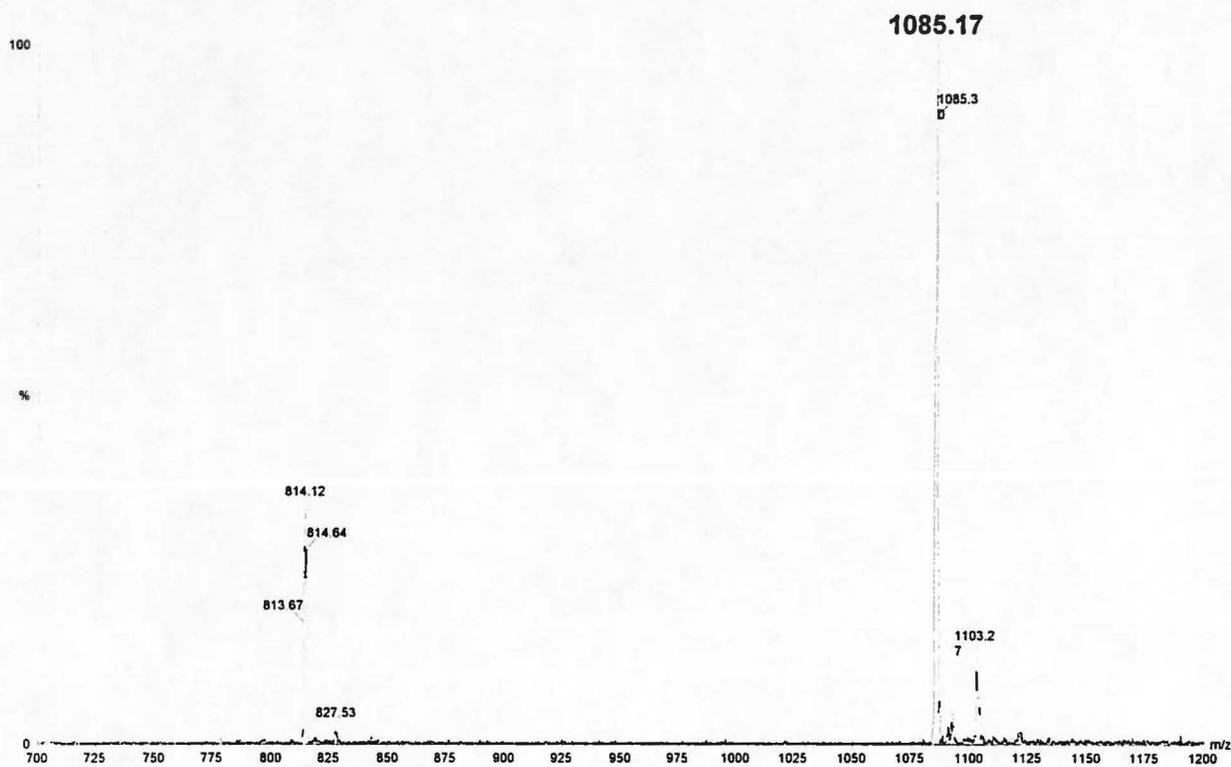
Annexe K-7 : Ion de valeur m/z de 1233,33 Da apparaissant à un temps d'élution de 33.1 min . Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide AQVDAGMWVANHSYTHPHMTWLGWAWMDSEISR



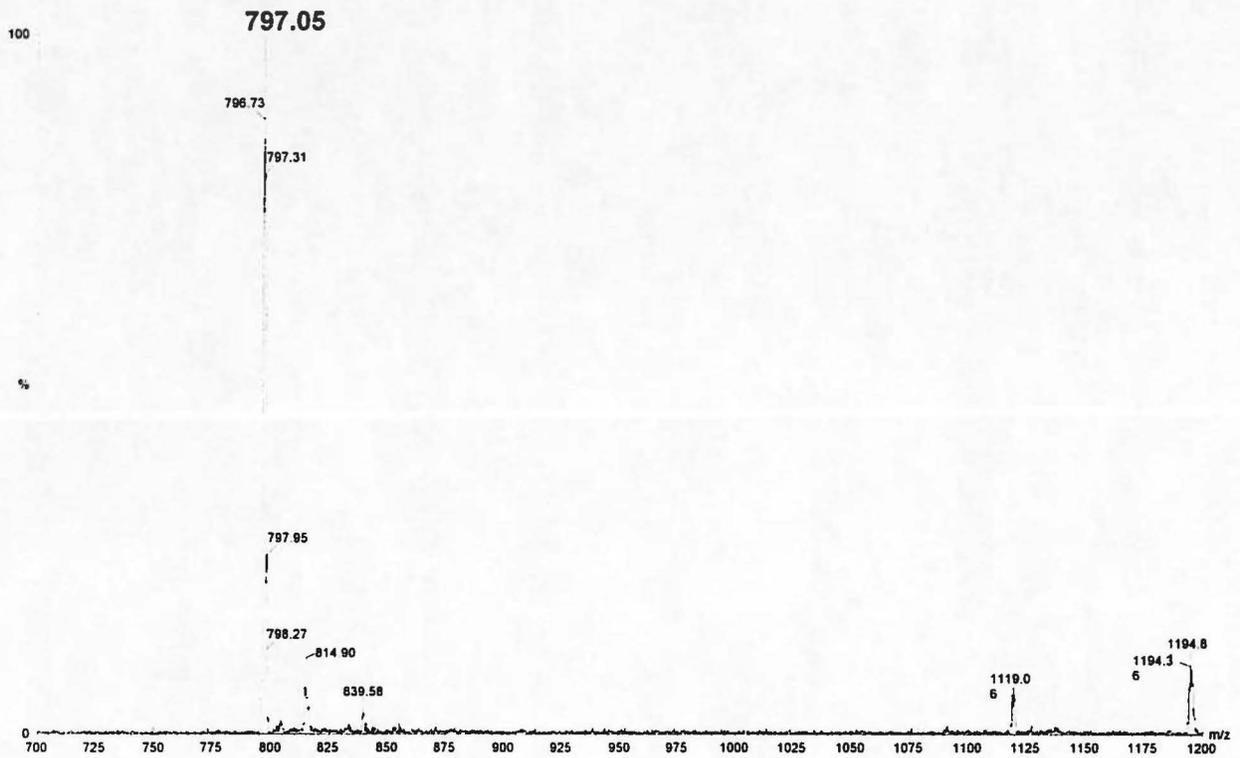
Annexe K-8 : Ion de valeur m/z de 533.06 Da apparaissant à un temps d'élution de 8.7 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide SVEAK



