Thuy Diem Trinh Lam

### Purification et caractérisation de la protéine codée par le gène *bxlA* de *Streptomyces lividans*

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

> Été 1999 INSTITUT ARMAND-FRAPPIER Université du Québec

> > 4

# Table des matières

| TABLE DES MATIÈRESi  |
|--|
| LISTE DES TABLEAUXvi   |
| LISTE DES FIGURES  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONSix   |
| SOMMAIRE   |
| INTRODUCTION   |
| REVUE DE LITTÉRATURE4  |
| 1.0 Les streptomycètes       5         1.1 Propriétés générales des streptomycètes       5         1.2 Génome des streptomycètes       5         1.3 Importance au niveau industriel       6         1.4 Streptomyces lividans       7         1.5 Streptomyces lividans       8           |
| 2.0 La cellulose   |
| 2.1 Les cellulases   |
| 3.0 L'hémicellulose10  |
| <ul> <li>3.1 Les enzymes hémicellulolytiques : la mannanase, les arabinofuranosidases, les acétylestérases et les α-glucuronidases</li></ul>   |
| 4.0 La β-xylosidase15  |
| 4.1 Généralités       15         4.2 Organismes producteurs de β-xylosidases       15         4.3 Propriétés physico-chimiques des β-xylosidases       18         4.4 Activité spécifique de la β-xylosidase       20         4.5 Répression de la biosynthèse de la β-xylosidase       20 |

| ii<br>4.6 Instabilité de l'enzyme21                                |
|--|
| 5.0 La β-xylosidase chez S. lividans                               |
| <ul> <li>5.1 Plasmide pIAF2: activité de la β-xylosidase</li></ul> |
| 6.0 Méthode de dépistage de l'activité enzymatique29               |
| 7.0 Purification de protéines par chromatographie                  |
| 7.1 Principe de la chromatographie en phase liquide                |
| OBJECTIFS  |
| APPROCHE EXPÉRIMENTALE   |
| 1.0 Produits utilisés  |
| 2.0 Amorces nucléotidiques41                                       |
| 3.0 Phages et vecteurs   |
| 3.1 Phages M13mp18 et M13mp1943<br>3.2 Plasmide pIJ70243           |
| 4.0 Souches bactériennes   |
| 4.1 <i>E. coli</i> DH11S   |
| 4.2 <i>S. lividans</i> 10-164                                      |

|  | iii |
|--|-----|
| 5.0 Milieux de culture                   |     |
| 5.1 Milieu 2XTY:                         |     |
| 5.2 Milieu H                             | 45  |
| 5.3 Géloses molles                       | 45  |
| 5.4 Milieu solide R5                     |     |
| 5.5 Milieu liquide R5                    |     |
| 5.6 Milieu Bennett avec du thiostreptone |     |
| 5.7 Lyophilisation des souches           |     |
| 5.8 Milieu TSB                           |     |
| 5.9 Milieu M14                           | 47  |

| 6.0 Clonage des gènes dans S. lividans                        |    |
|---|----|
| 6.1 Amplification élective in vitro (PCR) d'un fragment d'ADN |    |
| 6.2 Digestion enzymatique                                     |    |
| 6.3 Ligation  |    |
| 6.4 Analyse d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose         |    |
| 6.5 Élution des fragments d'ADN sur gel d'agarose             | 50 |

| 7.0 Bactéries compétentes                          | 51 |
|--|----|
| 7.1 Préparation des cellules compétentes d'E. coli | 51 |
| 7.2 Préparation des protoplastes de S. lividans    |    |

| 3.0 Transformation bactérienne             |
|--|
| 8.1 Transformation d' <i>E. coli</i> DH11S |

| 9.0 Extraction et purification de l'ADN  | 100   |
|--|-------|
| 9.1 Extraction de l'ADN plasmidique ou des formes réplicatives du phage M13 d'E. |       |
| coli54   | į.    |
| 9.2 Extraction d'ADN simple brin du phage M1354                                  |       |
| 9.3 Extraction d'ADN de S. lividans  | 10000 |

| 10.0 Criblage des transformant | par vaporisation au MUX |  |
|--------------------------------|-------------------------|--|
|--------------------------------|-------------------------|--|

| IV  | ľ         |
|---|-----------|
| 11.0 Production de la β-xylosidase57  | 7         |
| 11.1 Conditions de culture  | 1         |
| 11.1.1 Mise en pré-culture  | 7         |
| 11.1.2 Production en milieu minimal M1457   | 1         |
| 11.2 Préparation de l'extrait enzymatique58   | \$        |
| 11.3 Essais enzymatiques quantitatifs58   | 5         |
| 12.0 Mise au point de la purification de la β-xylosidase                                    | )         |
| 12.1 Purification par chromatographie à échangeur ionique                                   | )         |
| 12.2 Purification par chromatographie à interactions hydrophobiques60                       | )         |
| 13.0 Purification des protéines60   | )         |
| 13.1 Chromatographie à interactions hydrophobiques  | 1         |
| 13.2 Ultrafiltration : concentration sur une membrane de type Amicon                        |           |
| 14.0 Dosage des protéines63   |           |
| 15.0 Analyse des protéines  | ł         |
| 15.1 Analyse sur gel de polyacrylamide 12,5% en conditions dénaturantes                     | I<br>I    |
| 15.2 Électrophorèse des protéines et coloration automatisées (Phastsystem <sup>TM</sup> )64 |           |
| 15.3 Détermination du point isoélectrique65   | en<br>fel |
| 16.0 Caractérisation biochimique65  |           |
| 16.1 Détermination de la température optimale65   |           |
| 16.2 Détermination du pH optimal  | 1         |
| 16.3 Cinetique enzymatique  | Ê.        |
| 16.4 Zymogramme   |           |
| 10.5 From a hydrolyse a ongosaccharides par la p-xylosidase                                 |           |
| RÉSULTATS   |           |
| 1.0 Amplification élective <i>in vitro</i> du gène <i>bxlA</i> 70                           |           |

| v<br>2.0 Reconstruction du gène <i>bxlA</i> dans les vecteurs M13mp18 et M13mp1973  |
|---|
| 3.0 Sous-clonage de bxlA  |
| 4.0 Production de l'enzyme  |
| 5.0 Isolement de l'enzyme       84         5.1 Récupération du mycélium       84         5.2 Extraction de la protéine BxIA intracellulaire       87  |
| <ul> <li>6.0 Mise au point des méthodes de purification</li></ul>   |
| 7.0 Purification de l'enzyme produite à grande échelle  |
| 8.0 Caracterisation de la proteine BxIA       100         8.1 Température optimale de la protéine BxIA       100         8.2 pH optimal de la protéine BxIA       100         8.3 Détermination du K <sub>m</sub> et du V <sub>max</sub> 100         8.4 Zymogramme       104         8.5 Profils d'hydrolyse       104 |
| DISCUSSION  |
| CONCLUSION124   |
| BIBLIOGRAPHIE   |

# Liste des tableaux

| Tableau 1. | Microorganismes bactériens producteurs de β-xylosidases16  |
|------------|--|
| Tableau 2. | Champignons et moisissures producteurs de β-xylosidases17  |
| Tableau 3. | Plante et levure productrices de β-xylosidases17   |
| Tableau 4. | Propriétés physico-chimiques des β-xylosidases provenant d'organismes<br>différents  |
| Tableau 5. | Séquences des amorces nucléotidiques42   |
| Tableau 6. | Programme d'élution sur la colonne phényl sépharose High Performance61   |
| Tableau 7. | Données représentant l'activité enzymatique et l'activité spécifique de la protéine BxIA ainsi que la quantité de protéines totales. Ces données sont exprimées en UI, en UI/mg et en mg respectivement après 24, 48 et 72 heures de culture |
| Tableau 8. | Comparaison de l'activité enzymatique (UI) obtenue après désintégration du mycélium par la technique de sonication (pendant 5 minutes) et la presse de French (après 3 <sup>ième</sup> passage)  |
| Tableau 9. | Résumé des différentes étapes de purification de la protéine BxlA94  |

# Liste des figures

| Figure 1.  | Représentation du complexe xylanolytique1  | 2 |
|------------|--|---|
| Figure 2.  | Opéron bxl de Streptomyces lividans1   | 5 |
| Figure 3.  | Plasmide pIAF22  | 4 |
| Figure 4   | Alignement des séquences en acides aminés des trois régions du site<br>catalytique de BxIA, des β-xylosidases et des β-glucosidases de la famille 3<br>des glycosyl hydrolases | 7 |
| Figure 5.  | Activité de la $\beta$ -xylosidase sur le substrat MUX et le substrat <i>p</i> NPX3  | 0 |
| Figure 6.  | Schématisation des différents groupements fonctionnels couplés au support matriciel des colonnes à interactions hydrophobiques   | 5 |
| Figure 7.  | Photo d'un gel d'agarose 0,7% du fragment amplifié de 1,1 kpb7   | 1 |
| Figure 8.  | Photo d'un gel d'agarose 0,7% du fragment amplifié de 1,5 kpb7   | 2 |
| Figure 9.  | Reconstruction du gène <i>bxlA</i> 7   | 4 |
| Figure 10. | Construction du plasmide pIAF137   | 7 |
| Figure 11. | Vaporisation au MUX pour tester l'activité β-xylosidasique7  | 8 |
| Figure 12. | Photo d'un gel d'agarose 0,7% du plasmide pIAF137  | 9 |
| Figure 13. | Construction du plasmide pIAF58  | 0 |
| Figure 14. | Vaporisation au MUX pour tester l'activité β-xylosidasique8  | 1 |
| Figure 15. | Photo d'un gel d'agarose 0,7% du plasmide pIAF58   | 2 |
| Figure 16. | Comparaison des échantillons de protéines intracellulaires sur gel de SDS-<br>PAGE 12,5% de 48 heures versus 72 heures de culture  | 5 |
| Figure 17. | Analyse des échantillons de protéines intracellulaires sur gel de SDS-PAGE 12,5% en présence de glucose versus xylose  | 6 |
| Figure 18. | Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la purification de la protéine BxIA sur la membrane anionique, Q15   | 9 |

|            | viii   |
|------------|--|
| Figure 19. | Détermination du point isoélectrique de l'extrait brut par focalisation<br>isoélectrique (IEF) sur gel de polyacrylamide   |
| Figure 20. | Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la<br>purification de la protéine BxIA sur la colonne phényl sépharose HP de la<br>trousse « Hi-Trap HIC                           |
| Figure 21. | Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la purification par FPLC de la protéine BxIA sur la colonne phényl sépharose HP  |
| Figure 22. | Analyse sur gel SDS-PAGE 12,5% des fractions purifiées sur tamis<br>moléculaire  |
| Figure 23. | Détermination du point isoélectrique par focalisation isoélectrique (IEF) des<br>échantillons de protéines intracellulaires obtenus à différents stades de<br>purification sur gel de polyacrylamide |
| Figure 24. | Représentation de l'activité enzymatique de BxlA (%) en fonction de la température (°C)101   |
| Figure 25. | Représentation de l'activité enzymatique (%) de BxIA en fonction du pH 102   |
| Figure 26. | Courbe de Michaelis-Menten représentant les vitesses initiales (V <sub>o</sub> ) en fonction de la concentration du substrat <i>p</i> NPX (mM)103  |
| Figure 27. | Zymogramme sur un gel de polyacrylamide pour détecter les bandes ayant<br>une activité β-xylosidasique (bandes fluorescentes)106   |
| Figure 28. | Profil d'hydrolyse de X2 par la protéine BxlA107   |
| Figure 29. | Profil d'hydrolyse de X3 par la protéine BxlA108   |
| Figure 30. | Profil d'hydrolyse de X4 par la protéine BxIA109   |
| Figure 31. | Profil d'hydrolyse de X5 par la protéine BxIA110   |
| Figure 32. | Profil d'hydrolyse de G2 par la protéine BxlA111   |
| Figure 33. | Profil d'hydrolyse de G4 et de G5 par la protéine BxIA112  |

## Liste des abréviations

| ADN acide désoxyribonucléique<br>A alanine<br>ARNm acide ribonucléique messager<br>ATP adénosine triphosphate<br>BSA albumine de sérum bovin<br>C cystéine<br>°C degré Celsius<br>CAPS acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique<br>cel <sup>-</sup> n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl | aa             | acide(s) aminé(s)                              |
|---|----------------|--|
| A alanine<br>ARNm acide ribonucléique messagen<br>adénosine triphosphate<br>BSA albumine de sérum bovin<br>C cystéine<br>°C degré Celsius<br>CAPS acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique<br>cel' n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl   | ADN            | acide désoxyribonucléique                      |
| ARNmacide ribonucléique messagerATPadénosine triphosphateBSAalbumine de sérum bovinCcystéine°Cdegré CelsiusCAPSacide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfoniquecel <sup>-</sup> n'exprimant pas l'activité cellulasiquedATP2'-désoxyadénosine 5'-triphosphatedCTP2'-désoxycytidine 5'-triphosphatedGTP2'-désoxyguanosine 5'-triphosphateDacide aspartiqueDEAEdiéthylaminoéthylDMSOdim éthylaminoéthyl   | А              | alanine  |
| ATPadénosine triphosphateBSAalbumine de sérum bovinCcystéine°Cdegré CelsiusCAPSacide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfoniquecel'n'exprimant pas l'activité cellulasiquedATP2'-désoxyadénosine 5'-triphosphatedCTP2'-désoxycytidine 5'-triphosphatedGTP2'-désoxyguanosine 5'-triphosphateDacide aspartiqueDEAEdiéthylaminoéthylDMSOdim éthylaminoéthyl  | ARNm           | acide ribonucléique messager                   |
| BSAalbumine de sérum bovin<br>cystéineCcystéine°Cdegré Celsius<br>acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique<br>n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATPdATP2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>DdGTP2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>acide aspartique<br>désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>acide aspartiqueDEAEdiéthylaminoéthyl<br>dim éthylawlfoyida                             | ATP            | adénosine triphosphate                         |
| C cystéine<br>°C degré Celsius<br>CAPS acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique<br>cel <sup>-</sup> n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>D 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl  | BSA            | albumine de sérum bovin                        |
| °Cdegré CelsiusCAPSacide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfoniquecel <sup>-</sup> n'exprimant pas l'activité cellulasiquedATP2'-désoxyadénosine 5'-triphosphatedCTP2'-désoxycytidine 5'-triphosphatedGTP2'-désoxyguanosine 5'-triphosphateDacide aspartiqueDEAEdiéthylaminoéthylDMSOdim éthylaylfoyida  | С              | cystéine                                       |
| CAPS acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique<br>cel <sup>-</sup> n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl   | °C             | degré Celsius                                  |
| cel' n'exprimant pas l'activité cellulasique<br>dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl  | CAPS           | acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonique |
| dATP 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate<br>dCTP 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate<br>dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl  | cel            | n'exprimant pas l'activité cellulasique        |
| dCTP2'-désoxycytidine 5'-triphosphatedGTP2'-désoxyguanosine 5'-triphosphateDacide aspartiqueDEAEdiéthylaminoéthylDMSOdim éthylaulfoyida   | dATP           | 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate             |
| dGTP 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate<br>D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl   | dCTP           | 2'-désoxycytidine 5'-triphosphate              |
| D acide aspartique<br>DEAE diéthylaminoéthyl<br>DMSO diméthylaylfoyida  | dGTP           | 2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate             |
| DEAE diéthylaminoéthyl  | D              | acide aspartique                               |
| DMCO diméthyloulfoyida  | DEAE           | diéthylaminoéthyl                              |
| DIMSO dimensional   | DMSO           | diméthylsulfoxide                              |
| D.O. densité optique  | D.O.           | densité optique                                |
| dTTP 2'-désoxythymidine 5'-triphosphate   | dTTP           | 2'-désoxythymidine 5'-triphosphate             |
| DTT dithiothréitol  | DTT            | dithiothréitol                                 |
| E acide glutamique  | E              | acide glutamique                               |
| EDTA éthylènediaminetétraacétate  | EDTA           | éthylènediaminetétraacétate                    |
| F phénylalanine   | F              | phénylalanine                                  |
| FPLC chromatographie liquide rapide des protéines   | FPLC           | chromatographie liquide rapide des protéines   |
| G glycine   | G              | glycine  |
| G2 cellobiose   | G2             | cellobiose                                     |
| G4 cellotétraose  | G4             | cellotétraose                                  |
| G5 cellopentaose  | G5             | cellopentaose                                  |
| H   | Н              | histidine                                      |
| HPLC chromatographie liquide à haute performance  | HPLC           | chromatographie liquide à haute performance    |
| I isoleucine  | I              | isoleucine                                     |
| IEF focalisation isoélectrique  | IEF            | focalisation isoélectrique                     |
| IPTG isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside  | IPTG           | isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside            |
| kpb kilopaire(s) de base(s)   | kpb            | kilopaire(s) de base(s)                        |
| kDa kilodalton(s)   | kDa            | kilodalton(s)                                  |
| K <sub>m</sub> constante de Michaelis-Menten  | K <sub>m</sub> | constante de Michaelis-Menten                  |
| K lysine  | K              | lysine   |
| M méthionine  | М              | méthionine                                     |
| M molaire   | М              | molaire  |
| mL millilitre(s)  | mL             | millilitre(s)                                  |
| mM millimolaire(s)  | mΜ             | millimolaire(s)                                |
| mg milligramme(s)   | mg             | milligramme(s)                                 |

|                       | х  |
|-----------------------|--|
| MsiK <sup>-</sup>     | n'exprimant pas le phénotype MsiK                          |
| ЦQ                    | microgramme(s)   |
| μL                    | microlitre(s)  |
| umole                 | micromole(s)   |
| MOPS                  | acide sulfonique morpholinopropane                         |
| MUG                   | 4-méthyl-umbelliféryl-B-D-glucopyranoside                  |
| MUX                   | 4-méthyl-umbelliféryl-β-D-xylopyranoside                   |
| Ν                     | asparagine   |
| nC                    | nanoCoulomb(s)   |
| nm                    | nanomètre(s)   |
| nt                    | nucléotide(s)  |
| NTG                   | N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine                       |
| Р                     | polyéthylénimine   |
| Р                     | proline  |
| pmol                  | picomole(s)  |
| pb                    | paires de base   |
| PCR                   | amplification élective in vitro                            |
| PEG                   | polyéthylène glycol  |
| pI                    | point isoélectrique  |
| PMSF                  | phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride                            |
| pNPG                  | <i>p</i> -nitrophényl-β-D-glucopyranoside                  |
| pNPX                  | $p$ -nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside                |
| p/v                   | poids/volume   |
| PVDF                  | polyvinylidène difluoride                                  |
| Q                     | amine quaternaire  |
| Q                     | glutamine  |
| R                     | arginine   |
| rpm                   | révolutions par minute                                     |
| S                     | sérine   |
| SDS                   | dodécyl sulfate de sodium                                  |
| SDS-PAGE              | électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS |
| T                     | thréonine  |
| TBE                   | tampon Tris-borate EDTA                                    |
| TE                    | tampon Tris-EDTA   |
| TEMED                 | N,N,N',N'-tétraméthyléthylénediamine                       |
| TES<br>Tria           | acide N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonique  |
|                       | tris(hydroxymethyl) aminomethane                           |
| 150                   | bouillon tryptone de soya (Tryptic Soy Broth)              |
|                       | unite internationale                                       |
| V                     | ultraviolet  |
| ۷<br>+Ta <sup>*</sup> | valine   |
| LISE<br>VL            | resistance a la thiostreptone                              |
|                       | volt heure   |
| V max                 | vitesse maximale de réaction                               |
| V/V                   | volume/volume  |

|       | xi   |
|-------|--|
| W     | tryptophane                                      |
| xln   | n'exprimant pas d'activité xylanasique           |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranoside |
| X2    | xylobiose  |
| X3    | xylotriose                                       |
| X4    | xylotétraose                                     |
| X5    | xylopentaose                                     |
| Y     | tyrosine   |

#### SOMMAIRE

Les streptomycètes sont des microorganismes retrouvés dans la nature et sont capables de dégrader la biomasse végétale afin d'en tirer leur source de carbone. Une des enzymes importantes pour la dégradation du xylane est la  $\beta$ -xylosidase. En effet, cette enzyme catalyse la dernière réaction de l'hydrolyse des xylo-oligosaccharides en xylose. Pronovost (1991) avait isolé le gène *bxlA* codant pour une  $\beta$ -xylosidase à partir du plasmide pIAF2. Par la suite, d'autres études ont été entreprises sur ce plasmide mais les résultats n'étaient pas reproductibles quant à l'activité de la  $\beta$ -xylosidase. Ceci était probablement dû à l'absence d'un promoteur naturel de streptomycètes en amont du gène *bxlA*. Larocque (1997) avait réalisé l'analyse génétique du plasmide et avait séquencé le gène *bxlA*. Il avait ensuite effectué un alignement de séquences en acides aminés de la protéine BxIA. Celle-ci appartient à la famille 3 des glycosyl hydrolases et montre de l'homologie avec des  $\beta$ -xylosidases et des  $\beta$ -glucosidases retrouvées chez d'autres microorganismes. Afin de déterminer si le gène *bxlA* codait pour une  $\beta$ -xylosidase, une  $\beta$ -glucosidase ou pour une enzyme ayant les deux activités, il a fallu la purifier. Par conséquent, le but du projet était d'obtenir la protéine BxIA pure afin de la caractériser.

Plusieurs tentatives pour amplifier le gène *bxlA* de 2,6 kpb ont échoué. Par contre, il a été possible d'amplifier deux fragments du gène *bxlA* correspondant aux régions aminée et carboxylique de la protéine BxlA. Le gène a été ensuite reconstruit et cloné de façon homologue dans le vecteur d'expression à copie multiple, pIJ702 afin de le surexprimer pour faciliter la purification de la protéine. Des techniques de chromatographie par FPLC et par filtration moléculaire ont permis d'obtenir une enzyme à un degré de pureté satisfaisant malgré son instabilité. Des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes ont été utilisés pour visualiser les échantillons de l'enzyme pure et ces derniers ont révélé une protéine de 90 kDa. Ces résultats confirment la masse moléculaire prédite par la séquence nucléotidique de BxlA. L'enzyme a été d'abord caractérisée au niveau de son pH et de sa température optimale. Ensuite, l'affinité de

xiii

BxlA pour différents substrats tels que le *para*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside (*p*PNX) et le *para*-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) ainsi que pour les oligosaccharides dont le xylobiose (X2), le xylotriose (X3), le xylotétraose (X4), le xylopentaose (X5), le cellobiose (G2), le cellotriose (G3), le cellotétraose (G4) et le cellopentaose (G5) a été analysée. Des essais enzymatiques effectués avec le *p*NPX et le *p*NPG ont démontré que BxlA ne comportait qu'une activité  $\beta$ -xylosidasique. De plus, les expériences effectuées sur les substrats naturels sont en accord avec les résultats obtenus avec le *p*NPX et le *p*NPG : l'enzyme n'hydrolyse que les X2, X3, X4 et X5. Toutefois, BxIA agit plus efficacement sur les polysaccharides à faible degré de polymérisation tels que le X2 et le X3.

# Introduction

Streptomyces lividans est classé dans la famille des Streptomycetaceae sous l'ordre des Actinomycetales (Williams et al., 1989). Ces microorganismes synthétisent divers antibiotiques et de multiples enzymes hydrolytiques. Ces dernières sont essentielles pour une dégradation complète de la biomasse lignocellulosique et ont fait l'objet de plusieurs études. En effet, les recherches entreprises par le groupe de recherche en biotechnologie des streptomycètes à l'Institut Armand-Frappier ont permis de mieux connaître les cellulases et les xylanases surtout au niveau de leur régulation, de leur sécrétion et de leur structure. D'abord, trois gènes de xylanases (xlnA, xlnB et xlnC) ont été identifiés, clonés et séquencés. Par la suite, les xylanases A, B et C ont été purifiées et caractérisées (Mondou et al., 1986; Morosoli et al., 1986; Kluepfel et al., 1990; Shareck et al., 1991; Kluepfel et al., 1992). Deux cellulases (CelA et CelB) ont été aussi clonées et purifiées (Shareck et al., 1987; Théberge et al., 1992; Wittmann et al., 1994). Une β-mannanase (Arcand et al., 1993) et deux arabinofuranosidases ont été également identifiées puis caractérisées (Manin et al., 1994; Vincent et al., 1997). En 1990, Mihoc et Kluepfel ont purifié et caractérisé une ß-glucosidase issue d'une souche de S. lividans 66. Dernièrement, Larocque (1997) a rapporté une nouvelle séguence de 8616 pb contenant six gènes organisés en opéron. Ces six gènes étaient respectivement bxlA codant pour une  $\beta$ -xylosidase, *bxlG*, *bxlF*, *bxlE* codant pour un complexe de perméases, *bxlR* et *bxlS* codant probablement pour des protéines de régulation.

La  $\beta$ -xylosidase est une enzyme importante impliquée dans le processus de dégradation complète du xylane. En effet, cette enzyme catalyse la dernière étape de l'hydrolyse des xylo-oligosaccharides en simples molécules de xylose. Pronovost (1991) s'était servi d'une banque génomique de *S. lividans* 1326 préparée par Mondou *et al.* (1986) pour cribler des gènes codant pour la  $\beta$ -glucosidase et la  $\beta$ -xylosidase. Cette dernière était codée par une insertion d'ADN chromosomique de 3,1 kpb dans le plasmide pIAF2 d'une longueur de 8,8 kpb. Pronovost avait démontré que le gène de structure de la  $\beta$ -xylosidase était situé sur une région de 1,7 kpb. Il a également réussi à comparer l'activité spécifique du clone IAF2 avec celle de la souche sauvage 1326 et celle de la

souche mutante 10-164. Le clone IAF2 avait une activité spécifique de dix fois supérieure à celle de la souche 1326 et de 100 fois supérieure à celle de la souche 10-164.

D'après l'homologie des séquences en acides aminés, BxlA ferait partie de la famille 3 des glycosyl hydrolases et aurait autant d'homologie avec les  $\beta$ -glucosidases qu'avec les  $\beta$ -xylosidases. Le présent travail consistait donc à cloner le gène *bxlA* dans un vecteur à copie multiple, à exprimer la protéine dans une souche de streptomycètes et à la purifier. Par la suite, la protéine BxlA a été caractérisée afin de déterminer son activité spécifique envers différents substrats tels que les X2, X3, X4, X5, G2, G3, G4 et G5.

Revue de littérature

....

#### 1.0 Les streptomycètes

#### 1.1 Propriétés générales des streptomycètes

Les streptomycètes sont des bactéries Gram positif classées dans l'ordre des Actinomycetales. Ces bactéries aérobies sont de forme filamenteuse et se retrouvent principalement dans le sol. La plupart des espèces de streptomycètes sont considérées comme des microorganismes chimioorganotrophes qui sont capables d'effectuer leur biosynthèse à partir de substrats organiques complexes (Gusek et Kinsella, 1992). Ils sécrètent une panoplie d'enzymes hydrolytiques qui sont impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique composée essentiellement de cellulose et des hémicelluloses. Les streptomycètes sont reconnus comme étant des microorganismes non pathogènes pour l'homme et donc ne présentent aucun danger pour la manipulation au laboratoire. Ils possèdent aussi un cycle de vie complexe qui les distingue des autres microorganismes et qui se résume en trois phases. D'abord, un système d'embranchement d'hyphes non cloisonnés se développe à partir d'une simple spore pour former le mycélium végétatif. Par la suite, ce complexe de mycélium végétatif donne lieu à un mycélium aérien qui se fractionne pour produire des spores. Ces dernières restent dans un état de latence jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables pour la germination et pour que le cycle de vie puisse se répéter (Leblond et al., 1993; Gusek et Kinsella, 1992).

#### 1.2 Génome des streptomycètes

Les streptomycètes possèdent un génome riche en guanine et en cytosine (70-75 %). Cette caractéristique leur permet de résister à l'effet mutagène des rayons UV qui peuvent causer la formation des dimères de thymine (T) (Hopwood, 1989). Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont été entreprises pour établir des cartes physique et génétique complètes des chromosomes de *Streptomyces lividans* et de *Streptomyces coelicolor*, un parent proche de *S. lividans*. Aujourd'hui, les cartes physique et génétique complètes de *S. coelicolor* sont en voie d'être établie. Le génome de celui-ci a été le plus étudié et il est considéré comme étant le génome représentatif des streptomycètes (Redenbach et al., 1996).

#### 1.3 Importance au niveau industriel

Les études réalisées sur les streptomycètes se sont intensifiées considérablement durant ces dernières années. Ces bactéries sécrètent en abondance des métabolites secondaires tels que des antibiotiques. Jusqu'à aujourd'hui, près de 6000 antibiotiques d'origine microbienne ont été caractérisés et 60% d'entre eux proviennent principalement de différentes espèces de streptomycètes. Plusieurs de ces antibiotiques sont utilisés au niveau médical : le chloramphénicol (*Streptomyces venezuelae*) nécessaire dans le traitement contre la fièvre typhoïde ou la mitomycine C (*S. caespitosus*) impliquée dans les traitements de chimiothérapie. On utilise aussi ces métabolites secondaires dans la synthèse d'arômes, de pigments et d'herbicides (Leblond *et al.*, 1993, Gusek et Kinsella, 1992).

lignocellulosique constituée principalement de cellulose, La matière d'hémicelluloses et de lignine, est dégradée par des enzymes lignocellulolytiques. Parmi ces enzymes, ce sont les cellulases et les xylanases qui prédominent. Elles sont responsables de la dégradation primaire de la matière lignocellulosique et leur potentiel industriel est très élevé. Par exemple, un mélange constitué de cellulase, de xylanase et de pectinase a été utilisé dans le processus de clarification des jus de fruits (Biely, 1985; Hang et Woodams, 1997). D'autre part, un mélange de cellulase et de xylanase a été employé pour prédigérer de la moulée afin de faciliter sa digestion par les animaux d'élevage (Seale, 1987). Les cellulases ont été aussi impliquées dans la transformation des déchets agricoles en produits chimiques tels que l'éthanol (Lynd et al., 1991). De plus, depuis ces dernières années, elles ont été énormément utilisées dans le processus d'assouplissement des fibres de coton et de denim. Par ailleurs, plus récemment, les xylanases ont acquis de l'importance au niveau de l'industrie du bioblanchiement des pâtes à papier, qui utilise présentement des techniques chimiques responsables de graves problèmes de pollution

(Paice *et al.*, 1988; Flandroy, 1991). Ainsi, l'introduction d'enzymes hydrolytiques dans les procédés de bioblanchiement pourrait contribuer enfin à enrayer ces problèmes (Buchert *et al.*, 1994).

Dans le but de trouver d'autres applications industrielles et afin de contribuer à l'expansion du marché biotechnologique, le groupe de recherche en biotechnologie des streptomycètes à l'Institut Armand-Frappier travaille actuellement à l'amélioration de la compréhension des systèmes cellulolytique et xylanolytique. Plus spécifiquement, il tente surtout d'élaborer des souches de *S. lividans* modifiées génétiquement pour surproduire les enzymes d'intérêt des complexes cellulolytique et xylanolytique. Les objectifs visés par le groupe respectent les exigences des industries qui favorisent l'utilisation unique des enzymes sécrétées à partir de microorganismes modifiés génétiquement afin d'augmenter la productivité.

#### 1.4 Streptomyces lividans

Streptomyces lividans est une bactérie qui se retrouve principalement au niveau du sol et est capable de sécréter des hémicellulases à potentiel industriel. Cependant, il n'est pas le seul microorganisme à produire ces enzymes hydrolytiques. Il existe de nombreux microorganismes d'origine bactérienne et fongique aptes également à synthétiser des hémicellulases, et qui ont été rapportés dans la littérature. On retrouve entre autres, des bactéries tel que *Bacillus polymyxa* (Sanz-Aparicio *et al.*, 1998) ou des champignons tel que *Trichoderma reesei* (Herrmann *et al.*, 1997). Par contre, l'avantage de *S. lividans*, comparativement à d'autres microorganismes, est dû au fait que les techniques de fermentation sont déjà au point. De plus, *S. lividans* est reconnu comme étant un bon hôte pour le clonage d'ADN car il reconnaît un grand nombre de promoteurs hétérologues et ne sécrète qu'une faible quantité de protéases (Gusek et Kinsella, 1992).

#### 1.5 Streptomyces lividans 10-164

La souche de S. lividans 10-164 a été obtenue par l'équipe de recherche en biotechnologie des streptomycètes à l'Institut Armand-Frappier. Streptomyces lividans 10-164 est un mutant pléiotropique obtenu par mutagenèse au NTG (N-méthyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine). Cette souche ne sécrète pas ou peu d'enzymes hémicellulolytiques (Mondou et al., 1986) et sa grande stabilité en fait un bon outil de travail. De plus, grâce à ses phénotypes cellulase et xylanase négatifs, la détection de transformants hyper producteurs est plus facile à visualiser. Cependant, ce n'est qu'en 1995 que la souche a été caractérisée par Hurtubise et al.. Les résultats ont montré que cette souche comportait une mutation au niveau du gène codant pour la protéine MsiK (voir section 3.1.3). Celle-ci lie l'ATP et énergise le transport des sucres à l'intérieur de la cellule. La mutation a donc pour effet d'empêcher le transport du X2 et X3 mais également celui du xylose. Le transport des sucres est ainsi dix fois moins efficace chez la souche mutante que chez la souche sauvage de S. lividans 1326. En revanche, le transport du glucose n'est pas affecté. Les auteurs ont aussi remarqué qu'il y avait une accumulation de xylose et de glucose dans le milieu de culture de la souche mutante 10-164 quand la source de carbone était du X2 ou du G2. Cette accumulation serait due à la présence de β-xylosidase et de β-glucosidase extracellulaires qui hydrolysent respectivement le X2 ou le G2 en deux molécules de xylose ou de glucose.

#### 2.0 La cellulose

La cellulose est un polymère constitué de chaînes linéaires de 100 à 10000 unités de D-glucose reliées entre elles par des liens  $\beta$ -1,4. Les unités de cellulose s'unissent pour composer des fibrilles comportant des régions compactes et des régions amorphes. Les régions compactes, appelées cristallines, sont difficilement hydrolysées par la cellulase. C'est donc principalement au niveau des régions amorphes qu'il y a possibilité d'hydrolyse des liens  $\beta$ -1,4 de la cellulose (Bisaria et Ghose, 1981).

#### 2.1 Les cellulases

Le système de biodégradation de la cellulose est assez complexe. Trois types d'enzymes sont impliqués dans le mécanisme d'hydrolyse complète de la cellulose en monomères de glucose. Principalement, on retrouve les endoglucanases telles que les cellulases A et B produites par *S. lividans* qui coupent au niveau des régions amorphes pour libérer des petites molécules (Théberge *et al.*, 1992; Wittmann *et al.*, 1994). Ces mêmes petites molécules sont dégradées à leur tour par les exoglucanases en G3 ou en G2. Ces molécules sont ensuite transportées à l'intérieur de la bactérie par un système de perméases pour être dégradées en glucose par une  $\beta$ -glucosidase (Gong et Tsao, 1979; Coughlan, 1985; Jiresova *et al.*, 1987; Godden *et al.*, 1989).

#### 2.2 La β-glucosidase

Chez *S. lividans*, la  $\beta$ -glucosidase est une enzyme essentielle à la dégradation complète de la cellulose dans le système cellulolytique. Elle catalyse l'hydrolyse du G2 et de certains cello-oligosaccharides en molécules de glucose. Cette enzyme fait l'objet de nombreuses études et il y a plusieurs raisons qui pourraient justifier l'intérêt de ces études. Tout abord, les  $\beta$ -glucosidases intracellulaires se retrouvent souvent en faibles quantités dans des préparations cellulasiques. De plus, la plupart d'entre elles sont sous le contrôle de la répression catabolique causée par le glucose. Les  $\beta$ -glucosidases intracellulaires sont reconnues aussi pour leur instabilité et par conséquent, les risques d'inactivation de l'enzyme pendant les réactions enzymatiques sont élevés (Perez-Pons *et al.*, 1994).

Plusieurs microorganismes producteurs de β-glucosidase sont cités dans la littérature. La majorité sont d'origine bactérienne : *Bacillus polymyxa* (Sanz-Aparicio *et al.*, 1998), *Bifidobacterium breve* (Nunoura *et al.*, 1996), *Bifidobacterium adolescentis* (Choi *et al.*, 1996), *Candida molischiana* (Janbon *et al.*, 1995a; Janbon *et al.*, 1995b),

Cellvibrio gilvus (Machida et al., 1998), Fusiobacterium mortiferum (Thompson et al., 1997), Humicola grisea (Ferreira Filho, 1996), Streptomyces sp. (Perez-Pons et al., 1995; Montero et al., 1998), Thermotoga neapolitana (Zverlov et al., 1997), Trichoderma longibrachiatum (Agarwal et Gupta, 1996). Il est aussi possible de retrouver des  $\beta$ -glucosidases chez les champignons et moisissures (Yan et Lin, 1997), chez certaines plantes (Minami et al., 1997) ou encore chez l'humain au niveau du foie (Matern et al., 1997). Chez la plupart des microorganismes, la  $\beta$ -glucosidase est localisée à l'intérieur de la cellule (Heupel et al., 1993; Perez-Pons et al., 1994; Perez-Pons et al., 1995; Bauer et al., 1996; Choi et al., 1996; Skory et al., 1996a; Raschid et Siddiqui, 1997). Néanmoins, il existe aussi des microorganismes producteurs de  $\beta$ -glucosidases extracellulaires (Skory et al., 1996b; Taj-Aldeen et Alkenany, 1996; Galas et Romanowska, 1997; Pitson et al., 1997).

#### 3.0 L'hémicellulose

Dans la matière végétale, la cellulose est toujours accompagnée de polymères d'hémicellulose et de polysaccharides. Parmi les hémicelluloses, on retrouve le mannane qui est composé de polymères de mannose reliés entre eux par des liens  $\beta$ -1,4 (Arcand *et al.*, 1993). On retrouve également le xylane qui est composé d'environ 200 unités de D-xylose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4, et de plusieurs substituts qui peuvent s'y rattacher. Parmi ceux-ci, on retrouve les L-arabinofuranoses, les groupements acétylés et les acides glucuroniques qui forment l'hétéroxylane.

# 3.1 Les enzymes hémicellulolytiques : la mannanase, les arabinofuranosidases, les acétylestérases et les $\alpha$ -glucuronidases

Les mannanases sont des hémicellulases qui dégradent spécifiquement le mannane en scindant les liens  $\beta$ -1,4 pour former des oligomannosides (Arcand *et al.*, 1993). Pour ce qui est de l'hydrolyse des résidus glucuroniques et acétylés, celle-ci est assurée par les  $\alpha$ - glucuronidases et les acétylestérases. Les L-arabinofuranoses, de leur côté, sont clivés par les arabinofuranosidases. Ces dernières hydrolysent les chaînes latérales comportant les résidus arabinoses en s'attaquant aux liens O-glycosyl à l'extrémité non réductrice des arabinoses. Chez *S. lividans*, deux types d'arabinofuranosidases ont été identifiés. Le premier est appelé arabinofuranosidase B et se retrouve à l'extérieur de la cellule. Le second, nommé arabinofuranosidase A. est localisé à l'intérieur de la cellule et joue un rôle important dans l'assimilation des arabinoses provenant des petits xylo-oligosaccharides. Ces derniers sont générés par les xylanases et dans certains cas, par la  $\beta$ -xylosidase (Manin *et al.*, 1994) (Figure 1).

#### 3.2 Les xylanases A, B et C

Trois xylanases ont été identifiées, purifiées et caractérisées chez *S. lividans* 1326. Ces enzymes coopèrent ensemble pour transformer le xylane en xylose (Kluepfel *et al.*, 1990, 1991, 1992). Premièrement, le xylane est scindé aux liens  $\beta$ -1,4 par les xylanases B et C pour former des molécules de différentes longueurs. Celles-ci sont ensuite dégradées par la xylanase A en X3 et X2. Puis, ceux-ci sont transportés à l'intérieur de la cellule par un système de perméases qui nécessite de l'énergie. Lorsqu'ils sont à l'intérieur de la cellule par le X3 et le X2 sont hydrolysés par la  $\beta$ -xylosidase en molécules de xylose lesquelles peuvent servir de source de carbone pour la bactérie (Biely, 1985) (Figure 1). Figure 1. Représentation du complexe xylanolytique. Les gènes codant pour les xylanase A, B et C sont respectivement représentés par *xlnA*, *xlnB* et *xlnC*. Les enzymes arabinofuranosidase B et acétylestérase A hydrolysant les groupements glucuroniques et acétylés sont codées respectivement par les gènes *abfB* et *axeA*. Le complexe de perméases est composé de trois protéines dont la protéine BxlG codée par le gène *bxlG*, la protéine BxlF codée par le gène *bxlF* et la protéine BxlE codée par le gène *bxlE*. Le gène codant pour une  $\beta$ -xylosidase est représenté par *bxlA* tandis que celui de la protéine MsiK par *msiK*. Finalement, les deux protéines de régulation BxlS et BxlR sont codées par les gènes *bxlS* et *bxlR*. Les flèches ci-dessous représentent les sites d'hydrolyse d'une endo-1,4  $\beta$ -xylanase, d'une arabinofuranosidase B, d'une  $\alpha$ -glucuronidase et d'une acétylestérase A.

- Site d'hydrolyse d'une endo-1,4 β-xylanase
- Site d'hydrolyse d'une arabinofuranosidase B
- $\rightarrow$  Site d'hydrolyse d'une  $\alpha$ -glucuronidase
- → Site d'hydrolyse d'une acétylestérase A



#### 3.3 La protéine MsiK

Récemment, la protéine MsiK a été purifiée et caractérisée par Penzès (1995). Cette protéine a un poids moléculaire de 40 kDa et appartient à la famille des transporteurs ABC («ATP-binding cassette»). Au cours de son étude, Penzès a travaillé avec la protéine MsiK codée par le gène *msiK* de la souche 10-164. Le séquençage du gène *msiK* a révélé la présence d'une mutation d'un acide aspartique en résidu asparagine. Cette mutation empêcherait l'hydrolyse de l'ATP, ce qui expliquerait pourquoi le système de transport actif du G2 et X2 n'est pas fonctionnel chez la souche 10-164. Ainsi, la protéine MsiK serait responsable de la liaison et de l'hydrolyse d'ATP. Elle fournirait l'énergie nécessaire au complexe de perméases pour transporter les sucres à l'intérieur de la cellule.

#### 3.4 L'opéron bxl

À partir du génome de *S. lividans*, le locus *bxl* d'une longueur de 8616 pb a été sous-cloné et séquencé (Larocque, 1997). Pour identifier la séquence complète de ce locus, des clonages par amplification élective *in vitro* (PCR) ont été effectués et ont permis le séquençage des gènes *bxlA*, *bxlG*, *bxlF*, *bxlE*, *bxlR* et *bxlS*. Les résultats obtenus ont démontré que le locus *bxl* est organisé en opéron. D'une part, le gène *bxlA* code pour une  $\beta$ -xylosidase de 861 acides aminés et de masse moléculaire théorique de 90 kDa. D'autre part, l'analyse de séquences codant pour les gènes *bxlG* et *bxlF* a révélé une forte homologie avec les perméases des sucres de la sous-famille MalF et MalG. Pour ce qui est du gène *bxlE*, celui-ci codait pour une lipoprotéine membranaire possédant un domaine de fixation aux sucres. Larocque a également identifié la présence d'une séquence palindromique en amont du gène *bxlE*. Finalement, les gènes *bxlR* et *bxlS* ont été séquencés, ce qui a permis de montrer qu'ils sont transcrits dans une direction inverse à celle du gène *bxlE* (Figure 2).



Figure 2. Opéron bxl de Streptomyces lividans

#### 4.0 La β-xylosidase

#### 4.1 Généralités

La  $\beta$ -xylosidase est une enzyme intracellulaire jouant un rôle primordial dans la dernière étape de la dégradation du xylane en résidus de xylose. En effet, au moment où le X3 et le X2 sont transportés à l'intérieur de la cellule par le système de perméases, les molécules sont hydrolysées en xylose par la  $\beta$ -xylosidase (Utt *et al.*, 1991; Ghosh et Nanda, 1993). Dans la littérature, les  $\beta$ -xylosidases sont, en majorité, des enzymes intracellulaires. Néanmoins, il arrive parfois que certaines  $\beta$ -xylosidases soient sécrétées à l'extérieur de la cellule (Hébraud et Fèvre, 1990; Nanmori *et al.*, 1990).