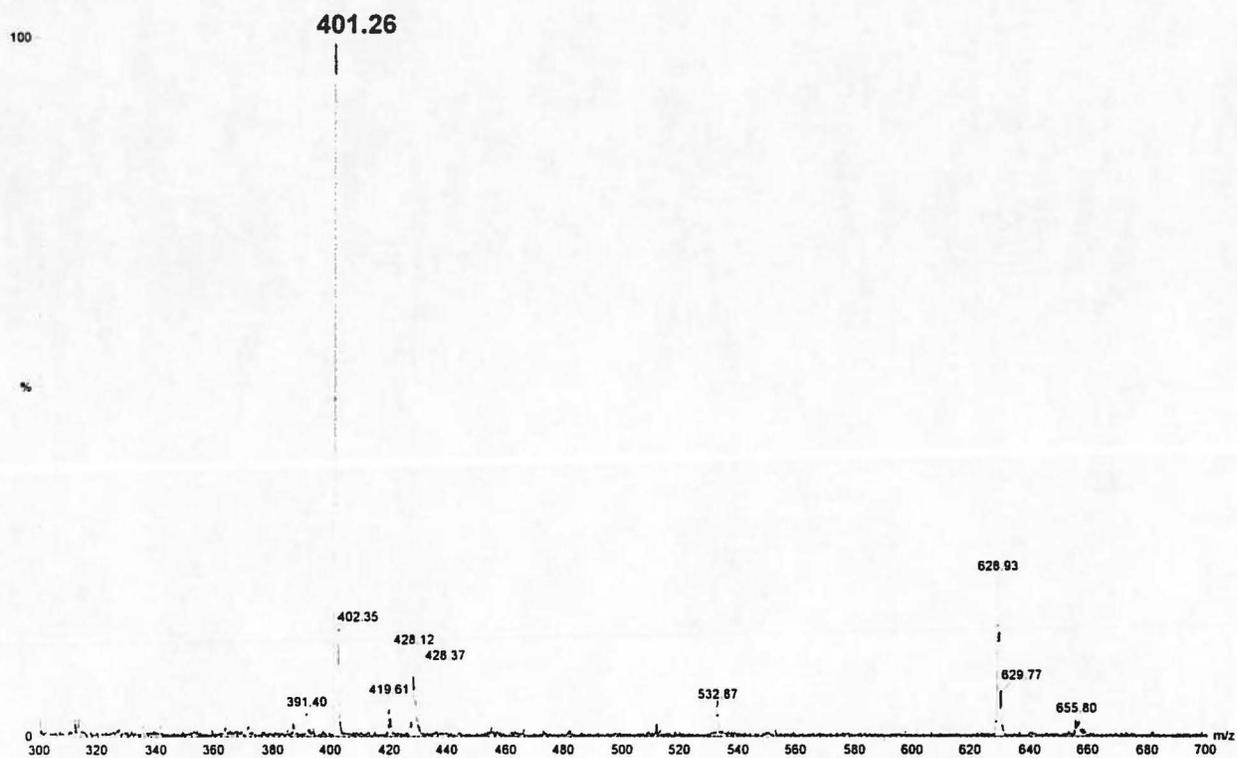
Annexe K-9 : Ion de valeur m/z de 1085,17 Da apparaissant à un temps d'éluion de 40,2 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide YGLTEVIWDVDSQDWNNASTDAIVQAVSR



Annexe K-10 : Ion de valeur m/z de 797,05 Da apparaissant à un temps d'élution de 37.5 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide LGNGQVILMHDWPANTLAAIPR



Annexe K-11 : Ion de valeur m/z de 401,26 Da apparaissant à un temps d'élution de 17,4 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide IAQTLAGK



Annexe K-12 : Ion de valeur m/z de 616,18 Da apparaissant à un temps d'élution de 12,4 min. Cet ion correspond à la masse moléculaire théorique du peptide AVAPDGS