## 4.2 Organismes producteurs de β-xylosidases

Les  $\beta$ -xylosidases ont été étudiées chez plusieurs microorganismes. Des  $\beta$ -xylosidases provenant entre autres de bactéries (Tableau 1), de champignons et de moisissures (Tableau 2) ainsi que de plantes et de levures (Tableau 3) ont été purifiées et caractérisées.

| Microorganismes                       | Références                  |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Bacillus pumilus                      | La Grange et al., 1997      |
|                                       | Xu et al., 1991             |
| Bacillus stearothermophilus           | Nanmori et al., 1990        |
| Caldocellum saccharolyticum           | Hudson et al., 1991         |
| Clostridium acetobutylicum            | Lee et Forsberg, 1987       |
| Clostridium cellulolyticum            | Saxena et al., 1995         |
| Prevotella ruminicola                 | Gasparic et al., 1995       |
| Streptomyces halstedii                | Ruiz-Arribas et al., 1995   |
| Streptomyces sp. CH-M 1035            | Flores et al., 1996         |
| Thermoanaerobacter ethanolicus        | Shao et Wiegel, 1992        |
| Thermoanaerobacterium sp.             | Lorenz et Wiegel, 1997      |
| Thermoanaerobacterium saccharolyticum | Armand et al., 1996         |
| Thermotoga thermarum                  | Sunna et Antranikian, 1996  |
| Thermotoga sp.                        | Ruttersmith et Daniel, 1993 |

Tableau 1. Microorganismes bactériens producteurs de  $\beta$ -xylosidases

.

| Microorganismes            | Références  |
|----------------------------|---|
| Aspergillus nidulans       | Perez-Gonzalez et al., 1998                           |
| Aspergillus niger          | Van-Peij et al., 1997<br>Kang et al., 1995            |
| Aspergillus sydowii        | Ghosh et Nanda, 1993                                  |
| Neocallimastix frontalis   | Hébraud et Fèvre, 1990                                |
| Penicillium wortmannii IFO | Matsuo et al., 1996                                   |
| Thermomonospora curvata    | Stutzenberger et Bodine, 1998                         |
| Thermomonospora fusca      | Bachmann et Mc Carthy, 1989                           |
| Trichoderma harzianum      | De A Ximenes et al., 1996                             |
| Trichoderma reesei         | Margolles-Clark et al., 1996<br>Tenkanen et al., 1996 |

Tableau 2. Champignons et moisissures producteurs de  $\beta$ -xylosidases

Tableau 3. Plante et levure productrices de  $\beta$ -xylosidases

| Microorganismes      | Références            |  |
|----------------------|-----------------------|--|
| Erwinia chrysanthemi | Vroemen et al., 1995  |  |
| Arxala adeninivorans | Buttner et Bode, 1992 |  |

#### 4.3 Propriétés physico-chimiques des β-xylosidases

Les caractéristiques des  $\beta$ -xylosidases varient selon leur origine. Le tableau 4 montre des propriétés physico-chimiques de plusieurs  $\beta$ -xylosidases provenant de différents microorganismes et dont la masse moléculaire varie entre 60 et 300 kDa et le pH optimal entre 4 et 7.

Dans la littérature, les  $\beta$ -xylosidases sont considérées comme des enzymes multimériques c'est-à-dire qu'elles peuvent être constituées de plusieurs sous-unités. Par exemple, Shao et Wiegel (1992) ont étudié la  $\beta$ -xylosidase de *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Le poids moléculaire de cette enzyme était estimé à 165 kDa sur un gel de polyacrylamide natif mais à 85 kDa sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suggérant ainsi la présence de deux sous-unités. La même observation a été faite chez la  $\beta$ -xylosidase de *Penicillium wortmannii*. En effet, l'enzyme avait un poids moléculaire de 290 kDa sur un gel de polyacrylamide natif. Par contre, sur un gel de polyacrylamide avec SDS, une seule bande de 73 kDa a été observée. Par conséquent, les auteurs ont conclu que la  $\beta$ -xylosidase de *Penicillium wortmannii* était composée de quatre sous-unités de 73 kDa (Matsuo *et al.*, 1987).

Panbangred *et al.* (1984) ont isolé à partir de *Bacillus pumilus*, deux  $\beta$ -xylosidases qui ne sont pas des multimères et qui sont très différentes l'une de l'autre. Bien qu'elles aient une masse moléculaire similaire, la  $\beta$ -xylosidase I (65 kDa) et la  $\beta$ -xylosidase II (70 kDa) sont distinctes au niveau de leur activité spécifique, de leur K<sub>m</sub> et de leurs caractéristiques physico-chimiques. En effet, il a été observé que la  $\beta$ -xylosidase I pouvait hydrolyser deux types de substrats : le *p*NPX et les X2, X3 et X4 contrairement à la  $\beta$ xylosidase II qui ne pouvait hydrolyser que le *p*NPX.

| Microorganismes                               | Mr<br>(kDa) | pl   | K <sub>m</sub><br>(mM) | Température<br>optimale<br>(°C) | pH<br>optimal | Localisation    |
|---|-------------|------|------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| Bacillus pumilus                              | 56          | N.D. | 3,9                    | 40                              | 7,0           | Intracellulaire |
| Thermoanaerobacter<br>ethanolicus             | 165         | 4,6  | 0,018                  | 93                              | 5             | Intracellulaire |
| Trichoderma<br>harzianum                      | 60          | N.D. | 0,0053                 | 70                              | 4-4,5         | Intracellulaire |
| Arxula<br>adeninivorans                       | 60          | N.D. | 0,23-<br>0,33          | 60                              | 5             | Intracellulaire |
| Caldocellum<br>saccharolyticum                | N.D.        | 4,3  | 10                     | 70                              | 5-7           | Intracellulaire |
| Neocallimastix<br>frontalis                   | 180         | 4,35 | 0,33                   | 65                              | 6,5           | Extracellulaire |
| Trichoderma reesei                            | 100         | 4,7  | 0,7                    | 60                              | 5,5           | Extracellulaire |
| Thermomonospora<br>curvata                    | 102         | 4,8  | 0,004-<br>0,006        | 60-68                           | 6-7           | Intracellulaire |
| <i>Penicillium<br/>wortmannii</i> IFO<br>7237 | 290         | 5    | 1,9                    | 45                              | 6,5           | Intracellulaire |

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques des β-xylosidases provenant d'organismes différents

N.D. : non déterminé

#### 4.4 Activité spécifique de la β-xylosidase

La spécificité de la  $\beta$ -xylosidase envers différents substrats a été largement étudiée. Van Peij *et al.* (1997) et Shao et Weigel (1992) ont décrit une  $\beta$ -xylosidase qui possédait une activité positive envers les substrats *pNPX*, *pNPG* (*p*-nitrophényl- $\beta$ -Dglucopyranoside) et *pNPA* (*p*-nitrophényl- $\beta$ -D-arabinopyranoside). Il existe aussi des  $\beta$ xylosidases qui ont une activité  $\beta$ -xylosidasique et  $\beta$ -glucosidasique (Uzii *et al.*, 1985; Yasui et Matsuo, 1988; Ruttersmith et Daniel, 1993; Vroemen *et al.*, 1995) et des  $\beta$ xylosidases dotées d'une activité  $\beta$ -xylosidasique et aryl- $\alpha$ -arabinosidasique (Deleyn *et al.*, 1978; Utt *et al.*, 1991; Poutanen et Puls, 1988).

L'hydrolyse de substrats naturels par les  $\beta$ -xylosidases d'*Aspergillus sydowii* (Ghosh et Nanda, 1993) et de *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Shao et Wiegel, 1992) a été également étudiée. Elles hydrolysent efficacement le X2, le X3 et le X4. Le substrat X5 a été également hydrolysé mais de façon très lente. La  $\beta$ -xylosidase de *Trichoderma reesei* (Herrmann *et al.*, 1997), quant à elle, hydrolyse les xylo-oligosaccharides de X7 à X2 en xylose. De plus, il a été possible d'observer des réactions de transglycosylation. Ces réactions permettent en effet la formation de xylo-oligosaccharides d'un degré de polymérisation plus élevé. Cependant, ce phénomène n'est pas généralisé à toutes les  $\beta$ -xylosidases.

#### 4.5 Répression de la biosynthèse de la β-xylosidase

La répression catabolique de la  $\beta$ -xylosidase est un phénomène connu qui a été observé par de nombreux auteurs (Saier, 1991; Ghosh et Nanda, 1994; Pinaga *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 1996). Elle est due à la présence de fortes concentrations de glucose retrouvées dans un milieu de culture. Un taux élevé de glucose réduirait la quantité d'AMP<sub>c</sub> et entraînerait une baisse de l'activité transcriptionnelle (Wittmann, 1993).

Récemment, Flores et al. (1996) ont démontré que l'addition de 1% glucose dans le milieu de culture pouvait réprimer complètement la synthèse de plusieurs enzymes faisant partie du complexe xylanolytique dont la *β*-xylosidase. Ils ont également montré que des concentrations de 1% de glycérol et d'acide succinique réprimaient fortement la production de la β-xylosidase et des xylanases. Afin de contourner ces problèmes, plusieurs autres sources de carbone ont été utilisées dans différentes études. D'abord, le xylose (1%) a été employé par Pou-Llinas et Driguez (1987), Myburgh et al. (1991) et Flores et al. (1996). Ils ont démontré que l'utilisation du xylose pouvait respectivement augmenter de 65% et de 80% la production de  $\beta$ -xylosidase et de xylanases. Jusqu'à présent, aucune répression catabolique due au xylose n'a encore été rapportée dans la littérature. Dans une autre étude, Matsuo et al. (1996) ont utilisé du xylobiose (1,5%) comme source de carbone et ont réussi à accroître de façon significative la production de la β-xylosidase. En dernier lieu, un analogue du xylobiose, le β-méthyl-xylopyranoside (MBX) a été ajouté dans un milieu contenant du xylane de bouleau. Les résultats obtenus ont montré que le MBX a augmenté d'un facteur de trois la synthèse de la β-xylosidase (Flores et al., 1996).

#### 4.6 Instabilité de l'enzyme

Presque tous les biochimistes qui ont tenté de purifier des enzymes intracellulaires ont dû faire face à des problèmes d'instabilité enzymatique. Dans le milieu intracellulaire, les conditions sont propices pour l'activité des enzymes : il y a très peu d'oxygène et on retrouve une forte concentration de protéines, d'agents réducteurs ainsi que plusieurs métabolites qui contribuent au maintien de la stabilité des enzymes. Or, lorsque les enzymes sont libérées de leur environnement naturel, elles entrent en contact avec une variété d'agents d'origine biologique, chimique et physique. Les enzymes se retrouvent également dans un milieu oxygéné et largement dilué contenant d'innombrables enzymes protéolytiques. Elles sont alors exposées à trois types d'agression qui peuvent affecter leur activité : la dénaturation, l'inactivation du site catalytique et l'action protéolytique. Premièrement, la dénaturation d'une enzyme est principalement due à la chaleur et aux substances chimiques. En effet, en chauffant une protéine, l'énergie thermique détruit certaines liaisons entre les polypeptides et bouleverse ainsi la conformation de la protéine. Des pH extrêmes peuvent également modifier la charge des chaînes latérales d'acides aminés et rompre ainsi les liaisons ioniques et les liaisons hydrogène. Finalement, la dénaturation par des substances chimiques peut entraîner à la fois la destruction des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobiques. Deuxièment, l'enzyme peut être rendue inactive à cause d'un endommagement au niveau du site actif. En effet, le site actif d'une enzyme contient des résidus d'acides aminés qui peuvent être sujets à des modifications. Le résidu le plus susceptible à ces modifications est la cystéine : en effet, les groupements sulfhydryles des cystéines du site actif peuvent être ionisés par oxydation. Normalement, le milieu réducteur de la cellule et la présence de d'autres groupements sulfhydryles assurent la protection de ces groupements chimiques. Cependant, lorsque ces enzymes sont relâchées de leur milieu naturel, elles sont exposées à une haute concentration d'oxygène. Il y a alors la formation de ponts disulfures (-S-S-), une oxydation partielle de l'acide sulfonique (-S-OH) ou une oxydation irréversible de l'acide sulfonique (-S=O) endommageant le site actif de l'enzyme (Abelson et Simon, 1990).

#### I ОН

Pour éviter ces problèmes d'oxydation, deux mesures protectrices ont été suggérées : l'addition d'EDTA pour chélater les ions métalliques et l'utilisation d'agents réducteurs tels que le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DTT). Une concentration de 0,5 à 1 mM de DTT est suffisante pour procurer une protection complète pendant 24 heures. Afin de réaliser une étude sur l'amélioration de la thermostabilité de la  $\beta$ -xylosidase, Ghosh et Nanda (1993) ont utilisé du DTT à 100 mM et du Cu<sup>2+</sup> à 1 mM. Les résultats ont montré que l'addition du DTT a réduit la perte d'activité causée par l'oxydation. Par contre, une perte de 50% de l'activité a été notée en présence de Cu<sup>2+</sup>. Dans une autre étude, Hudson *et al.* (1991) se sont intéressés à une  $\beta$ -xylosidase thermostable provenant de *Caldocellum saccharolyticum*. Cette enzyme possédait un temps de demi-vie (t<sub>1/2</sub>) de 4,85 heures à 65°C. Mais, à 70°C, le t<sub>1/2</sub> n'était plus que de 40 minutes. Les auteurs ont donc ajouté 0,5 mg/mL de BSA et 2 mM de DTT dans le milieu et les résultats obtenus ont montré que le
$t_{1/2}$  a augmenté de quatre fois. Finalement, l'ajout de glycérol (10%) dans les tampons de purification a permis à Mihoc et Kluepfel (1990) de conserver 87% de l'activité spécifique d'une  $\beta$ -glucosidase intracellulaire de *S. lividans*.

Les cellules contiennent des enzymes protéolytiques telles que les protéases. Chez les microorganismes, ces enzymes sont d'abord entreposées dans la membrane plasmique et dans la paroi cellulaire puis sécrétées. Lors de la désintégration cellulaire, les protéases sont libérées et peuvent dégrader les enzymes d'intérêt. Afin d'éviter ce problème, le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), un inhibiteur de protéases communément employé par la majorité des auteurs et s'attaquant aux sérines protéases et à certaines carboxypeptidases, peut être ajouté dans le milieu (Deutscher, 1990).

#### 5.0 La $\beta$ -xylosidase chez S. lividans

#### 5.1 Plasmide pIAF2: activité de la β-xylosidase

Une banque génomique de *Streptomyces lividans* 1326 a permis d'obtenir des plasmides recombinants exprimant des gènes clonés. Les différents clones ayant une activité  $\beta$ -xylosidasique ont été criblés et le clone IAF2 a été retenu (Pronovost, 1991). Une fois que le plasmide pIAF2 a été extrait, Pronovost a entrepris plusieurs digestions enzymatiques afin d'établir la carte de restriction du plasmide. La longueur totale du plasmide pIAF2 est de 8,8 kpb. L'insertion d'un fragment d'ADN chromosomique de 3,1 kpb a été détectée sur le plasmide et serait responsable de l'activité  $\beta$ -xylosidasique (Figure 3).



Figure 3. Plasmide pIAF2. Les gènes codant pour la tyrosinase responsable de la biosynthèse de la mélanine, pour la résistance à la thiostreptone, pour la  $\beta$ -xylosidase et la portion carboxylique d'une protéine membranaire sont respectivement représentés par *mel*, *tsr*, *bxlA* et *bxlG*. *pmel* représente le promoteur du gène *mel*.

#### 5.2 La protéine BxIA

Le plasmide pIAF2 contient un insert de 3,1 kpb qui serait responsable de l'activité de la  $\beta$ -xylosidase. Cet insertion a été séquencée par Larocque en 1997. L'analyse de cette séquence a permis d'identifier deux cadres de lecture ouverts. Le premier codait pour une  $\beta$ -xylosidase (BxlA) et le second codait pour la partie carboxylique d'une perméase. Un site de fixation aux ribosomes (RBS) situé aux nucléotides 504 à 507 a aussi été identifié en amont du gène *bxlA*. Le cadre de lecture de ce gène débutait au codon GTG (nt 511) et se terminait au codon TAG (nt 3096). En amont du gène *bxlA*, aucune séquence typique à un promoteur de streptomycètes ne semblait être présente. L'absence d'un promoteur spécifique pour le gène *bxlA* sur le plasmide pIAF2 pourrait expliquer les résultats non-reproductibles obtenus avec ce clone (Pronovost, 1991). En effet, en amont du gène *bxlA* était le promoteur pmel. Cependant, la régulation de ce promoteur naturel pour le gène *mel* est peu connue. De plus, le promoteur pmel est situé à 500 pb en amont du codon d'initiation du gène *bxlA*.

Toujours en amont du gène *bxlA*, un second cadre de lecture codant pour une protéine membranaire de 170 acides aminés a été identifié. L'analyse de cette séquence nucléotidique a montré que le codon d'arrêt TGA chevauchait le codon GTG d'initiation de *bxlA*. Larocque a comparé ensuite la séquence en acides aminés de cette protéine avec les séquences de plusieurs autres protéines provenant de différents microorganismes. Il a constaté que cette protéine montrait une forte similarité avec la partie carboxylique de la sous-famille MalG des protéines membranaires responsables du transport actif des sucres à l'intérieur des cellules (Saurin et Dassa, 1994). Cette protéine a été nommée BxlG et le gène a été cloné en entier par la suite.

#### 5.3 Analyse de la protéine BxIA par alignement des séquences homologues

Selon la classification de Henrissat et Bairoch (1996), la protéine BxIA appartient à la famille 3 des glycosyl hydrolases. Cette famille regroupe des  $\beta$ -xylosidases et des  $\beta$ -glucosidases qui proviennent de différents microorganismes. L'analyse de l'alignement des séquences effectuée par Larocque (1997) a permis de mettre en évidence trois régions (A1, A2 et A3) qui constituent le site catalytique des glycosyl hydrolases. Ces régions comportent plusieurs acides aminés conservés (résidus E190, D191, H217, Y297 et D317). Également, un acide aspartique était présent à la position 296 de la région A3. Ce dernier a été identifié dans la littérature comme étant un acide aminé essentiel pour l'activité de la  $\beta$ -glucosidase de *Trichoderma reesei* de même que chez plusieurs autres microorganismes (Barnett *et al.*, 1991; Margolles-Clark *et al.*, 1996). Ce résidu serait le nucléophile de la réaction enzymatique d'hydrolyse d'oligosaccharides par les  $\beta$ -glucosidases et les  $\beta$ -xylosidases (Henrissat, 1991; Janbon *et al.*, 1995b). L'alignement des séquences effectué par Larocque en 1997 a été remis à jour et est illustré à la figure 4.

Figure 4. Alignement des séquences en acides aminés des trois régions du site catalytique de BxlA, des  $\beta$ -xylosidases et des  $\beta$ -glucosidases de la famille 3 des glycosyl hydrolases. Les acides aminés sont numérotés à partir de la méthionine de départ (non montrée sur la figure). La flèche indique l'acide aspartique essentiel pour la catalyse des glycosyl hydrolases de la famille 3. Les acides aminés indiqués en majuscule font partie d'un consensus d'au moins 7 acides aminés identiques. Les numéros d'accession de la banque Genbank et SwissProt sont indiqués dans la légende.

Légende :

| SI  | BxlA  | : β-xylosidase (BxIA) de Streptomyces lividans                                 |
|-----|-------|--|
| En  | XnlD  | : β-xylosidase (XlnD) de Emericella nidulans (Genbank : Y13568)                |
| Hj  | Bxl1  | : β-xylosidase (Bxl1) d'Hypocrea jecorina (Genbank : Z69257)                   |
| Ao  | XylA  | : β-xylosidase (XylA) d'Aspergillus oryzae (Genbank : AB01851)                 |
| An  | XlnD  | : β-xylosidase (XInD) d'Aspergillus niger (GenBank : Z84377)                   |
| Tr  | Bxl1  | : β-xylosidase (Bxl1) de Trichoderma reesei (GenBank : Z69257)                 |
| Tn  | XyloA | : β-xylosidase (XyloA) de <i>Thermotoga neapolitana</i> (GenBank : U58632)     |
| Tb  | XgIS  | : β-xylosidase/β-glucosidase (XglS) de Thermoanaerobacter brockii XglS         |
|     |       | (GenBank : Z56279)   |
| Sv  | DesR  | : β-glucosidase (DesR) de <i>Streptomyces venezuelae</i> (Genbank : 3789896)   |
| Sc  | Bgl1  | : β-glucosidase (Bgl1) de Streptomyces coelicolor (Genbank : CAA19790)         |
| Ec  | BglX  | : β-glucosidase (BgIX) d'Escherichia coli (SwissProt : P33363)                 |
| Mb  | BgIA  | : β-glucosidase (BgIA) de Microbispora bispora (GenBank : L06134)              |
| Sly | B2T   | : β-glucosidase de Septoria lycopersici B2Tom (GenBank : U24701)               |
| Tr  | Bgl1  | : β-glucosidase (Bgl1) de Trichoderma reesei (GenBank : U09580)                |
| Sf  | Bgl2  | : β-glucosidase de (Bgl2) de Saccharomycopsis fibuligera                       |
|     |       | (SwissProt: P22507)  |
| At  | BglS  | : β-glucosidase (BgIS) d'Agrobacterium tumefaciens (SwissProt : P27034)        |
| Km  | BglS  | : β-glucosidase (BglS) de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (SwissProt : P07337)  |
| Ct  | BglB  | : β-glucosidase (BglB) de <i>Clostridium thermocellum</i> (SwissProt : P14002) |
| Mt  | ORF   | : β-glucosidase de Mycobacterium tuberculosis (GenBank : Z97050)               |

| 71 |  |
|----|--|
| 27 |  |
|    |  |

A2 :

| Sl        | BxlA  | RdgRWGRveETiGEDPY.L | 194 | 211 | ivATlKHFvGysasr |
|-----------|-------|---------------------|-----|-----|-----------------|
| En        | XnlD  | RDgRWGRgeETiGEDPY.L | 194 | 215 | iiATaKHFAGY.diE |
| Нj        | Bxll  | RsP1WGRgqETpGEDaf.L | 198 | 220 | VaATvKHFAGYdlen |
| Ao        | XylA  | RhpvWGRgqETpGEDaYcL | 197 | 218 | liATaKHFAGYdien |
| An        | XlnD  | RhPvWGRgqETpGEDv.sL | 202 | 225 | laATaKHyAGY.diE |
| Tr        | Bx11  | RsPlWGRgqETpGEDaffL | 198 | 221 | VaATvKHFAGY.dlE |
| Tn        | XyloA | RdPRWGRteETFGEsPY.L | 175 | 196 | VvATvKHFAGYsasE |
| Tb        | XglS  | RdPRWGRteETFGEDPY.L | 121 | 142 | ivATgKHFvGYgnsE |
| Sv        | DesR  | RvPhgGRnyETfsEDP1.v | 173 | 187 | lmtTaKHFaann    |
| Sc        | Bgl1  | RsPlgGRhfEclsEDPe.L | 109 | 144 | vaATaKHyva.ndsE |
| Ec        | BglX  | RdPRWGRasEgFGEDtY.L | 180 | 203 | VmtsvKHFAaYgavE |
| Mb        | BglA  | RdPRWGRNeEgysEDP1.L | 179 | 200 | aapTlKHyla.NnnE |
| Sl        | y B2T | RhPlgGRNwEsFspDPY.L | 179 | 187 | VqAnrKHFiG.NeqE |
| Tr        | Bgl1  | ktPqgGRNwEgFGvDPY.L | 168 | 185 | VqATaKHyil.NeqE |
| Sf        | Bgl2  | vkaRgGRNfEaFGsDPY.L | 183 | 200 | VmAcvKHFiG.Neqd |
| At        | BglS  | RsglnGRNfEcysEDPa.L | 121 | 138 | VaATiKHFva.NesE |
| Km        | BglS  | RgPlgGRgfEsFsEDPY.L | 124 | 140 | iaATvKHFvc.NdlE |
| Ct        | BglB  | RsPlcGRNfEyFpEDPY.L | 130 | 147 | VgAclKHFAa.NnqE |
| Mt        | ORF   | RdPRnGRNfEylsEDP1.L | 132 | 149 | ViATtKHFsl.NcnE |
| Consensus |       | R-PRWGRN-E-FGEDPY-L |     |     | V-AT-KHF-G-NE   |
|           |       |                     |     |     |                 |

### A3 :

Ļ

| S1  | BxlA    | vRDtWGFeGtV.VaDyfgiaflktlHgitadwadAAgaALkAGLDvElP   | 330 |
|-----|---------|---|-----|
| En  | XnlD    | LRDtfeFdGYV.sgDcgAvynvwnpHgyAsneaaAsgdsilAGtDidcg   | 337 |
| Нj  | Bxll    | LResWGFpewGYV.sSDcfAvynvfnpHdyAsnqssAAassLrAGtDidcg | 342 |
| Ao  | XylA    | LRDtfdFdGYV.sgDcgAvynvfnpHgyAtnessAAaadsirA         | 344 |
| An  | XlnD    | LRDtfGFvdhGYVs.SDcdAayniynpHgyAssqaaAAaeAilAGtDidcg | 349 |
| Tr  | Bx11    | LResWGFpewGYVs.SDcdAvynvfnpHdyAsnqssAAassLrAGtDidcg | 342 |
| Τn  | XyloA   | LRkdWGFeGiV.VSDyfAvnmLgeyHriAkdksesArlALeAGiDvElP   | 315 |
| Tb  | XglS    | LRkdWGFeGiV.VSDyfAisqlyeyHhvtsdkkgAAklALeAGvDvElP   | 261 |
| Sv  | DesR    | LRtgWGFqGwV.mSDwlAdAgLdvELP                         | 297 |
| Sc  | Bgl1    | LkseWGFdGvV.VSDWgAvrgttg.A.rAGLDlaMP                | 249 |
| Ec  | BglX    | LRDqWGFkGit.VSDhgAikelik.HgtAadpedAvrvALksGinmsMs   | 319 |
| Mb  | BglA    | vR.tWtdrdllnVtDagApnnlvgsqayfatlae.adAAALkAGiD.sft  | 317 |
| Sly | / B2T   | LkgelGFqGYV.VSDWyatHsgvesvnAGLDmtMP                 | 301 |
| Tr  | Bgll    | LkDqlGFpGYV.mtDWdaqHttvqsansGLDmsMP                 | 288 |
| Sf  | Bgl2    | LkeelGFqGfV.VSDWaaqmsgAysaisGLDmsMP                 | 319 |
| At  | BglS    | LReeWGFdGvV.mSDWfgs.HstAetinAGLD1EMP                | 242 |
| Km  | BglS    | LRDeWkwdGmL.mSDWfgt.yttAaAiknGLDiEfP                | 245 |
| Ct  | BglB    | LkneWmhdGfV.VSDW.gavndrvsgLdAGLD1EMP                | 251 |
| Mt  | ORF     | LkgaWGyrGwV.mSDWggtp.swecAL.AGLDqEcg                | 252 |
| Cor | isensus | LRWGFG-V-VSDWHAAL-AGLD-E-P                          |     |

4

#### 6.0 Méthode de dépistage de l'activité enzymatique

Dans la littérature, deux méthodes sont citées fréquemment pour détecter l'activité de la  $\beta$ -xylosidase et de la  $\beta$ -glucosidase. La première méthode consiste à vaporiser le milieu de culture solide avec des composés tels que le MUX ou le 4-méthyl-umbelliféryl- $\beta$ -D-glucopyranoside (MUG). Lorsque ces derniers sont hydrolysés par une  $\beta$ -xylosidase ou une  $\beta$ -glucosidase, il est possible d'observer une fluorescence sous les rayons UV. Cependant, même si elle est très sensible, cette méthode ne permet pas de quantifier la fluorescence émise. Le test ne peut donc être utilisé que sous son aspect qualitatif. La deuxième méthode utilise les produits colorés tels que le *p*NPX ou le *p*NPG. Ces derniers, en présence d'une  $\beta$ -xylosidase ou d'une  $\beta$ -glucosidase, sont hydrolysés en *p*-nitrophénol qui donne une coloration jaune. Avec cette méthode, il est possible de doser le *p*-nitrophénol libéré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 405 nm. Il est possible de détecter la présence d'un minimum de 0,001 unité d'enzyme (Robinson, 1956; Han et Srinivasan, 1969) (Figure 5).



Figure 5. Activité de la  $\beta$ -xylosidase sur le substrat MUX et le substrat *p*NPX.

#### 7.0 Purification de protéines par chromatographie

#### 7.1 Principe de la chromatographie en phase liquide

La chromatographie est un processus permettant de séparer ou de purifier un ou plusieurs composés d'un mélange pour leur identification et leur quantification. La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions. Les molécules des produits à séparer (solutés) sont mises en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation désirée (Robyte et White, 1987).

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) permet de réaliser assez facilement des séparations et des analyses qui seraient difficiles ou impossibles par d'autres techniques chromatographiques. Cette technique de chromatographie est privilégiée par sa rapidité, son haut potentiel de résolution, sa sensibilité accrue et la reproductibilité des résultats. À l'origine, la chromatographie en phase liquide se faisait dans des colonnes en verre où le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression à l'aide d'une pompe péristaltique. Cependant, pour augmenter le débit, il a fallu travailler sous pression plus forte. Avec le HPLC, la phase mobile est poussée par une pompe sous haute pression permettant ainsi à la phase mobile de parcourir en permanence le système chromatographique. Le mélange, dissous dans un solvant, est injecté par l'intermédiaire d'une vanne, puis transporté au travers du système chromatographique, dont fait partie la colonne. Les composés en solution se répartissent suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. La séparation est détectée par UV et enregistrée sur un chromatogramme. Le signal de séparation a la forme d'un pic et si la séparation est bonne, chaque pic représente un constituant du mélange à séparer.

La chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) dérive de la chromatographie en phase liquide à haute performance. Comme le HPLC, le FPLC se distingue de la chromatographie conventionnelle par ses instruments sophistiqués permettant d'opérer à haute pression mais aussi par l'efficacité des colonnes et la sensibilité des détecteurs (Snyder et Kirkland, 1979; Freifelder, 1982; Abelson et Simon, 1990).

#### 7.2 Chromatographie à échangeur ionique

La séparation des protéines par chromatographie à échangeur ionique est basée sur la charge et le point isoélectrique (pI) des protéines à un pH donné. Le point isoélectrique correspond à une certaine valeur de pH où les charges électriques d'une protéine Le degré de liaison d'une protéine à un échangeur ionique dépend de sa s'annulent. charge nette. À une valeur de pH au-dessous de son pI, une protéine est chargée positivement et s'accrochera à un échangeur cationique (chargé négativement). Par contre, au-dessus de son pI, la protéine sera chargée négativement et s'accrochera à un échangeur anionique (charge positive). Le groupement fonctionnel le plus communément utilisé pour les échangeurs cationiques est le groupement sulfopropyl (S ou SP) ou le groupement carboxyl (C ou CM). Quant aux échangeurs anioniques, ce sont les groupements fonctionnels amine quaternaire (Q), le diéthylaminoéthyl (DEAE) et le polyéthylénimine (P) qui sont privilégiés. L'élution des protéines est provoquée en augmentant la concentration en sels de la phase mobile qui entre en compétition avec les protéines accrochées à l'échangeur ionique. Chaque protéine possède son propre temps de rétention dans la colonne et donc, en fonction de la concentration de sels, les protéines sont décrochées à différents moments (Bio-Rad, 1993).

#### 7.3 Principe de la chromatographie à interactions hydrophobiques

Le principe de séparation des protéines par chromatographie à interactions hydrophobiques est basé sur leur hydrophobicité. Le support matriciel est composé de particules macropores ou de billes de résine. Des groupements fonctionnels sont attachés à cette matrice et sont déterminants pour la liaison des protéines. En effet, la séparation est possible grâce aux différentes interactions hydrophobiques existant entre les protéines et les groupements fonctionnels. On compte quatre groupements fonctionnels différents soit les groupements phényl, méthyl, butyl et octyl et leur utilisation dépend des protéines à purifier. Par exemple, les groupements méthyl sont reconnus pour séparer les protéines très hydrophobiques, spécialement les immunoglobulines et les protéines faiblement et moyennement phényl, leur application vise davantage les protéines faiblement et moyennement hydrophobiques ainsi que les peptides et les acides nucléiques (Figure 6) (Ben-Naim, 1980; Kennedy, 1990). À cause de la densité relativement faible des groupements fonctionnels sur la matrice, une haute concentration en sels doit être utilisée pour permettre la liaison des protéines aux groupements fonctionnels dans les colonnes hydrophobiques (Bio-Rad, 1993).

La séparation par interactions hydrophobiques est possible par l'utilisation de deux différentes phases mobiles. Le tampon initial recommandé est habituellement un tampon à haute teneur en sels (tampon 50-100 mM phosphate de sodium contenant de 1 à 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à pH variant entre 6 et 8. Le tampon d'élution est généralement un tampon à faible concentration en sels (tampon 50-100 mM phosphate de sodium, pH 6 à 8). Du méthanol ou de l'éthylène glycol à 50% peut-être utilisé pour décrocher les protéines restées collées à la colonne. Finalement, la détection est réalisée grâce aux UV à une longueur d'onde de 280 nm (Harris et Angal, 1995).

ŧ

#### 7.4 Tamis moléculaire

Le tamis moléculaire sépare les protéines selon leur masse moléculaire. La résine est composée de billes poreuses qui retiennent efficacement les protéines de faibles poids moléculaires contenues dans le mélange protéique. Pendant que les petites protéines sont retenues à l'intérieur des billes, les protéines à hauts poids moléculaires passent rapidement à travers la colonne. Leur temps de rétention dans la colonne est donc très court comparativement à celui des petites protéines.



Figure 6. Schématisation des différents groupements fonctionnels couplés au support matriciel des colonnes à interactions hydrophobiques. Sont illustrés les groupements butyl sépharose 4 Fast Flow (1), octyl sépharose 4 Fast Flow (2) et phényl sépharose High Performance (3).

#### **Objectifs**

Pronovost (1991) avait isolé le plasmide pIAF2 qui conférait une activité  $\beta$ xylosidasique à la souche *S. lividans* 1326. Par la suite, en 1997, Larocque a établi une carte de restriction du plasmide et a procédé au séquençage de l'insertion. L'analyse montrait une insertion d'une longueur de 3100 pb qui était responsable de l'activité de la  $\beta$ -xylosidase. Plus spécifiquement, le séquençage de l'insertion a démontré que la  $\beta$ xylosidase était codée par un gène présomptif nommé *bxlA* d'une longueur de 2,6 kb. En amont de ce dernier, se trouve un autre gène d'une longueur de 500 b codant pour l'extrémité carboxylique d'une protéine membranaire. De plus, aucune séquence typique à un promoteur naturel de streptomycètes ne semblait être présente à l'extrémité 5' de *bxlA*. Cependant, selon l'alignement des séquences en acides aminés de BxlA avec d'autres protéines de la famille 3 des glycosyl hydrolases, BxlA aurait autant d'homologie pour les  $\beta$ -xylosidases que les  $\beta$ -glucosidases. Par conséquent, il serait intéressant de purifier la protéine BxlA et d'effectuer des essais enzymatiques afin de déterminer si elle possède une activité  $\beta$ -xylosidasique ou une activité  $\beta$ -glucosidasique.

Afin d'étudier et d'approfondir nos connaissances sur la fonction de BxIA dans le complexe xylanolytique, les objectifs de ce projet étaient:

1. d'amplifier par PCR le gène bxlA

2. de cloner le gène de la  $\beta$ -xylosidase dans un système d'expression homologue de S. *lividans* 

- 3. d'optimiser la production de la  $\beta$ -xylosidase
- 4. de mettre au point une méthode de purification conventionnelle
- 5. de caractériser la protéine au point de vue biochimique
- 6. d'analyser la spécificité de l'enzyme envers les substrats naturels: X2, X3, X4, X5 et G2, G4 et G5

# Approche expérimentale

#### 1.0 Produits utilisés

Acétate de sodium (Sigma) Acétate de potassium (BDH) Acide acétique (BDH) Acide borique (Mallinckrodt) Acides casamino (Difco) Acide chlorhydrique (J.T. Baker) (Anachemica) Acide cyclohexylaminopropane sulfonique (CAPS) (Sigma) Acide éthylènediaminetétracétique (Bio-Rad) (Sigma) Acide trichloroacétique (BDH) Acrylamide (Bio-Rad) Adénosine triphosphate (Pharmacia) Agar (Difco) Agarose (Boehringer Mannheim) Albumine de sérum bovin (Bio-Rad) Bactotryptone (Difco) Bis-tris propane (Sigma) Bleu de bromophénol (Bio-Rad) Bleu de Coomassie (Bio-Rad) Borate de sodium (Fisher) β-mercaptoéthanol (Bio-Rad) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (Bio-Rad) Bromure d'éthidium (Bio-Rad) Butanol (BDH) Carbonate de sodium (Pharmacia) Chloroforme (J.T. Baker) Chlorure de calcium (Sigma) Chlorure de cuivre (J.T. Baker) Chlorure de fer (Fisher) Chlorure de manganèse (J.T. Baker) Chlorure de magnésium (BDH) (J.T. Baker) Chlorure de potassium (Sigma) Chlorure de sodium (BDH) Chlorure de zinc (J.T. Baker) Cocktail d'inhibiteurs de protéases «Complete <sup>TM</sup>» (Boehringer Mannheim) 2-Désoxyadénine-5-triphosphate (dATP) (Pharmacia) 2-Désoxycytosine-5-triphosphate (dCTP) (Pharmacia) 2-Désoxyguanine-5-triphosphate (dGTP) (Pharmacia) 2-Désoxythymine-5-triphosphate (dTTP) (Pharmacia) Dihydrogène-orthophosphate de potassium dibasique (BDH) Dihydrogène-orthophosphate de potassium monobasique (BDH) Dithioérythritol (Bio-Rad) Dodécylsulfate de sodium (Bio-Rad) Enzymes de restriction (Pharmacia)

Enzyme *Pfu* polymérase (Stratagene) Éthanol (Gouvernement du Québec) Éthylène glycol (J.T. Baker) Extrait de boeuf (Difco) Extrait de levure (Difco) Fluorure de p-toluène sulfonyle (Sigma) Formaldéhyde (BDH) y-Globuline (Bio-Rad) Glucose (Fisher) Glutaraldéhyde (Pharmacia) Glycine (ICN) Glycérol (ICN) Huile minérale (BDH) Hydroxyde de sodium (BDH) Hydroxyquinoline (Sigma) Isopropanol (J.T. Baker) Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (Boehringer Mannheim) L-proline (Gibco BRL) Lysozyme (Pharmacia) Maltose (Fisher) Méthanol (Gouvernement du Québec) 4-méthyl-umbelliferyl-β-D-glucopyranoside (Sigma) 4-méthyl-umbelliferyl-β-D-xylopyranoside (Sigma) Nitrate d'argent (Pharmacia) N'N'-bis méthylène acrylamide (Bio-Rad) N-tris-méthyl-2-acide aminoéthanesulfonique (Sigma) Nucléotides (Pharmacia) NZ amine (Sheffied products) Persulfate d'ammonium (Bio-Rad) p-nitrophénol (Sigma) *p*-nitrophényl-β-D-glucopyranoside (Sigma) p-nitrophényl-β-D-xylopyranoside (Sigma) Polyéthylène glycol 1000 et 6000 (Boehringer Mannheim) Phénol (BDH) Propionamide (Aldrich chemical Compagny Inc.) Phosphate de sodium dibasique (BDH) Phosphate de sodium monobasique (BDH) Saccharose (BDH) (Sigma) Standard de masse moléculaire «1 KB ladder» (Gibco BRL) Standard de poids moléculaire connu pour les protéines (Gibco BRL) (Bio-Rad) (Pharmacia) Solution de Folin (Bio-Rad) Sulfate d'ammonium (Fisher) Sulfate de cuivre (J.T. Baker) Sulfate de magnésium (BDH)

Tampon One -Phor All 10X (Pharmacia) Tampon *Pfu* (Stratagene) Tartrate potassium de sodium (BDH) TEMED (Bio-Rad) TES (Sigma) Thiosulfate de sodium (J.T.Baker) Thiostreptone (Squibb Canada Itée) T4 ADN ligase (Pharmacia) Tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Boehringer Mannheim) Trousse commerciale de FlexiPrep<sup>TM</sup> (Pharmacia) Trousse commerciale de BandPrep<sup>TM</sup> (Pharmacia) Trousse commerciale de bandPrep<sup>TM</sup> (Pharmacia) Trousse commerciale de purification des produits de PCR (Boehringer Mannheim)) Trousse de dosage des protéines avec le réactif de Bradford (Bio-Rad) Tryptone de soya (Difco) Tween 20 (Bio-Rad) Tween 80 (Bio-Rad)

#### 2.0 Amorces nucléotidiques

Les amorces nucléotidiques utilisées ont été produites à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (Gene Assembler, Pharmacia LKB). Ces dernières ont été synthétisées dans le but d'amplifier le gène *bxlA* par amplification élective *in vitro* (PCR). Le tableau 5 illustre les séquences des amorces requises à l'étude. Afin de faciliter la manipulation des amplicons, divers sites uniques de restriction ont été créés en bordure des amorces.

L'amorce XyloSL5 a été produite de façon à intégrer un site de restriction *Sph* I (GCATGC) en amont des premiers codons (CTG ACT GCC GAC GTG GCT) de la protéine BxlA. L'amorce XylN3 contient le site de restriction *Sac* I (GAGCTC). L'amorce XylC5 contient à partir de son extrémité, un site de restriction *Sac* I tandis que l'amorce XyloSL3 possède un site de restriction *Bgl* II (AGATCT) suivi d'un site de restriction *Eco* RI (GAATTC). L'amorce nucléotidique Xylo3 a été produite en insérant le site de restriction *Bgl* II.

Afin d'amplifier le gène *bxlA* en entier, les amorces XyloSL5 et Xylo3 ont été utilisées. Par la suite, les amorces XyloSL5 et XylN3 ont été employées pour amplifier le fragment du gène codant pour la partie aminée de BxlA d'une longueur de 1,1 kbp. Ce fragment d'ADN peut être ensuite digéré avec les enzymes de restriction *Sph* I et *Sac* I et sous-cloné dans les vecteurs phagiques M13mp18 et M13mp19. Également, les amorces XyloSL3 et XylC5 ont permis l'amplification d'un fragment de gène codant pour la partie carboxylique de BxlA, d'une longueur de 1,5 kbp. Ce fragment d'ADN digéré aux sites de restriction *Sac* I et *Eco* RI est ensuite sous-cloné dans les vecteurs M13mp18 et m13mp19.

Tableau 5: Séquences des amorces nucléotidiques utilisées pour amplifier le gène *bxlA* par PCR. L'amorce nucléotidique XyloSL5 a été élaborée de façon à intégrer le site de restriction *Sph* I (GCATGC). L'amorce nucléotidiques XylN3 possède le site de restriction *Sac* I (GAGCTC). Ces deux oligonucléotides permettront d'obtenir un amplicon de 1,1 kpb par PCR. L'amorce nucléotidique XyloSL3 a été synthétisée pour intégrer deux sites de restriction, *Bgl* II (AGATCT) et *Eco* RI (GAATTC). Cette dernière en combinaison avec l'amorce XylC5 contenant un site de restriction *Sac* I permettra d'amplifier par PCR un fragment d'ADN d'une longueur de 1,5 kpb. L'amorce nucléotidique XyloSL5 contient le site de restriction *Bgl* II (AGATCT) et est utilisée pour amplifier le gène *bxlA* en entier avec l'amorce nucléotidique XyloSL5.

| OLIGONUCLÉOTIDE | SÉQUENCE  |  |  |
|-----------------|---|--|--|
| XyloSL 5        | 5' GGC <u>GC ATG C</u> TG ACT GCC GAC GTG GCT G 3'<br>Sph I M L T A D V A     |  |  |
| XyIN3           | 5' GGG TCG AGC AGT CC <u>G AGCTC</u> C GCC 3'<br><i>Sac</i> I                 |  |  |
| XyIC5           | 5' GGC G <u>GA GCT C</u> GG ACT GCT CGA CCC 3'<br>Sac I R T A R P             |  |  |
| XyloSL 3        | 5' GGC <u>GAATTC AGATCT</u> CTA GCT GGC GAT 3'<br><i>Eco</i> RI <i>Bgl</i> II |  |  |
| Xylo3           | 5' GGC <u>AGATCT</u> CTA GCT GGC GAT 3'<br>Bgl II                             |  |  |

#### 3.1 Phages M13mp18 et M13mp19

Les vecteurs M13mp18 et M13mp19 ont été utilisés pour le clonage des gènes et des fragments d'ADN. Ces vecteurs d'une longueur de 7250 pb possèdent la même cassette de clonage à orientation opposée et portent le gène lacZ codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme permet la conversion d'un substrat incolore, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase) en un produit bleu. Si un fragment d'ADN est inséré dans la cassette de clonage du phage en amont du gène lacZ, ce dernier sera inactivé et la conversion du substrat ne sera plus possible. Par conséquent, les recombinants (suite à une transformation cellulaire d'une souche d'*E. coli* DH 11S, voir section 8.1 de l'approche expérimentale) présenteront des plages blanches et seront utilisés pour produire de l'ADN simple brin.

#### 3.2 Plasmide pIJ702

Le vecteur multicopie pIJ702 est employé pour insérer un gène de *S. lividans* aux trois sites de restriction uniques (*Sph* I, *Bgl* II et *Sac* I). Il permet aussi la sur-expression et le maintien de la stabilité du clone. Ce plasmide porte le gène de résistance au thiostreptone (*tsr*) et le gène *mel* codant pour une tyrosinase. Cette dernière synthétise la mélanine qui donne une pigmentation noire aux colonies. L'inactivation de la tyrosinase par l'insertion d'un gène permet de distinguer les recombinants puisque ces derniers n'auront pas de pigmentation (Katz *et al.*, 1983).

#### 4.0 Souches bactériennes

La souche *E. coli* DH11S et la souche *S. lividans msiK* (10-164) ont été utilisées pour cloner et exprimer le gène bxlA codant pour la  $\beta$ -xylosidase.

Les cellules bactériennes DH11S ont été utilisées pour la production de l'ADN simple brin à partir des vecteurs recombinants phagiques M13mp18 et M13mp19 servant ainsi au séquençage des gènes. Cette souche contient les marqueurs génétiques suivants: recA1,  $\Delta(lac pro)$ , end A1, gyr A96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, F'(traD36, proAB+) et  $lacI^{q}$ -Z $\Delta$ M15.

#### 4.2 S. lividans 10-164

Par mutagenèse au NTG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), un agent mutagène, la souche de *S. lividans* 10-164 (phénotype MsiK négatif) ayant une mutation pléiotropique a été obtenue dans les laboratoires du groupe de recherche en biotechnologie des streptomycètes à l'Institut Armand-Frappier.

#### 4.3 S. lividans IAF5

La souche de *S. lividans* IAF5 dérive de la souche 10-164 et possède le plasmide pIAF5. Ce dernier contient le gène *bxlA* codant pour une  $\beta$ -xylosidase. En amont de ce gène, se trouve le promoteur de *S. lividans*, pC109, provenant du gène de la xylanase C.

#### 5.0 Milieux de culture

#### 5.1 Milieu 2XTY

Seize grammes par litre de bactotryptone, 10 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl sont requis pour la préparation du milieu de culture 2XTY. Quinze grammes par litre de Bacto agar peuvent être ajoutés à ce bouillon afin de le rendre solide. Ce milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et étalé dans des boîtes de Pétri (25 mL/Pétri) puis conservé à 4°C.

#### 5.2 Milieu H

Le milieu de croissance H est constitué de 10 g/L de bactotryptone, 8 g/L de NaCl et de 12 g/L d'agar. Ce milieu est d'abord stérilisé puis étalé dans des boîtes de Pétri et entreposé à 4°C.

#### 5.3 Géloses molles

Le protocole pour la préparation des géloses molles est similaire à celui du milieu H et nécessite les ingrédients suivants: 10 g/L de bactotryptone, 8 g/L de NaCl et 8 g/L d'agar. Le tout est chauffé jusqu'à dissolution de l'agar puis 3 mL de ce milieu sont ensuite distribués dans des éprouvettes de 12 mL puis stérilisés à 121°C.

#### 5.4 Milieu solide R5

Pour la préparation du milieu solide R5, il faut dissoudre les composantes suivantes dans l'eau distillée : 103 g/L de saccharose, 0,25 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suivi de 10,12 g/L de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5 g/L de glucose, 0,1 g/L de Bacto casamino acid, 0,2% (v/v) de solution d'éléments traces (40 mg/L de ZnCl<sub>2</sub>, 200 mg/L de FeCl<sub>3</sub>, 10 mg/L de MnCl<sub>2</sub>, 10 mg/L de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> et 10 mg/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>), 5 g/L d'extrait de levure, 22 g/L d'agar et finalement 5,73 g/L de TES. Ce milieu est autoclavé à 121°C. Quand le milieu est tiède, on ajoute les produits suivants pour un litre de milieu: 10 mL de 0,5% (p/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> stérile, 4 mL de 5 M (p/v) CaCl<sub>2</sub> stérile, 15 mL de 20% (p/v) L-proline filtrée stérilement, 1 mL de 5mg/mL CuSO<sub>4</sub> stérile, 10 mL de 1% (p/v) méthionine filtrée stérilement et 5 mL de 80 g/L de tyrosine filtrée. La tyrosine a été préparée dans 1 N NaOH de façon à obtenir une concentration finale de 80 g/L. Finalement, le milieu est réparti dans des boîtes de

Pétri (20 mL/Pétri) et séché à la température de la pièce pendant cinq jours puis conservé à 4°C.

#### 5.5 Milieu liquide R5

La recette pour la préparation du milieu de culture liquide R5 est identique à celle du milieu solide excepté que l'agar est omis.

#### 5.6 Milieu Bennett avec du thiostreptone

Un gramme par litre d'extrait de levure et 1 g/L d'extrait de bœuf sont dissous dans de l'eau distillée. Ensuite, 2 g/L de N.Z. amine, 10 g/L de maltose et 20 g/L d'agar sont additionnés à ce milieu. Le pH est ajusté à 7,2 avec du NaOH et le milieu est ensuite stérilisé. Avant de répartir le milieu dans des boîtes de Pétri, 1 mL de thiostreptone à une concentration de 50 mg/mL y est ajouté. Ce milieu sert à conserver les souches de *S. lividans* à 4°C.

#### 5.7 Lyophilisation des souches

Pour une plus longue conservation des souches, il faut les lyophiliser. Pour ce faire, des spores sont d'abord ensemencées sur du milieu solide Bennett-thio, incubées pendant une semaine à  $34^{\circ}$ C puis sont ensuite resuspendues dans du lait écrémé 10% (p/v) stérile. Les spores sont lyophilisées sous vide dans des ampoules de verre qui sont ensuite scellées à la flamme et entreposées à  $4^{\circ}$ C.

#### 5.8 Milieu TSB

Ce milieu riche est utilisé principalement pour la production d'inoculum de streptomycètes. Le milieu TSB est composé de 30 g/L de tryptone de soya.

#### 5.9 Milieu M14

Le milieu de culture M14 contient 1,4 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 5,0 g/L de  $K_2HPO_4$ , 1,0 g/L de  $KH_2PO_4$  ainsi que 0,1% (v/v) de sels de Mandels (1,4 g/L de  $ZnSO_4.7H_2O$ , 16 g/L de  $MnSO_4.H_2O$ , 5 g/L de  $FeSO_4.7H_2O$  et 2 g/L de  $CoCl_2.6H_2O$ ) et 0,2% (v/v) de Tween 80. Le pH doit être à 7,4. Dans le cas contraire, il est possible de l'ajuster en ajoutant du  $K_2HPO_4$  ou du  $KH_2PO_4$ . Après la stérilisation, on ajoute au milieu M14, 0,6 mL/100 mL de 5% (p/v) MgSO\_4 stérilisé ainsi que 1,0 mL/100 mL de 3% (p/v) CaCl<sub>2</sub> stérile.

#### 6.0 Clonage des gènes dans S. lividans

#### 6.1 Amplification élective in vitro (PCR) d'un fragment d'ADN

La technique d'amplification élective *in vitro* (PCR) permet de sélectionner et d'amplifier n'importe quelle séquence d'un mélange de fragments d'ADN. Le PCR comprend la dénaturation des brins complémentaires de l'ADN en simple brin, suivie de l'hydridation des amorces et d'une synthèse d'ADN à l'aide de la *Pfu* polymérase.

Pour réaliser une amplification élective *in vitro* (PCR), on ajoute dans l'ordre les produits suivants: dans un tube à PCR, sont mélangés 63  $\mu$ L d'eau distillée, 10  $\mu$ L de tampon *Pfu* 10X (100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl à pH 8,75, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% (p/v) Triton X-100 et 1 mg/mL BSA), 2  $\mu$ L de chaque désoxyribonucléotide triphosphaté à 10 mM soit dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 1  $\mu$ L de 5% (v/v) Tween 20, 8  $\mu$ L de 50% (v/v) propionamide, 10  $\mu$ L de matrice linéarisée (environ 100 ng) et 5  $\mu$ L de chaque amorce nucléotidique à 10 pmol/ $\mu$ L ainsi que 1  $\mu$ L de *Pfu* polymérase dans un volume total de 100  $\mu$ L. En dernier lieu, il faut ajouter 100  $\mu$ L d'huile minérale pour empêcher l'évaporation durant les cycles d'amplification avec l'appareil Gene ATAQ controller de Pharmacia LKB.

Le programme du PCR utilisé est décrit comme tel : l'ADN matrice est dénaturé en simple brin à 95°C pendant 5 minutes. À une température de 55°C, les amorces nucléotidiques s'hydrident à leur complément sur l'ADN. Cette étape dure 5 minutes. Les oligonucléotides vont ensuite servir d'amorces à la synthèse d'une chaîne d'ADN, synthèse qui s'opère par le jeu des désoxyribonucléotide triphosphates et de la *Pfu* polymérase à température élevée (72°C durant 3 minutes). À la fin de la polymérisation, on porte la température à 95°C pendant 1 minute de façon à dénaturer les duplex néoformés. Dès qu'on ramène la température à 55°C, la polymérisation recommence, car il existe encore dans le mélange un excès d'amorces. Le cycle se répète ainsi 30 fois de suite. Le programme de PCR se termine par une incubation à 72°C durant 7 minutes.

#### 6.2 Digestion enzymatique

L'ADN est analysé à la suite d'une digestion simple ou double par des enzymes de restriction. Pour effectuer une digestion enzymatique, 1 µg d'ADN est mis en présence d'une unité d'enzyme dans le tampon «One-Phor-All» 10X (100 mM Tris-acétate, pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium, 500 mM acétate de potassium) dilué à 1X ou 2X selon les recommandations du fournisseur de l'enzyme. Le volume final est complété à 20 µL avec de l'eau distillée. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant deux heures puis les enzymes sont inactivées à 85°C pendant 10 minutes.

#### 6.3 Ligation

Afin de catalyser la ligation entre le vecteur (200 ng) et le fragment d'ADN (200 ng), 2  $\mu$ L d'ATP (10mM) et 1  $\mu$ L de T4 ADN ligase sont ajoutés dans un volume final de 20  $\mu$ L. Le mélange est incubé pendant 16 heures à la température de la pièce.

#### 6.4 Analyse d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN digérés par des enzymes de restriction sont analysés suite à une électrophorèse en gel d'agarose 0,7%. Cette technique permet de séparer des molécules et son principe est bien simple : dans un champ électrique, des molécules en solution se déplacent à une vitesse qui dépend du rapport entre leur charge et leur masse. Les acides nucléiques dissous sont chargés négativement étant donné la présence de leurs groupes phosphate ionisés et migrent donc vers l'électrode positive. Pour le remplissage des puits, on utilise un tampon d'échantillon (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol, 30% de glycérol) pour resuspendre l'ADN de façon à obtenir 1 à 10 µg par puits. L'agarose (0,7%) est dissous dans du tampon d'électrophorèse TBE (89 mM Tris, 89 mM acide borique, 2mM EDTA). Il faut cependant faire bouillir la solution à

l'aide d'une plaque chauffante ou d'un four à micro-ondes pour faire dissoudre l'agarose. Une fois que la température de l'agarose atteint  $45^{\circ}$ C (ou jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon de l'agarose à main nue), du bromure d'éthidium est à une concentration finale de 0,5 µg/mL. Le marqueur utilisé pour déterminer la taille des molécules est le «1Kb ladder». Finalement, les bandes d'ADN ayant migré sur le gel d'agarose sont révélées par photographie sous les lampes UV de l'appareil Gel Doc 1000 de la compagnie Bio-Rad.

#### 6.5 Élution des fragments d'ADN sur gel d'agarose

L'extraction et la purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose sont effectuées à l'aide de la trousse commerciale BandPrep<sup>TM</sup> (Pharmacia LKB). La bande d'ADN d'intérêt est découpée du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel et transférée dans un tube Eppendorf propre. Le poids du bloc d'agarose contenant l'ADN ne doit pas excéder 250 mg. Afin de solubiliser ce bloc d'agarose, 250  $\mu$ L d'une solution de solubilisation (20 M NaI, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) sont ajoutés au tube. Le mélange est agité au vortex puis incubé à 60°C pendant 15 minutes. L'ADN est ensuite adsorbé sur des billes de Sephaglas (15  $\mu$ L) pendant 5 minutes à la température de la pièce. Par la suite, les billes sont récoltées par centrifugation durant 1 minute à vitesse maximale (centrifugeuse Baxter Canlab de Heraeus Instruments, Biofuge 13) puis lavées trois fois avec 80  $\mu$ L d'une solution de lavage (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 60% (v/v) d'éthanol, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). À la suite du troisième lavage, le culot de billes-ADN est séché pendant 10 minutes à la température de la pièce. Une fois séché, l'ADN est élué avec 20  $\mu$ L d'une solution d'élution (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). Après une minute de centrifugation à vitesse maximale, le surnageant contenant l'ADN purifié est récupéré.

#### 7.0 Bactéries compétentes

#### 7.1 Préparation des cellules compétentes d'E. coli

Une pré-culture de la souche DH11S a été inoculée la veille avant la préparation des cellules compétentes. Cette pré-culture est incubée pendant toute une nuit à 37°C avec agitation (250 rpm). Par la suite, 1 mL de cette pré-culture est transféré stérilement dans un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu 2XTY. Cette culture est ensuite incubée à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm se situe entre 0,4 et 0,5. La culture est ensuite versée dans deux tubes de 50 mL en polypropylène stériles et incubée sur de la glace pendant 15 minutes. Par la suite, les cellules sont récoltées par centrifugation (2500 rpm) (centrifugeuse Beckman modèle J2-21, rotor JA-20) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 0,33 volume de tampon de compétence I (15% (v/v) glycérol, 100 mM KCl, 30 mM acétate de potassium, 60 mM CaCl<sub>2</sub> à un pH de 5,8 ajusté avec de l'acide acétique). Le tout est incubé sur de la glace pendant une heure. La suspension de cellules est ensuite centrifugée pendant 15 minutes à une vitesse de 3000 rpm. Le culot est récupéré et est resuspendu délicatement dans du tampon de compétence II (20 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub> 15% (v/v) glycérol à pH 6,8 ajusté avec du NaOH) à un volume correspondant à 1/25 du volume original. La suspension de cellules est incubée sur de la glace pendant 15 minutes et est ensuite aliquotée dans des tubes Eppendorf stériles. Finalement, les cellules compétentes sont congelées instantanément avec de la glace sèche et de l'éthanol. Une fois congelées, elles sont conservées à -70°C.

#### 7.2 Préparation des protoplastes de S. lividans

Une pré-culture de streptomycètes est préparée dans du milieu TSB à partir du mycélium et incubée à 34°C pendant 24 heures avec agitation (240 rpm). Trois mL de cette pré-culture sont utilisées pour ensemencer 100 mL de milieu R5 liquide contenant 0,5% (p/v) de glycine. Cette culture est incubée pendant 24 heures à 34°C avec agitation. Elle est ensuite centrifugée à 9000 rpm (Beckman, modèle J2-21, rotor JA-20) pendant 15 minutes et le culot récupéré est lavé deux fois avec 50 mL de 10,3% (p/v) saccharose Après le deuxième lavage, 20 mL de tampon P contenant 1 mg/mL de lysozyme sont ajoutés au culot de cellules. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes pour permettre la digestion des parois cellulaires. Le tampon P est composé de 129 g/L de saccharose, 0,31 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,53 g/L MgCl<sub>2</sub>, et 25% (v/v) d'éléments traces. Cette solution est ensuite stérilisée et laissée refroidie à la température de la pièce. Puis une fois refroidie, il faut ajouter à un litre de cette solution, 12,5 mL de 0,5% (p/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125 mL de 3,68% (p/v) CaCl<sub>2</sub> et 125 mL de 5,73% (p/v) TES). Après les 30 minutes d'incubation, il est possible d'observer au microscope le taux de protoplastes produits: si la quantité des protoplastes est inférieure à 95%, il faut poursuivre l'incubation. Par contre, lorsque la quantité de protoplastes a atteint 95% et plus, le mélange est filtré sur de la laine de verre et le filtrat est récolté dans des tubes de centrifugation de 50 mL puis centrifugé à 5000 rpm pendant 7 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans le volume résiduel. Par la suite, un premier lavage est effectué dans 40 mL de tampon P. Le mélange est obtenu par aspiration à la pipette et est ensuite centrifugé à faible vitesse (5000 rpm) pendant 7 minutes. Les protoplastes sont lavés de nouveau dans du tampon P et resuspendus dans un volume de façon à obtenir une concentration finale de 10<sup>9</sup> protoplastes/mL. La quantité des protoplastes est estimée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm et comparée à une courbe standard représentant la densité optique (D.O.) en fonction du nombre de protoplastes/mL.

#### 8.0 Transformation bactérienne

#### 8.1 Transformation d'E. coli DH11S

Cinq  $\mu$ L du vecteur phagique (M13mp18 ou M13mp19) recombinant sont mis en suspension avec 300  $\mu$ L de cellules compétentes DH11S. Le mélange est ensuite incubé sur de la glace pendant 40 minutes. Pendant ce temps d'incubation, plusieurs tubes contenant 3 mL de géloses molles préparés antérieurement (voir section 5.3) sont dissous et incubés à 50-53°C. Après 40 minutes d'incubation sur de la glace, le mélange de bactéries compétentes et d'ADN subit un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes pour permettre la transformation des cellules. Le mélange est remis immédiatement sur de la glace. Ensuite, dix  $\mu$ L d'IPTG (inducteur de l'opéron lactose) à 100 mM, 300  $\mu$ L de cellules de fonds DH11S (culture d'*E. coli* DH11S ayant une D.O<sub>600</sub> de 1,5) et 50  $\mu$ L de X-Gal (un substrat de la  $\beta$ -galactosidase donnant la coloration bleue lorsqu'il est hydrolysé par l'enzyme) sont mélangés dans un tube de gélose molle. Puis, un volume de bactéries transformées est ajouté dans le mélange. Une fois bien agité, le mélange est étalé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu H. Ces dernières sont incubées à 37°C en position inversée pendant toute la nuit.

#### 8.2 Transformation de S. lividans

Dans un tube Eppendorf stérile sont ajoutés 5  $\mu$ L d'ADN (produit de ligation), 50  $\mu$ L d'une suspension de protoplastes de *S. lividans* 10-164 et 200  $\mu$ L de 25% (v/v) PEG 1500. Après une incubation d'une à deux minutes, le mélange est étalé sur du milieu R5 solide. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 34°C en position inversée pendant 16 heures. Après ce temps d'incubation, 1 mL de 0.5 mg/mL thiostreptone stérile est étalé au milieu R5 contenant les transformants. Les boîtes de Pétri sont replacées à 34°C pendant 24 à 48 heures.

## 9.1 Extraction de l'ADN plasmidique ou des formes réplicatives du phage M13 d'E. coli

L'extraction des plasmides ou des formes réplicatives des phages M13 d'*E. coli* se fait à l'aide de la trousse commerciale FlexiPrep de la compagnie Pharmacia Biotech. Dans un tube Eppendorf propre, un culot cellulaire provenant d'une culture de 1,5 mL est resuspendu dans 200  $\mu$ L de solution I isotonique (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 400  $\mu$ g/mL ARNase I). Par la suite, les cellules sont lysées par l'ajout de 200  $\mu$ L de solution II alcaline (1 M NaOH, 5,3% (p/v) SDS). Le tout est mélangé par inversion avant l'ajout de 200  $\mu$ L de solution III neutralisante (3 M acétate de sodium, pH 4,8) qui permet la précipitation de l'ADN chromosomique. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et l'ADN précipité par l'ajout de 420  $\mu$ L d'isopropanol. Après 10 minutes d'incubation à la température de la pièce, la solution d'ADN est centrifugée pendant 10 minutes. Finalement, le surnageant est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur et le culot contenant l'ADN est dissous dans 50  $\mu$ L de tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA).

#### 9.2 Extraction d'ADN simple brin du phage M13

L'extraction d'ADN simple brin a pour but d'obtenir de l'ADN matrice pour le séquençage. En effet, un fragment d'ADN ou de gène d'intérêt a été cloné dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Ces derniers ont été ensuite insérés dans des cellules d'*E.coli* DH11S et les plages blanches représentant les transformants sur un milieu H ont été repiquées pour l'isolement de l'ADN simple brin.

Une culture en phase logarithmique d'*E. coli* DH11S est préparée à partir d'une pré-culture de 16 heures dans le milieu 2XTY. Les plages blanches obtenues suite à la transformation d'*E. coli* (voir section 8.1 de l'approche expérimentale) sont repiquées à

55

l'aide de cure-dents stériles et incubées dans 1,5 mL de culture logarithmique de DH11S pendant 6 heures à 37°C avec agitation. Après cette période d'incubation, les cultures sont transférées dans des tubes Eppendorf et centrifugées pendant 10 minutes à vitesse maximale. Le surnageant est récupéré et 1 mL est mélangé à 250 µL de 20% PEG 6000 + 2,5 M NaCl. Le mélange est gardé sur de la glace pendant une heure puis centrifugé pendant 5 minutes afin de récupérer les phages. La totalité du surnageant est éliminée et le culot est centrifugé de nouveau afin d'éliminer toute trace de liquide. Une fois que le culot de phage est bien asséché, il est redissous dans 100 µL de TE et 50 µL de phénol saturé afin de purifier l'ADN simple brin. L'échantillon est ensuite agité au vortex et incubé pendant 15 minutes à la température de la pièce. Cinquante µL de chloroforme sont ensuite resuspendus dans l'échantillon puis agité au vortex pendant 10 secondes. Le mélange est laissé au repos pendant 5 minutes à la température de la pièce et le tout est centrifugé pendant 15 minutes à vitesse maximale. La phase aqueuse contenant l'ADN simple brin est transférée délicatement dans un tube Eppendorf propre. L'étape de l'extraction phénol-chloroforme est répétée deux fois de suite. À la dernière extraction, l'ADN simple brin est précipité par l'ajout de 0.1 volume 3 M d'acétate de sodium et 2 volumes d'éthanol. Le mélange est incubé à -20°C pendant 15 minutes. Le culot d'ADN simple brin est récupéré suite à une centrifugation de 10 minutes. Finalement, le culot est lavé avec 70% (v/v) d'éthanol et séché à l'air libre. Une fois sec, ce dernier est dissous dans 30 µL d'eau distillée stérile.

#### 9.3 Extraction d'ADN de S. lividans

Après 48 heures de croissance, un volume de 500 µL d'une culture de S. lividans en milieu TSB (voir section 11.1.1 de l'approche expérimentale) est prélevé et transféré dans un tube Eppendorf. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 30 secondes pour récolter le mycélium. Le culot de mycélium est d'abord lavé avec 500 µL d'une solution contenant 10,3% (p/v) de saccharose, 25 mM EDTA et 25 mM Tris-HCl (pH 8,0). Il est ensuite resuspendu dans 500 µL de la même solution mais contenant cette fois-ci, 2 mg/mL de lysozyme. Cette suspension a été incubée à 37°C pendant 30 minutes. Après ce

délai d'incubation, 250 µL d'une solution contenant 0,3 M NaOH et 2% (p/v) SDS sont ajoutés à la suspension et le tout est mélangé au vortex immédiatement et incubé à 70°C pendant 15 minutes. L'échantillon est refroidi lentement jusqu'à ce qu'il ait atteint la température de la pièce. Par la suite, 80 µL d'une solution contenant 5 g/mL phénol Analer, 0,05% (v/v) chloroforme, 5 mg/mL hydroxyquinoline sont ajoutés à l'échantillon et le tout est agité au vortex. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 3 minutes et le surnageant est récupéré (environ 700 µL). Ce dernier est transféré dans un tube Eppendorf propre auxquels sont ajoutés 70 µL de 3 M d'acétate de sodium pour concentrer l'ADN. Par la suite, l'ADN est précipité avec 700 µL d'isopropanol pendant 5 minutes et est récupéré suite à une centrifugation de 2 minutes. Le culot d'ADN est ensuite redissous dans 50 µL de tampon TE et 5 µL de 3 M acétate de sodium. La solution est ensuite purifiée au phénol neutre (25  $\mu$ L). Une centrifugation de 2 minutes permet de séparer la phase aqueuse contenant l'ADN de la phase phénolique contenant entre autres des protéines. La solution d'ADN (phase aqueuse) est ensuite transférée dans un tube Eppendorf propre puis précipitée avec 50 µL d'isopropanol. Après un temps d'incubation et de centrifugation de 5 minutes à la température de la pièce, le culot d'ADN est récupéré et redissous dans 50 µL d'eau distillée stérile.

#### 10.0 Criblage des transformants par vaporisation au MUX

Après trois jours d'incubation à  $34^{\circ}$ C (voir section 8.2 de l'approche expérimentale), les transformants de *S. lividans* de coloration blanche sont repiqués sur des géloses Bennett-thiostreptone. Pour vérifier l'activité  $\beta$ -xylosidasique, le substrat MUX est utilisé. En effet, en présence d'une  $\beta$ -xylosidase, le substrat MUX, par une réaction d'hydrolyse, libère du xylose et du 4-méthyl-umbelliférone. Ce dernier est un composé fluorescent détecté sous des rayons UV à une longueur d'onde de 250 nm.

Le substrat MUX est dissous dans 5 mL d'une solution de 0,1 M phosphate de sodium à pH 7,0. Cette dernière est ensuite vaporisée sur des milieux de culture solide Bennett-thio sur lesquels s'est développé le mycélium de la souche recombinante. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, les clones recombinants dotés d'une activité β-xylosidasique émettent de la fluorescence sous les rayons UV.

#### 11.0 Production de la β-xylosidase

#### 11.1 Conditions de culture

#### 11.1.1 Mise en pré-culture

Habituellement, la pré-culture des souches de *S. lividans* est effectuée dans 25 mL de milieu TSB. Mais, pour obtenir un meilleur rendement de mycélium, la souche de *S. lividans* produisant la  $\beta$ -xylosidase a été préparée dans 100 mL de milieu de culture. Cent  $\mu$ L de thiostreptone (5 mg/mL) est additionné à un volume de 100 mL de TSB préalablement stérilisé. Du mycélium de la souche produisant la  $\beta$ -xylosidase (provenant d'un milieu solide Bennett-thio) est ensuite inoculé dans ce milieu. Afin de faciliter la croissance, des billes de verre y sont ajoutées. Ces pré-cultures sont incubées à une température de 34°C pendant 24 heures avec agitation (240 rpm).

#### 11.1.2 Production en milieu minimal M14

Dans 12 Erlenmeyers de deux litres contenant 400 mL de milieu M14 contenant 1% de xylose et 400 µL de 5 mg/mL thiostreptone sont ensemencées 6% à 8% (v/v) de mycélium provenant des pré-cultures en milieu TSB. Cependant, avant d'inoculer le mycélium dans le milieu M14, il est nécessaire de passer ces pré-cultures au broyeur de Potter. Cette étape permet de bien fragmenter le mycélium pour permettre une croissance plus rapide et homogène. Lorsque les 12 Erlenmeyers sont ensemencés, ces derniers sont incubés pendant 48 heures à 34°C avec agitation (240 rpm).

#### 11.2 Préparation de l'extrait enzymatique

Les cultures en milieu M14 avec xylose (1%) sont centrifugées à une vitesse de 14 000 x g à 4°C pendant 30 minutes (Beckman, modèle J2-21, rotor JA-10). Le mycélium est lavé deux fois dans du tampon constitué de 50 mM phosphate de sodium (pH 6,5) pour éliminer toute trace de milieu de culture. Après le deuxième lavage, le mycélium est resuspendu dans un volume minimal du même tampon auquel sont ajoutés un cocktail d'inhibiteurs de protéases «Complete<sup>TM</sup>» (annexe 1) et du DTT à 1 mM. Les cellules sont brisées à l'aide d'une presse de French (American Instrument) sous une pression de 20 000 psi et sont observées au microscope pour vérifier le degré du cassage. La désintégration du mycélium est effectuée à basse température pour inhiber l'activation des protéases et empêcher la dénaturation de l'enzyme par la chaleur. La suspension est donc maintenue dans de la glace. Par la suite, la suspension de cellules brisées est centrifugée à 4°C pendant 30 minutes à 12 000 x g (rotor JA-20) et ultracentrifugée pendant 60 minutes à 100 000 x g dans le but d'éliminer les débris de mycélium.

#### 11.3 Essais enzymatiques quantitatifs

Pour calculer quantitativement l'activité enzymatique de la  $\beta$ -xylosidase, un substrat d'origine commerciale qui lui est spécifique est utilisé: le *p*NPX. Ce substrat, en présence d'une  $\beta$ -xylosidase, est hydrolysé en un colorant jaune, le *p*-nitrophénol, et libère du xylose. Le *p*-nitrophénol est mesuré à une longueur d'onde de 405 nm au lecteur de microplaque BIO-TECK. La solution d'essai enzymatique contient en premier lieu, 80 µL de *p*NPX à 25 mM dissous préalablement dans du tampon 50 mM phosphate de sodium (pH 6,5). Ce substrat est pré-incubé pendant 10 minutes dans un bain-marie avec agitation à 40°C. La réaction est initiée par l'ajout de 120 µL de solution enzymatique à doser et incubée à 40°C pendant 10 minutes. La réaction est ensuite arrêtée avec l'addition de 300 µL de 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Un échantillon témoin est utilisé pour déterminer le bruit de fond. La densité optique mesuré à une longueur d'onde de 405 nm est convertie en µmoles de *p*-
nitrophénol (*pNP*) libéré. Ce calcul est effectué à partir d'une courbe standard préétablie avec des concentrations connues de *p*-nitrophénol. L'activité de la  $\beta$ -xylosidase est exprimée en µmoles de produit formé par minute ou en unités internationales (UI) où une unité correspond à 1 µmole de *p*-nitrophénol formé à partir du substrat en une minute.

## 12.0 Mise au point de la purification de la β-xylosidase

#### 12.1 Purification par chromatographie à échangeur ionique

Deux membranes à échangeur ionique provenant de la compagnie Sartorius ont été utilisées lors de la mise au point de la purification de la β-xylosidase. Premièrement, la membrane O 15 est une membrane anionique chargée positivement et possédant un groupement fonctionnel d'ammonium quaternaire (R-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). La deuxième membrane, S 15, est une membrane cationique chargée négativement et possédant un groupement fonctionnel d'acide sulfonique (R-CH2-SO3). Ces membranes ont été prééquilibrées avant leur utilisation. La membrane Q 15 a été d'abord lavée avec 10 mL de tampon 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 contenant 1 M de NaCl. Ensuite, elle a été lavée avec le même tampon mais en absence de NaCl. La même procédure a été appliquée pour la membrane S 15, mais en utilisant 50 mM d'acide malonique, pH 5,0 contenant 1 M de NaCl puis, avec le même tampon sans sel. Une fois que les membranes ont été équilibrées, l'échantillon brut a été injecté aux deux membranes. Les fractions non retenues ont été récupérées suite à l'application. Les membranes ont été ensuite lavées avec 20 à 30 mL de tampon à faible force ionique (sans sel) afin d'enlever toutes les protéines n'ayant pas été accrochées à la membrane. Finalement, les protéines ont été éluées avec du tampon contenant 1 M de NaCl.

#### 12.2 Purification par chromatographie à interactions hydrophobiques

Pour effectuer la purification de protéines par chromatographie à interactions hydrophobiques, la trousse commerciale de Pharmacia Biotech «HiTrap<sup>TM</sup> HIC Test Kit» renfermant cinq différentes colonnes a été utilisée: la phényl sépharose High Performance, la phényl sépharose 6 Fast Flow (« low substitution » i.e. densité du ligand à 20  $\mu$ g/mL de gel), la phényl sépharose 6 Fast Flow (« high substitution » i.e. densité du ligand à 40  $\mu$ g/mL de gel), la butyl sépharose 4 Fast Flow et l'octyl sépharose 4 Fast Flow. Tout d'abord, les colonnes ont été lavées avec 5 mL de tampon d'élution (50 mM phosphate de sodium, pH 7,0) à un débit de 1 mL par minute. Par la suite, les colonnes ont été équilibrées avec 5 mL de tampon d'adsorption (50 mM phosphate de sodium avec 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0). Cependant, avant l'application de l'échantillon à la colonne, il était important d'ajuster l'échantillon à la même force ionique et à la même teneur en sel que le tampon d'adsorption. Dès que l'échantillon a été appliqué à la colonne, les fractions non retenues ont été récupérées à la sortie. La colonne a été ensuite lavée avec 5 à 10 mL de tampon d'adsorption. Finalement, l'élution a été effectuée par gradient descendant de 0 à 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### 13.0 Purification des protéines

#### 13.1 Chromatographie à interactions hydrophobiques

La colonne de phényl sépharose HP (High Performance) de Pharmacia Biotech a été montée sur l'appareil FPLC de Waters 625 LC system. Il y a quatre pompes reliées à l'appareil. La première pompe (A) a été reliée au tampon phosphate de sodium à 50 mM, pH 7,0 contenant 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La deuxième pompe (B) a été reliée au tampon phosphate de sodium à 50 mM à pH 7,0. Les troisième (C) et quatrième pompes (D) étaient respectivement reliées à des bouteilles contenant 50% (v/v) d'éthylène glycol et de l'eau déionisée. Ces solutions ont été filtrées préalablement sur des membranes de 0,45/0,2 µm de Gelman Sciences Acrodisc <sup>R</sup> PF. La colonne phényl sépharose HP a été

équilibrée d'abord avec du tampon d'élution (sans (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pendant 45 minutes à un débit de 4 mL par minute. La colonne a été ensuite équilibrée avec du tampon d'adsorption (avec (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pendant I heure à un débit de 4 mL par minute. L'échantillon a été filtré sur une membrane de 0,45/0,2  $\mu$ m (Acrodisc <sup>R</sup> PF) avant d'être injecté sur la colonne à un débit de 2 mL/min. Il a été possible de suivre la purification sur chromatogramme grâce à l'intégrateur de DIONEX 0120 et au détecteur UV de Waters 484 (Millipore). Suite à l'injection de l'échantillon, le tampon phosphate de sodium à 50 mM avec 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0 a été utilisé pour éliminer toutes les protéines ne s'accrochant pas à la colonne. Après cette étape de lavage, un programme d'élution à gradient descendant de sel a été sélectionné (Tableau 6) à partir du FPLC de Waters 625 LC system. Les fractions ont été recueillies à l'aide du collecteur de fractions de la compagnie Pharmacia Fines Chemicals Frac-300 à toutes les 2 minutes pour chaque tube. Une fois la purification terminée, les pompes du système FPLC ont été lavées avec de l'éthanol 5% (v/v) et la colonne a été conservée dans 0,02% (p/v) d'azide de sodium et entreposée à 4°C.

| Temps<br>(Min) | Débit<br>(mL/min) | % A | % B | % C | % D | Courbe   |
|----------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|----------|
| 0,00           | 2                 | 100 | 0   | 0   | 0   | *        |
| 5,00           | 4                 | 100 | 0   | 0   | 0   | linéaire |
| 60,00          | 4                 | 0   | 100 | 0   | 0   | linéaire |
| 75,00          | 4                 | 0   | 100 | 0   | 0   | linéaire |
| 105,00         | 4                 | 0   | 0   | 100 | 0   | linéaire |
| 120,00         | 4                 | 0   | 0   | 100 | 0   | linéaire |
| 130,00         | 4                 | 0   | 0   | 0   | 100 | linéaire |
| 190,00         | 4                 | 0   | 0   | 0   | 100 | linéaire |

Tableau 6: Programme d'élution sur la colonne phényl sépharose High Performance

A: Tampon 50 mM phosphate de sodium + 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0

B: Tampon 50 mM phosphate de sodium, pH 7,0

C: 50% (v/v) éthylène glycol

D: Eau déionisée

#### 13.2 Ultrafiltration : concentration sur une membrane de type Amicon

Les fractions récoltées suite à la purification par chromatographie à interactions hydrophobiques sont analysées en présence du substrat *p*NPX (voir section 12.3). Les fractions ayant une activité *p*NPX positive sont réunies et mélangées ensemble. L'échantillon découlant de ce mélange est ensuite purifié sur tamis moléculaire. Cependant, avant de passer l'échantillon sur le tamis moléculaire, il faut s'assurer que la concentration en sels de l'échantillon soit égale à celle du tampon, car la concentration en sels pourrait influencer fortement la liaison des protéines à la colonne. Pour cela, l'échantillon a été concentré sur une membrane Amicon PM 10 de 43 mm de diamètre (Diaflo <sup>R</sup> Ultrafiltres). Cette membrane a la capacité de retenir uniquement des molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa. Avant l'utilisation, la membrane a été rincée à l'eau déionisée. Quelque soit le volume initial de l'échantillon, celui-ci doit être concentré jusqu'à un volume de 2 mL avant d'être injecté sur le tamis moléculaire (colonne Superdex 200-HR de Pharmacia Biotech). Cette étape d'ultrafiltration a été réalisée à 4°C, sous une atmosphère d'azote à une pression de 45 psi.

## 13.3 Tamis moléculaire

L'échantillon concentré jusqu'à 2 mL est filtré à travers une membrane de 0,45 µm (Acrodisc<sup>R</sup>PF). La colonne Superdex HR-200 est connectée au moniteur UV de Pharmacia LKB Optical Unit UV-1. La colonne est équilibrée pendant 4 heures avec du tampon 50 mM phosphate de sodium, pH 7,0, à un débit de 1 mL/min. L'échantillon est ensuite injecté dans la colonne et les différentes fractions sont récupérées à l'aide du collecteur de fraction Pharmacia LKB FRAC-100, réglé à 3 minutes par fraction. Il est possible de suivre la purification avec l'enregistreur de Pharmacia LKB bromma 2210 recorder 2-channel.

Le dosage des protéines a été réalisé soit selon la méthode de Lowry *et al.* (1951), en utilisant le réactif de Folin et la fraction V de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard, ou par la méthode de Bradford (1976) avec le réactif de Bradford provenant de la trousse "Bio-Rad Protein Assay" et la γ-globuline comme standard.

## 15.0 Analyse des protéines

## 15.1 Analyse sur gel de polyacrylamide 12,5% en conditions dénaturantes

Afin de vérifier la pureté des échantillons protéiques, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant de 12,5% en présence de SDS, a été effectuée selon la méthode conventionnelle établie par Laemmli *et al.* (1970). L'appareillage utilisé aux laboratoires du groupe de recherche des Streptomycètes est le Mini Protean II et provient de Bio-Rad. Une quantité de protéines connues a été diluée avec du tampon d'échantillon 5 X (1 mL de 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 3,2 mL de 50% (v/v) glycérol, 1,6 mL de 10% (p/v) SDS, 0,4 mL de β-mercaptoéthanol, 0,8 mL de 0,5% (p/v) bleu de bromophénol dans un volume final de 8 mL) dans un rapport de 4:1. Le mélange a été bouilli pendant 10 minutes et déposé dans un puits du gel de polyacrylamide dénaturant 12,5%. La migration a été effectuée à 200 volts pendant 45 minutes dans un tampon d'électrophorèse 1 X (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3). Le standard de poids moléculaires utilisé pour déterminer la taille des protéines (« Low Molecular Weight » ou appelé « LMW ») comprenait les protéines standards suivantes: la phosphorylase b (97,4 kDa), l'albumine de sérum bovin (66 kDa), l'ovalbumine (46 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,3 kDa).

Une fois la migration terminée, les gels ont été colorés avec une solution de bleu de Coomassie 0,1% R-250 (0,1% (p/v) de bleu de Coomassie R-250 dissous dans 40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique glacial) pendant 30 minutes. La décoloration a été faite dans une solution de décoloration (40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique) pendant 2 à 3 heures. Les gels ont été ensuite trempés dans une solution contenant 10% (p/v) de glycérol et ont été séchés entre deux membranes de cellulose de la trousse «Gel Drying» de Promega en suivant les instructions indiquées par la compagnie.

# 15.2 Électrophorèse des protéines et coloration automatisées (Phastsystem<sup>TM</sup>)

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 12,5% en conditions dénaturantes ou sur gel natif à gradient 8-25% (Phastgel<sup>TM</sup>) selon la méthode automatisée de Pharmacia LKB. Dans le cas d'un gel dénaturant, un volume de 10  $\mu$ L d'échantillon à tester a été dilué avec 5  $\mu$ L de tampon d'échantillon 5 X (375  $\mu$ L/mL de 20% (p/v) SDS, 150  $\mu$ L/mL d'une solution 20 X Tris-HCI-EDTA contenant 200 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0, 150  $\mu$ L/mL de 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol et 125  $\mu$ L/mL de 0,5% (p/v) de bleu de bromophénol) et bouilli pendant 10 minutes. Quatre  $\mu$ L ont été déposés sur un puits du peigne applicateur 6/4 («Sample Applicator» de Pharmacia). Par contre, lors de l'utilisation des gels natifs, 10  $\mu$ L d'échantillon ont été dilués dans 10  $\mu$ L de tampon d'échantillon natif (0,88 M L-ala, 0,25 M Tris-HCl, pH 8.0, 12% glycérol). L'échantillon n'a pas été bouilli et 4  $\mu$ L ont été déposés directement sur un puits du peigne applicateur 6/4. Le standard de poids moléculaires était le «Low Molecular Weight (LMW) et provenait de la compagnie Pharmacia.

La migration différait selon le type de gels: pour le gel de polyacrylamide dénaturant 12,5%, la séparation a été effectuée jusqu'à 70 Volts-heures (Vh) tandis que pour le gel natif à gradient 8-25%, la migration a été effectuée jusqu'à 268 Vh (Pharmacia LKB Biotechnology, 1989). Par la suite, ces gels ont été colorés au nitrate d'argent selon la méthode du «Development Unit» de l'appareil Phastsystem<sup>TM</sup> de la compagnie Pharmacia LKB.

## 15.3 Détermination du point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique de l'enzyme a été réalisée par focalisation isoélectrique en gel de polyacrylamide contenant des ampholytes formant un gradient de pH. Les échantillons ont été séparés sur un gel contenant des ampholytes de pH 3 à 9 en utilisant l'appareil Phastsystem<sup>TM</sup>. Quatre  $\mu$ L d'échantillon ont été déposés sur un des puits du peigne applicateur 6/4. La séparation a été effectuée selon le programme de l'appareil pour la détermination du point isoélectrique. Le gel a été ensuite coloré au nitrate d'argent en suivant les indications de la compagnie Pharmacia et la méthode du "Development Unit". Le pI de la protéine a été évalué par rapport à un standard de pI. Le standard de pI comprenait les protéines suivantes :

- amyloglucosidase à pI 3,5
- inhibiteur de trypsine de soya (4,55)
- $\beta$ -lactoglobuline A (5,2)
- anhydrase B carbonique de bovin (5,85)
- anhydrase B carbonique humaine (6,55)
- bande acide de myoglobine (6,85)
- bande basique de myoglobine (7,35)
- bande acide de lectine de lentille (8,15)
- bande moyenne de lectine de lentille (8,45)
- bande basique de lectine de lentille (8.65)
- trypsinogène (9,3)

#### 16.0 Caractérisation biochimique

## 16.1 Détermination de la température optimale

Le substrat *p*NPX à 25 mM a été préparé dans du tampon 50 mM phosphate de sodium pH 7,0 et a été incubé en présence de la préparation d'enzyme pure (obtenue suite à la purification au tamis moléculaire) à de différentes températures (25°C, 35°C, 40°C,

45°C, 50°C, 55°C et 60°C). La procédure pour effectuer le test enzymatique à différentes températures a été réalisée dans les conditions décrites antérieurement (section 12.3 de l'approche expérimentale).

#### 16.2 Détermination du pH optimal

Le substrat *p*NPX à 25 mM a été préparé dans des tampons à pH variant de 2 à 11. Les tampons à pH 2 et 3 étaient constitués de 50 mM HCl-KCl, les tampons à pH 4 et 5 étaient constitués de 50 mM acétate de sodium, les tampons à pH 6 et 7 étaient constitués de 50 mM phosphate de sodium, les tampons à pH 8 et 9 étaient constitués de 50 mM Tris-HCl et les tampons à pH 10 et 11 étaient constitués de 50 mM CAPS. Le test enzymatique a été établi dans les conditions standards décrites à la section 12.3 pour chaque pH donné.

#### 16.3 Cinétique enzymatique

Le  $V_{max}$  et le  $K_m$  sont deux constantes de Michaelis-Menten. La première est définie comme étant la vitesse maximale d'une réaction enzymatique lorsque l'enzyme est complètement saturée de substrat. La seconde correspond à la concentration de substrat à laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié de sa vitesse maximale. Cette constante indique donc l'affinité de l'enzyme envers le substrat. Ainsi, plus la valeur du  $K_m$  est élevée, moins grande est l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Afin de déterminer ces constantes de Michaelis-Menten, les vitesses initiales d'hydrolyse doivent être obtenues dans les conditions de pH, de température et de temps d'incubation optimaux. On reporte ensuite les valeurs de vitesse initiale (V<sub>0</sub>) de chaque courbe en fonction de la concentration de substrat. La représentation graphique de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction des différentes concentrations de substrat permet de déterminer la constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>). Pour la détermination de ces paramètres cinétiques, des concentrations de 1 à 10 mM pNPX dissous dans du tampon 50 mM phosphate de sodium, pH 7,0 ont été utilisées. L'activité enzymatique pour chaque concentration était déterminée en dosant la quantité de p-nitrophénol libéré en fonction du temps. Les résultats obtenus ont été représentés graphiquement afin de déterminer les vitesses initiales par le calcul de la pente de chaque courbe, dans leur zone de linéarité. Les vitesses initiales ont finalement été portées en graphique, en fonction des concentrations de substrat pour permettre la détermination de la la constante de Michaelis-Menten. Ces analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels Grafit et Sigma Plot.

## 16.4 Zymogramme

Un zymogramme a été réalisé sur gel de polyacrylamide pour identifier la bande conférant l'activité β-xylosidasique. Pour réaliser un zymogramme, un gel de polyacrylamide contenant des ampholytes à gradient de pH 3 à 9 pour la focalisation isoélectrique a été utilisé. La suspension d'enzyme pure a été chargée sur le gel et la migration a été réalisée sur l'appareil Phastsystem<sup>TM</sup>. Dès que la migration était achevée, le gel était baigné dans une solution de 100 mM phosphate de sodium, pH 7,0 contenant du substrat MUX à 1 mM. Le tout a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Après ce temps d'incubation, le gel a été observé sous des rayons UV pour détecter la fluorescence. Le même traitement a été effectué avec du substrat MUG.

## 16.5 Profil d'hydrolyse d'oligosaccharides par la β-xylosidase

Cinquante  $\mu$ L de la préparation d'enzyme pure (23  $\mu$ g/mL) ont été incubés avec 50  $\mu$ L de chaque substrat (1 mM de X2, 1 mM de X3, 1 mM de X4, 1 mM de X5, 1 mM de C2, 1 mM de C4 et 1 mM de C5) à 40°C pendant quatre heures. La même expérience a été réalisée à la température de la pièce pendant 72 heures. Les échantillons ont été inactivés

67

à 95°C pendant cinq minutes. Cinquante µL de chaque échantillon ont été ensuite aliquotés et mis dans l'échantillonneur automatique Thermo Separation Products (SP). Vingt µL de chaque échantillon ont été injectés sur une colonne anionique CarboPac<sup>TM</sup> mesurant 4 x 250 mm. Cette colonne était reliée à l'appareil LC Chromatography Enclosure et au système de pompes GP40 Gradient Pump de DIONEX. La détection des carbohydrates a été effectuée par ampérométrie pulsée grâce au détecteur DIONEX ED40 Electrochemical Detector. Tous les appareils ont été intégrés au logiciel Peaknet. Avant la purification, la colonne CarboPac<sup>TM</sup> a été équilibrée avec du NaOH à 150 mM. Normalement, les sucres ne sont pas chargés mais une fois qu'ils sont injectés à la colonne, ils deviennent à l'état ionisé (chargés négativement) grâce à la présence du 150 mM NaOH dans la colonne. Par conséquent, les sucres chargés négativement restent accrochés à la colonne. Théoriquement, le temps de rétention des polysaccharides à haut poids moléculaires est plus long que celui des polysaccharides à faible poids moléculaires. Leur élution a été effectuée par gradient ascendant de tampon 500 mM acétate de sodium avec du NaOH à 150 mM et le débit était toujours maintenu à 1 mL/minute. Des standards tels que le xylose, glucose, X2, X3, X4, X5, G2, G4 et G5 à 1 mM ont été également injectés au HPLC de DIONEX et ont été utilisées pour des fins d'identification des produits de réactions d'hydrolyse.

Résultats

.

#### 1.0 Amplification élective in vitro du gène bxlA

Le gène bxlA codant pour la β-xylosidase fait partie d'une insertion nucléotidique de 3.1 kpb qui se trouve sur le plasmide pIAF2. Pour amplifier ce gène, le plasmide a d'abord été linéarisé au site de restriction unique Bam HI grâce à une digestion enzymatique. Le plasmide linéaire a été ensuite utilisé comme matrice pour l'amplification élective in vitro (PCR) du gène bxlA. La méthode du PCR est décrite à la section 7.1 de l'approche expérimentale. La première tentative a été d'amplifier la séquence complète du gène bxlA d'une longueur de 2,6 kpb. L'amplification par PCR a été effectuée à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques bordant le gène en insérant à chaque extrémité un site de restriction (Sph I et Bgl II). D'une part, l'oligonucléotide XyloSL5 a permis d'insérer un site de restriction Sph I à l'extrémité aminée. D'autre part, l'oligonucléotide Xylo3 a permis l'insertion du site de restriction Bgl II à l'extrémité carboxyle. Ces deux sites de restriction étaient nécessaires pour le clonage du gène bxlA dans le plasmide multi-copie pIJ702. Cependant, après de nombreux essais de PCR, aucun fragment d'ADN de grosseur attendue n'a été obtenu. Cette méthode, qui visait l'amplification du gène bxlA en entier (2,6 kpb), a donc été écartée et remplacée par une seconde approche. Celle-ci repose essentiellement sur l'existence d'un site de restriction naturel, Sac I, situé en plein milieu du gène bxlA. Grâce à ce site de restriction, il a été possible d'effectuer l'amplification du gène bxlA en deux étapes. D'une part, les amorces XyloSL5 et Xyl N3 ayant des sites de restriction Sph I et Sac I respectivement, ont été utilisées pour amplifier un fragment d'ADN de 1,1 kpb codant pour la portion aminée de BxlA. D'autre part, les amorces Xyl C5 et XyloSL3 possédant respectivement les sites de restriction Sac I et Bgl II-Eco RI ont été utilisées pour l'amplification d'un fragment de 1,5 kpb codant pour la portion carboxyle de BxlA. Les résultats du PCR ont été analysés sur un gel d'agarose 0,7% et montrent un amplicon de 1,1 kpb (Figure 7) et un amplicon de 1,5 kpb (Figure 8).



Figure 7. Photo d'un gel d'agarose 0,7% du fragment amplifié de 1,1 kpb. Le puits 1 représente le standard de masse moléculaire « 1Kb » de Gibco-BRL. Le puits 2 représente le fragment d'ADN de 1,1 kpb codant pour la partie aminée de BxIA. Ce fragment a été obtenu par PCR.



Figure 8. Photo d'un gel d'agarose 0,7% du fragment amplifié de 1,5 kpb. Le puits 1 représente le standard de masse moléculaire « 1Kb » de Gibco-BRL. Le puits 2 représente le fragment d'ADN de 1,5 kpb codant pour la partie carboxyle de BxlA. Ce fragment a été obtenu par PCR.

#### 2.0 Reconstruction du gène bxlA dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19

La reconstruction du gène bxlA en entier ne peut être effectuée directement dans le plasmide multi-copie pIJ702 car ce dernier possède un site de restriction Sac I situé en aval du site Bgl II. Par conséquent, les amplicons de 1,1 kpb et de 1,5 kpb ont été digérés avec les enzymes de restriction Sph I-Sac I et Sac I-Eco RI et clonés dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Il est important de souligner que le site de restriction Bgl II n'existe pas dans la cassette de clonage des vecteurs M13 mais que le site Eco RI est présent. C'est pourquoi l'enzyme Eco RI a été choisie pour cloner le fragment carboxyl de bxlA. Le gène bxlA a donc été reconstruit dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19 (Figure 9A). Des cellules compétentes d'E. coli DH11S ont été tranformées avec les vecteurs phagiques recombinants et ont été étalées sur du milieu H. Les transformants de couleur blanche ont été repiqués dans du milieu 2XTY afin de faire des préparations plasmidiques. Les plasmides isolés ont été ensuite digérés par les enzymes Sph I-Eco RI et les bandes d'ADN ont été séparées et analysées sur gel d'agarose 0,7% (figure 9B). Le gène bxlA reconstruit en pleine longueur dans le phage M13mp18 a été isolé du clone 31. En effet, le plasmide pIAF31 issu de ce clone porte l'insertion de 2,6 kpb (bxlA) isolée d'E.coli DH11S. Par ailleurs, l'ADN simple brin du clone 31 a été extrait et a été utilisé comme matrice pour le séquençage. Celui-ci a été effectué selon la méthode Sanger et al. (1977) et les données obtenues par le séquençeur ALF ont été analysées par le programme ALF Manager (IBM). Les résultats du séquençage ont démontré qu'il n'y avait pas d'erreur d'amplification du gène bxlA par PCR (résultats non montrés).



Figure 9. Reconstruction du gène bxlA

- A) Schématisation des étapes de la reconstruction de *bxlA* dans le phage M13mp18 et construction du plasmide pIAF31
- B) Photo de l'analyse des plasmides extraits des transformants d'E. coli DH11S suite à une digestion Sph I-Bgl II. Gel d'agarose 0,7%

#### 3.0 Sous-clonage de bxlA

#### 3.1 Sous-clonage de bxlA dans le vecteur multicopie pIJ702

Le gène bxlA, une fois reconstruit dans les phages M13mp18 et M13mp19, a été digéré aux sites de restriction Sph I-Bgl II et sous-cloné dans le plasmide multi-copie pIJ702 (Figure 10). Il est important de rappeler que le site de restriction Bgl II situé à l'extrémité 3' du gène bxlA a été inséré en même temps que les site de restriction Eco RI lors de amplification par PCR en utilisant l'amorce nucléotidique XyloSL3. Des protoplastes de S. lividans 10-164 ont été ensuite transformés avec le produit de sousclonage et étalés sur du milieu solide R5. Les transformants de coloration blanche ont été repiqués sur du milieu solide Bennett-thiostreptone. Après un à deux jours d'incubation à 34°C, les clones ont été vaporisés avec le substrat MUX et soumis aux rayons UV. Les clones qui avaient inséré le gène bxlA émettaient de la fluorescence tandis que ceux qui n'avaient pas inséré le gène n'en dégageaient pas. Le clone 13 ayant la plus forte fluorescence a été retenu et mis en culture liquide dans le milieu TSB (Figure 11). Après 24 à 48 heures d'incubation, le plasmide pIAF13 a été extrait et digéré aux sites de restriction Sph I et Bgl II. Les bandes ont été ensuite séparées et analysées sur gel d'agarose 0,7 % pour s'assurer de la présence du gène bxlA. D'après la figure 12, le gène bxlA est bien présent dans le plasmide pIAF13. En effet, deux bandes dont l'une à 5,68 kpb correspondant au plasmide pIJ702 et l'autre à 2,6 kpb (bxlA) ont été détectées sur le gel d'agarose.

#### 3.2 Clonage du promoteur pC109

Le plasmide pIAF13, dérivé du plasmide multi-copie pIJ702, contient le gène *bxlA* cloné aux sites de restriction *Sph* I et *Bgl* II. Le promoteur p*mel* permettant la transcription du gène *bxlA* est le même que celui du gène *mel* codant pour une tyrosinase. Par ailleurs, un autre plasmide dérivé du plasmide pIJ702, pC109 d'une longueur de 5269 pb contient

en amont du site de restriction *Sph* I, le promoteur pC109, qui est insensible à la répression catabolique causée par le glucose. La stratégie était d'entreprendre une digestion enzymatique aux sites *Sph* I-*Bam* HI du plasmide pIAF13 et du plasmide pC109. Le but était de cloner le promoteur pC109 en amont du gène bxlA situé dans plasmide pIAF13. Ainsi, suite à la digestion, le fragment *Sph* I-*Bam* HI de 1139 pb du plasmide pIAF13 était supprimé et remplacé par le fragment *Sph* I-*Bam* HI issu du plasmide pC109 contenant le promoteur pC109 (Figure 13). Des protoplastes de *S. lividans* 10-164 ont été ensuite transformées par le produit de clonage. Des colonies recombinantes ont été isolées et le criblage des clones positifs a été réalisé par vaporisation au MUX (Figure 14). Le clone IAF5 étant le plus fluorescent a été choisi et isolé. L'extraction du plasmide a permis de confirmer que le plasmide pIAF5 contenait bien le gène bxlA. En effet, le plasmide pIAF5 digéré aux sites de restriction *Sph* I-*Bgl* II montrait deux bandes suite à une migration sur gel d'agarose 0,7%: l'une correspondant à bxlA (2,6 kpb) et l'autre au plasmide de 5,68 kpb (Figure 15).



Figure 10. Construction du plasmide pIAF13. Le gène bxlA a été digéré aux sites de restriction Sph I et Bgl II et sous-cloné dans le vecteur multi-copie, pIJ702. Le plasmide pIAF13 dérive du plasmide pIJ702 et contient le gène bxlA



Figure 11. Vaporisation au MUX pour tester l'activité  $\beta$ -xylosidasique des transformants. Le gène *bxlA* a été extrait du plasmide pIAF31 et sous-cloné dans le vecteur pIJ702. Après transformation dans des protoplastes de *S. lividans*, des colonies recombinantes ont été repiquées sur du milieu Bennett-thiostreptone et vaporisées au MUX. Le clone 13 a été retenu à cause de sa forte fluorescence détectée sous les rayons UV.



Figure 12. Photo d'un gel d'agarose 0,7% représentant des bandes d'ADN obtenues suite une digestion enzymatique sur le plasmide pIAF13. Le puits 1 représente le standard de masse moléculaire « 1Kb » de Gibco-BRL. Les puits 2, 3, 4 et 5 représentent les bandes d'ADN obtenues suite à la digestion du plasmide pIAF13 aux sites de restriction *Sph* I-*Bgl* II. Les bandes à 2,6 kpb et à 5,68 kpb représentent le gène *bxlA* et le plasmide pIJ702 respectivement.



Figure 13. Construction du plasmide pIAF5. Les plasmides pIAF13 et pC109 ont été digérés aux sites de restriction *Sph* I-*Bam* HI. Le fragment digéré aux sites de restriction *Sph* I-*Bam* HI du plasmide pC109 contenant le promoteur pC109 a été cloné dans le plasmide pIAF13 amputé de son fragment *Sph* I-*Bam* HI. Ce dernier contenait le promoteur *p*mel. Le plasmide pIAF5 contient l'insertion du gène bxlA et en amont le promoteur *p*C109.



Figure 14. Vaporisation au MUX pour tester l'activité  $\beta$ -xylosidasique des transformants. Après le clonage du promoteur pC109 dans le plasmide pIAF13, les protoplastes de *S. lividans* ont été transformés et des colonies transformantes ont été ensuite repiquées sur le milieu Bennett-thiostreptone et vaporisées au MUX. Le clone IAF5 a été retenu à cause de son intense fluorescence détectée sous les rayons UV.



Figure 15. Photo d'un gel d'agarose 0,7% représentant des bandes d'ADN obtenues suite à une digestion enzymatique sur le plasmide pIAF5. Le puits 1 représente le standard de masse moléculaire « 1Kb » de Gibco-BRL. Le puits 4 représente les bandes d'ADN obtenues suite à la digestion du plasmide pIAF5 aux sites de restriction *Sph* I-*Bgl* II. Les bandes à 2,6 kpb et à 5,68 kpb représentent le gène *bxlA* et le plasmide contenant le promoteur pC109 respectivement.

#### 4.0 Production de l'enzyme

La souche IAF5 a été cultivée tout d'abord en milieu TBS pendant 24 heures. Par la suite, elle a été mise en culture à plus grande échelle (cinq litres) dans le milieu minimal M14 contenant du 1% glucose. Après 24 heures de culture, un échantillon a été prélevé et la suspension de protéines intracellulaires a été extraite. Des tests enzymatiques ont été effectués sur cette suspension mais aucune activité de la β-xylosidase n'a été détectée. Après 48 heures de culture, un autre échantillon de protéines intracellulaires a été extrait et analysé sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) 12,5%. Les résultats montrent une bande majeure à 90 kDa correspondant à la protéine BxlA (Figure 16A, puits 5). Après 72 heures de culture, un nouvel échantillon de protéines intracellulaires a été extrait et analysé sur gel de SDS-PAGE 12,5%. La bande majeure de 90 kDa qui était présente après 48 heures d'incubation n'était plus là (Figure 16B). Cela signifiait que l'expression de la protéine BxIA était à son maximum après 48 heures de culture (0,310 UI après 48 heures comparativement à 0,017 UI après 24 heures et 0,134 UI après 72 heures d'incubation) (Tableau 7). Cette même expérience a été répétée à plusieurs reprises mais les résultats n'étaient pas reproductibles. En effet, la souche IAF5, après quelques temps, ne produisait plus la protéine BxlA en présence du glucose. La figure 17 montre des échantillons de protéines intracellulaires extraits après 48 heures de culture en milieu M14 contenant 1% glucose sur un gel de SDS-PAGE 12,5%. Aucune bande majeure n'était présente à 90 kDa. En revanche, quand la souche IAF5 a été mise en présence de xylose (1%), une source de carbone neutre, de l'activité  $\beta$ -xylosidasique a été détectée (Figure 17, puits 5).

#### 5.0 Isolement de l'enzyme

#### 5.1 Récupération du mycélium

Après 48 heures d'incubation, la culture a été centrifugée afin de récupérer le mycélium. Un échantillon du surnageant du milieu de culture a été gardé pour effectuer des tests enzymatiques. Celui-ci n'a révélé aucune activité β-xylosidasique. La protéine

BxIA étant intracellulaire, a été extraite du mycélium. Le mycélium a été lavé au moins trois fois avec du tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7,0 avant d'être resuspendu dans un volume minimal du même tampon. Une tablette de mélange d'inhibiteurs de protéases y a été ajouté et la solution a été amenée à 1 mM DTT.

Tableau 7 Données représentant l'activité enzymatique et l'activité spécifique de la protéine BxlA ainsi que la quantité de protéines totales. Ces données sont exprimées en UI, en UI/mg et en mg respectivement après 24, 48 et 72 heures de culture.

| TEMPS DE CULTURE (HEURES)                             |       |       |       |  |  |  |  |  |
|---|-------|-------|-------|--|--|--|--|--|
|   | 24    | 48    | 72    |  |  |  |  |  |
| Activité enzymatique<br>de BxIA (UI)                  | 0,017 | 0,310 | 0,134 |  |  |  |  |  |
| Quantité de protéines<br>(mg)                         | 0,286 | 0,830 | 1,152 |  |  |  |  |  |
| Activité spécifique de<br>la protéine BxlA<br>(UI/mg) | 0,059 | 0,373 | 0,117 |  |  |  |  |  |



A)

B)

Figure 16. Comparaison des échantillons de protéines intracellulaires sur gel de SDS-PAGE 12,5%. Dans les deux cas, les échantillons ont été extraits par la presse de French. Le gel A représente les protéines intracellulaires extraites après 48 heures de culture. Le puits 1 représente le standard de poids moléculaires (LMW). Le puits 2 représente un échantillon issu du milieu extracellulaire (ou milieu de culture). Le puits 3 montre un échantillon de protéines intracellulaires obtenu après un seul passage à la presse de French, le puits 4, après 2 passages à la presse de French et le puits 5, après 3 passages à la presse de French. Le gel B représente les protéines intracellulaires extraites après 72 heures de culture. Le puits 1 représente le standard de poids moléculaires (LMW). Les puits 2 et 3 représentent l'échantillon de protéines intracellulaires obtenu après le 3<sup>ième</sup> passage à la presse de French. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie.



Figure 17. Analyse des échantillons de protéines intracellulaires sur gel de SDS-PAGE 12,5% coloré au bleu de Coomassie. Le puits 1 contient le standard de poids moléculaires (LMW). Les puits 2, 3 et 4 représentent différentes concentrations d'échantillons de protéines intracellulaires obtenus après 48 heures de culture dans un milieu M14 contenant 1% de glucose. Le puits 5 montre l'échantillon de protéines intracellulaires obtenu après 48 heures de culture ans un milieu M14 contenant 1% de glucose.

#### 5.2 Extraction de la protéine BxIA intracellulaire

Au cours de ce projet, plusieurs techniques ont été expérimentées pour briser le mycélium. La première technique utilisée a été la sonication (sonicator Ultrasonic Processor, Heatsystem, modèle XL 2020). Malheureusement, celle-ci n'a pas permis la désintégration de grandes quantités de suspension. La seconde technique employée pour la désintégration des cellules a été la presse de French. La suspension a été mise dans un bain de glace et l'appareillage était conservé préalablement à 4°C avant son utilisation. Il a été possible de passer environ 40 à 50 mL de suspension à la fois. Après trois passages à la presse de French, une grande proportion de cellules a été cassée. L'analyse des surnageants intracellulaires sur SDS-PAGE à différents stades de cassage est illustrée à la figure 16A. Le tableau 8 compare l'efficacité de désintégration du mycélium par la sonication et par la presse de French. D'après les résultats du tableau, il était clair que la sonication n'était pas efficace pour briser les cellule par rapport à la presse de French. L'activité enzymatique n'était que de 0,176 UI comparativement à 0,347 UI par la presse de French.

Tableau 8. Comparaison de l'activité enzymatique (UI) obtenue après désintégration du mycélium par la technique de sonication (pendant 5 minutes) et la presse de French (après 3 <sup>ième</sup> passage).

| Techniques utilisées                                     | Activité enzymatique (UI) représentant le degré de désintégration du mycélium |  |  |
|--|---|--|--|
| Sonication (pendant 5 minutes)                           | 0,176   |  |  |
| Presse de French (après le 3<br><sup>ième</sup> passage) | 0,347   |  |  |

#### 6.0 Mise au point des méthodes de purification

## 6.1 Purification par chromatographie à échangeur ionique

En gardant toujours l'aspect d'instabilité de l'enzyme en considération, un schéma de purification qui comporte le moins de manipulations possibles a été adopté. Il était primordial de choisir une approche de purification qui permettait de préserver l'activité de l'enzyme tout en permettant d'obtenir un degré de pureté satisfaisant. Avant tout, il a fallu développer un système de purification qui soit efficace et rapide. Sachant que le point isoélectrique théorique de la β-xylosidase était de 6,09, l'option de purifier par chromatographie à échangeur ionique a été choisie. En premier lieu, les conditions optimales de purification de la β-xylosidase devaient être déterminées avant d'opérer sur une colonne à échangeur ionique reliée à un système de HPLC. La membrane cationique S 15 chargée positivement et la membrane anionique Q 15 chargée négativement ont été utilisées. Dans les fractions non retenues qui ont été récoltées suite au passage à travers la membrane cationique (S 15), de l'activité β-xylosidasique a été détectée. Par contre, aucune activité n'a été observée dans les fractions non retenues suite au passage dans la membrane anionique (Q 15). Cela signifiait que l'enzyme était restée accrochée à la membrane Q 15 en se liant au groupement fonctionnel d'ammonium. L'élution de l'enzyme a été réalisée par un gradient ascendant de NaCl (0 à 1 M). Des tests enzymatiques au pNPX ont été effectués sur les fractions récoltées afin d'établir avec précision le moment où la protéine BxlA commençait à se détacher de l'échangeur ionique. BxIA s'était détachée de la membrane anionique à une concentration de NaCl qui se situait entre 0,6 M à 0,7 M (Figure 18). La suspension enzymatique comprenait de multiples protéines intracellulaires ayant chacune un pl différent. Afin de déterminer le pl de chaque protéine, il était possible de recourir à la focalisation isoélectrique (IEF) par la méthode automatisée du Phastsystem. Or, les résultats de la figure 19 ont montré que toutes les protéines de la suspension intracellulaire avaient un pl acide similaire. Par conséquent, une séparation de ces protéines par la chromatographie à échangeur ionique ne pourrait être efficace. Une approche différente de purification a donc été adoptée.



Figure 18. Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la purification de la protéine BxlA sur la membrane anionique, Q15 de Sartorius. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Le puits 2 représente le standard de poids moléculaire (LMW). Le puits 1 montre l'échantillon de protéines intracellulaires à l'état brut c'est-àdire avant purification. Les fractions qui n'ont pas été retenues par la colonne sont représentées dans le puits 3. Les puits 4 à 9 et 10 montrent les fractions éluées à 0,1 M, 0,7 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M et 0,8 M de NaCl respectivement.



Figure 19. Détermination du point isoélectrique de l'extrait brut par focalisation isoélectrique (IEF) sur gel de polyacrylamide. Le gel contient des ampholytes d'un gradient de 3 à 9 et a été coloré au nitrate d'argent. Le standard de pl est montré au puits 3. Les puits 1, 2, 4 et 5 représentent l'échantillon de protéines intracellulaires brut c'est-àdire avant purification.

# 6.2 Purification de la $\beta$ -xylosidase par chromatographie à interactions hydrophobiques

La chromatographie à interactions hydrophobiques a été le choix alternatif. Pour développer un système de purification à interactions hydrophobiques, des essais préliminaires ont été effectués. Cinq colonnes de la trousse « HiTrap<sup>TM</sup> HIC» de Pharmacia Biotech (1 mL) comprenant trois groupements fonctionnels (phényl, butyl et octyl) ont été utilisées. De l'activité  $\beta$ -xylosidasique a été détectée dans toutes les colonnes au niveau des fractions non retenues à l'exception de la colonne phényl sépharose High Performance (HP). L'élution des protéines a été effectuée par un gradient descendant de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 à 0 M) sur la colonne phényl sépharose HP. La figure 20 (puits 2 et 7) montre que la  $\beta$ -xylosidase a été éluée à une concentration de 0,1 à 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Figure 20. Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la purification de la protéine BxIA sur la colonne phényl sépharose HP de la trousse « Hi-Trap HIC ». Le puits 5 montre le standard de poids moléculaires (LMW). Les puits 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 représentent les fractions éluées à 0,2 M, 0 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,8 M, 0,1 M et 0,9 M de ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

#### 7.0 Purification de l'enzyme produite à grande échelle

## 7.1 Chromatographie sur colonne à interactions hydrophobiques par FPLC

La protéine BxIA a été purifiée sur une colonne hydrophobique de phényl sépharose HP par FPLC. Après le passage de l'extrait brut sur la colonne, les fractions non retenues ont été récoltées et analysée avec le pPNX pour s'assurer qu'il n'y avait aucune activité β-xylosidasique. La figure 21 montre les fractions positives testées au pNPX qui ont été analysées sur un gel de SDS-PAGE 12,5%. D'après cette figure, la protéine BxlA s'était détachée de la colonne phényl sépharose HP à une concentration de 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figure 21B, puits 4, 5, 6 et 7). Ces résultats démontraient aussi que l'enzyme était très bien retenue à la colonne. Les fractions éluées ont été ensuite réunies et l'activité enzymatique ainsi que le contenu en protéines ont été déterminés. L'activité spécifique (activité enzymatique totale/ quantité de protéines totale) a été déterminée suite à ces calculs. Le tableau 9 illustre ces données : l'activité totale brute avant purification était de 530 UI. Il y avait, dans cet extrait brut, 480 mg de protéines totales et l'activité spécifique calculée était de 1,104 UI/mg. Après purification par chromatographie à interactions hydrophobiques, l'activité totale et la quantité de protéines totales ont diminué à 370 UI et à 106 mg respectivement. Par contre, l'activité spécifique de l'enzyme a augmenté jusqu'à 3,491 UI/mg et le facteur de purification a passé de 1 à 3,2.

Tableau 9. Résumé des différentes étapes de purification de la protéine BxlA. Pour chaque étape (extrait brut, purification sur la colonne phényl sépharose HP et tamis moléculaire), l'activité totale de l'enzyme (UI), la quantité de protéines totales (mg), l'activité spécifique de l'enzyme (UI/mg) et le facteur de purification ont été déterminés.

| Étapes de<br>purification | Activité totale<br>(UI)       | Protéines (mg) | Activité<br>spécifique<br>(UI/mg) | Facteur de purification |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Extrait brut              | 530                           | 480            | 1,10                              | 1                       |
| Phényl<br>sépharose HP    | 370                           | 106            | 3,49                              | 3,2                     |
| Tamis<br>moléculaire      | Rétentat 1 : 21               | 8              | 2,63                              | 2,4                     |
|                           | Rétentat 2 : 305              | 21             | 14,52                             | 13,2                    |
|                           | Total des 2<br>rétentats: 326 | 29             | 17,15                             | 15,5                    |

# Activité spécifique (UI/mg) : Activité enzymatique totale Quantité de protéines totales

Facteur de purification : <u>Activité spécifique pour chaque étape de purification</u> Activité spécifique de l'extrait brut


Figure 21. Analyse sur gel de SDS-PAGE 12,5% des fractions récoltées suite à la purification par FPLC de la protéine BxlA sur la colonne phényl sépharose HP. Dans le gel A, le standard de poids moléculaires (LMW) est montré au puits 2. Le puits 1 contient l'échantillon de protéines intracellulaires brut (i.e avant purification). Les puits 3 à 10 montrent des fractions éluées lors du gradient descendant de 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dans le gel B, le standard de poids moléculaire est montré dans le dernier puits (10). Les puits 1, 2, 3, 8 et 9 présentent des fractions éluées lors du gradient descendant de 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les puits 4, 5, 6 et 7 montrent des fractions éluées à 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

### 7.2 Ultrafiltration

Les fractions qui avaient présenté une activité  $\beta$ -xylosidasique à l'étape précédente ont été concentrées par ultrafiltration sur des membranes PM 10 dans une cellule Amicon. En utilisant ces membranes, certaines impuretés et des peptides à poids moléculaires inférieurs à 10 kDa ont été éliminés. Une fois que l'échantillon a été réduit jusqu'à 2 mL, des tests enzymatiques ont été effectués pour s'assurer de la présence de l'enzyme dans le rétentat. Aucune activité n'a été détectée dans le filtrat. En fait, toute l'activité enzymatique était retrouvée dans le rétentat (résultats non montrés).

# 7.3 Purification sur tamis moléculaire

Avant d'être purifié sur un tamis moléculaire avec une colonne Superdex HR-200, le rétentat obtenu lors de l'ultrafiltration a été d'abord filtré. La filtration de l'échantillon était importante car elle éliminait toutes les particules pouvant obstruer le passage normal du tampon (constitué de phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0 + DTT 1 mM) à travers la colonne pendant la purification. Le tamis moléculaire sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Les petites protéines sont retenues à l'intérieur des billes poreuses de la résine pendant que les grosses protéines sont libérées de la colonne. Des fractions de trois mL ont été recueillies et testées au pNPX afin de localiser l'enzyme. Un gel de SDS-PAGE 12,5% a été effectué pour vérifier le degré de pureté des fractions positives (Figure 22A). Il a été possible d'observer une bande de 90 kDa correspondant à la  $\beta$ -xylosidase sur toutes ces fractions. La figure 22B montre cependant des fractions positives présentant deux bandes majeures (90 et 70 kDa). Par conséquent, les fractions de la figure 22A ont été réunies et concentrées sur une membrane Amicon PM 10. Le rétentat obtenu a été nommé rétentat 1. La même opération a été effectuée avec les fractions de la figure 22B (puits 1 à 7). Le rétentat obtenu a été appelé rétentat 2. Par la suite, l'activité enzymatique et le dosage de protéines pour chaque rétentat ont été calculés afin de déterminer leur activité spécifique. Les résultats ont été résumés dans le tableau 9. L'activité enzymatique et la quantité de protéines totales du rétentat 1 étaient de 21 UI et de 8 mg respectivement.

La valeur de l'activité spécifique calculée n'était donc que de 2,625 Ul/mg. Par contre, pour ce qui est du rétentat 2, l'activité enzymatique était de 305 UI totale et il contenait 21 mg de protéines totales. L'activité spécifique était calculée à 14,524 UI/mg. Par conséquent, l'activité du rétentat 2 était largement supérieure à celle du rétentat 1.

Un test d'isoélectrofocalisation (IEF) a été effectué pour vérifier d'une part, le pI de la  $\beta$ -xylosidase et d'autre part, le degré de pureté du rétentat 2 (issu des fractions de la figure 22B). Ceci était possible car le gel de polyacrylamide contenant des ampholytes (gradient de pH 3 à 9), ne contenait aucun agent dénaturant et la coloration était accomplie par le nitrate d'argent qui donnait une meilleure détection de bandes. Trois faibles bandes y apparaissaient sur le gel (puits 1 de la figure 23).



Figure 22. Analyse sur gel SDS-PAGE 12,5% des fractions purifiées sur tamis moléculaire. Dans le gel A, le puits 7 contient le standard de poids moléculaires (LMW). Les puits 1 à 6, 8 et 9 représentent les fractions récoltées suite à la purification. Une bande majeure est visible à 90 kDa. Dans le gel B, le puits 8 montre le standard de poids moléculaires (LMW). Les puits 1 à 7 et 9 représentent les fractions récoltées suite à la purification. Deux bandes majeures sont visibles à 90 kDa et 70 kDa. La coloration des gels a été effectuée au bleu de Coomassie.

B)



Figure 23. Détermination du point isoélectrique par focalisation isoélectrique (IEF) des échantillons de protéines intracellulaires obtenus à différents stades de purification sur gel de polyacrylamide. Ce gel contient des ampholytes d'un gradient de pH 3 à 9 et a été coloré au nitrate d'argent. Le puits 3 montre le standard de pI. Les échantillons de protéines intracellulaires obtenus suite à la purification sur la colonne phényl sépharose HP sont retrouvés dans les puits 4 et 5. Les puits 1 et 2 représentent les échantillons de protéines intracellulaires obtenus après l'étape du tamis moléculaire et de l'ultrafiltration respectivement.

#### 8.0 Caractérisation de la protéine BxIA

Pour la caractérisation de la protéine BxlA, plusieurs paramètres ont été analysés : la température optimale, le pH optimal, les constantes de cinétique de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>) et le patron d'hydrolyse des substrats par la protéine BxlA.

#### 8.1 Température optimale de la protéine BxIA

Les tests d'activité ont été effectués en utilisant le substrat pNPX à différentes températures. L'activité enzymatique (UI) a été exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale obtenue. L'hydrolyse de l'enzyme a été maximale à 40°C (Figure 24).

# 8.2 pH optimal de la protéine BxIA

L'enzyme a été incubée avec du *p*NPX à la température optimale (40°C) et à différents pH. L'activité a été exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale. Aucune valeur de pH optimal n'a pu être déterminée à partir du graphique de la figure 25. La purification partielle de la protéine pourrait être à l'origine de ce phénomène. Toutes les autres étapes de caractérisation ont donc été effectuées à pH neutre (7).

# 8.3 Détermination du Km et du Vmax

La constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) a été déterminée à des concentrations de *p*NPX variant entre 0,25 et 10 mM. Le K<sub>m</sub> obtenu est de 0,70  $\pm$  0,01 mM et le V<sub>max</sub> est de 0,007 (Figure 26).



Figure 24. Représentation de l'activité enzymatique de BxlA (%) en fonction de la température (°C). Ce graphique permet de déterminer la température optimale de la protéine BxlA.



Figure 25. Représentation de l'activité enzymatique (%) de BxIA en fonction du pH. Ce graphique permet de déterminer le pH optimal de la protéine BxIA.



Figure 26. Courbe de Michaelis-Menten représentant les vitesses initiales ( $V_o$ ) en fonction de la concentration du substrat *p*NPX (mM). Cette courbe permet de déterminer le K<sub>m</sub> et le  $V_{max}$ .

La figure 27 montre deux gels de polyacrylamide contenant des ampholytes à gradient de pH 3 à 9 pour la focalisation isoélectrique. La préparation d'enzyme pure (rétentat 2) a été chargée sur ces deux gels et un zymogramme a été ensuite réalisé avec du MUX et du MUG. Les résultats de la figure 27A montre qu'en présence de MUX, il apparaissait une bande d'activité fortement fluorescente à un pI approximatif de 6. Cette bande correspond à BxlA dont le pI théorique était estimé à 6,09. Par contre, en présence de MUG, aucune activité n'a été détectée (Figure 27B).

#### 8.5 Profils d'hydrolyse

La spécificité de l'enzyme a été analysée à l'aide du HPLC de DIONEX qui détecte les polysaccharides par ampérométrie pulsée. Les résultats de la figure 28 ont démontré que la protéine BxIA libérait du xylose à partir du X2 après une incubation de 4 heures à 40°C et surtout après 72 heures, à la température de la pièce : après 4 heures d'ncubation à 40°C, seulement 30% de xylose a été relâché. Par contre, après 72 heures d'incubation à la température de la pièce, 100% de X2 a été hydrolysé par BxIA. Le xylose résultait également de l'hydrolyse de X3 mais l'activité de la protéine BxIA sur ce substrat était plus lent. En effet, la figure 29 illustre la réaction d'hydrolyse de X3 par BxIA. Des résidus de X3 et de X2 étaient encore présents, ce qui prouvaient que l'hydrolyse de X3 n'a pas été complète. Seulement environ 8% de xylose a été libéré après 4 heures de réaction à 40°C avec BxIA. Aussi, à partir de X3, 10% de X2 a été dégradé à 40°C. A l'inverse, à une incubation de 72 heures à température plus basse, on obtient plus de 85% de xylose. Pour ce qui est de la dégradation des xylotétraoses et des xylopentaoses (Figures 30 et 31), celle-ci est lente à la température de la pièce pendant 72 heures et davantage à 40°C pendant 4 heures d'incubation. En fait, l'activité de la protéine BxIA ralentissait en fonction de l'augmentation du degré de polymérisation des xylooligosaccharides. Par conséquent, BxIA ne possédait qu'une faible activité sur le X4 et X5

malgré l'incubation prolongée de 72 heures à la température de la pièce. Dans tous les cas, la dégradation des substrats après une incubation de 72 heures à la température ambiante semblait plus efficace qu'une incubation de 4 heures à la température optimale. D'après la figure 30, on a obtenu environ 10% de X3 et de X1 après 4 heures de réaction  $(40^{\circ}C)$  et, le X2 a été à peine détectable. Après 72 heures d'incubation à la température de la pièce, 30% de X3, moins de 1% de X2 et 20% de xylose ont été produits. Quant à la dégradation du X5 par BxIA (figure 31), celle-ci a été quasiment inexistante à 40°C (4 heures). En revanche, après 72 heures d'incubation, 20% de X4 et 25% de xylose ont été produits. Toutefois, aucun produit d'hydrolyse n'a pu être détecté des cellooligosaccharides (Figures 32 et 33). Ainsi, la protéine BxIA ne possède aucune activité envers ces substrats et donc, est inapte pour les dégrader. D'après ces résultats, la protéine BxIA se comporte exactement comme une  $\beta$ -xylosidase et non comme une  $\beta$ -glucosidase.



Figure 27. Zymogramme sur un gel de polyacrylamide pour détecter les bandes ayant une activité  $\beta$ -xylosidasique (bandes fluorescentes). Le gel A a été vaporisé au MUX. Le puits 3 contient le standard de pI. Les puits 1, 4 et 5 représentent le échantillons de protéines intracellulaires purifiés au tamis moléculaire. Le gel B a été vaporisé au MUG. Le standard de pI est retrouvé dans le puits 3. Les puits 1, 4 et 5 représentent le échantillons de échantillons de protéines intracellulaires purifiés au tamis moléculaire.



A)

Figure 28 . Profil d'hydrolyse de X2 par la protéine BxlA en fonction du temps après une incubation de A) 4 heures à la température optimale de BxlA ( $40^{\circ}C$ )

B)

de B) 72 heures à la température de la pièce

La quantité de X1 (xylose) et de X2 a été mesurée en nC (nanoCoulombs). Le pic « Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).



Figure 29. Profil d'hydrolyse de X3 par la protéine BxlA en fonction du temps après une incubation de A) 4 heures à la température optimale de BxlA (40°C)

de B) 72 heures à la température de la pièce

La quantité de X1 (xylose), de X2 et de X3 a été mesurée en nC. Le pic « Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).



Figure 30. Profil d'hydrolyse de X4 par la protéine BxlA en fonction du temps après une incubation de A) 4 heures à la température optimale de BxlA (40°C)

de B) 72 heures à la température de la pièce

La quantité de X1 (xylose), de X2, de X3 et de X4 a été mesurée en nC. Le pic « Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).

B)



Figure 31. Profil d'hydrolyse de X5 par la protéine BxlA en fonction du temps après une incubation de A) 4 heures à la température optimale de BxlA ( $40^{\circ}$ C)

de B) 72 heures à la température de la pièce

La quantité de X1 (xylose), de X2, X3, X et X5 a été mesurée en nC. Le pic «Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).

B)



B)

Figure 32. Profil d'hydrolyse de G2 par la protéine BxlA en fonction du temps après une incubaion de A) 4 heures à la température optimale de BxlA (40°C)

de B) 72 heures à la température de la pièce

La quantité de G2 a été mesurée en nC. Le pic « Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).







La quantité de G4 et de G5 a été mesurée en nC. Le pic « Gly » représente le glycérol qui était présent dans les échantillons au moment de l'injection au HPLC (DIONEX).

112

Discussion

De nombreux protocoles portant sur l'expression et la purification de la  $\beta$ xylosidase dans un système bactérien ont été publiés. Cependant, les différentes méthodes utilisées dans les publications nécessitent généralement plusieurs étapes de purification. Or, un long protocole de purification peut entraîner une perte complète de l'activité enzymatique. Par conséquent, dans le cadre de ce projet, nous avons voulu développer un schéma de purification simple et rapide permettant d'obtenir une bonne quantité d'enzyme pure et active pour des fins de caractérisation.

Plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation du xylane et de la cellulose ont été clonés de facon homologue dans le vecteur d'expression à copie multiple, pIJ702 afin de sur-exprimer le gène et de faciliter la récupération de l'enzyme. Une abondance d'enzyme dans le milieu facilite également sa purification. Ce fut entre autres le cas de l'arabinofuranosidase B (AbfB) purifiée par Vincent *et al.* (1997) et des xylanases (Morosoli *et al.*, 1986; Kluepfel *et al.*, 1990).

En se basant sur la séquence du gène bx/A déterminée par Larocque en 1997, deux oligonucléotides XyloSL5 et Xylo3 ont été synthétisés pour l'amplification par PCR du gène bx/A d'une longueur de 2600 b. Deux sites de restriction enzymatique (*Sph* I et *Bgl* II) ont été insérés à chaque extrémité afin de permettre le clonage du gène dans le vecteur d'expression pIJ702. Malheureusement, les tentatives pour amplifier ce gène en entier n'ont pas fonctionné. La séquence du gène était trop « longue » pour permettre d'obtenir une amplification complète et spécifique. Une seconde approche, soit d'amplifier le gène bx/A en 2 étapes grâce à la présence du site de restriction naturel, *Sac* I, au milieu du gène a été entreprise avec succès. La reconstruction du gène a été ensuite effectuée dans les phages M13 car il a été impossible de le reconstruire dans le plasmide pIJ702 aux sites de restriction *Sac* I situé en aval du site de restriction *Bgl* II et qu'il existe un site de restriction *Sac* I dans la séquence du gène bx/A. Ainsi, pour la réalisation de la deuxième approche, deux oligonucléotides XyloSL5 et XylN3 on été produits avec l'insertion de deux sites de restriction (*Sph* I et *Sac* I) pour amplifier le fragment de 1,1 kpb codant pour

r

la portion aminée de BxIA. Les oligonucléotides XyIC5 et XyIoSL3 contenant les sites de restriction *Sac* I et *Bgl* II-*Eco* RI ont été utilisés pour amplifier la portion carboxylique de BxIA d'une longueur de 1,5 kpb. Il est important de noter la présence du site de restriction *Eco* RI, qui était nécessaire puisque le site de restriction *Bgl* II n'existe pas dans la cassette de clonage des phages M13. Le clonage du fragment de 1,1 kpb codant pour la partie aminée de BxIA aux sites de restriction *Sph* I et *Sac* I a été effectué sans problème dans les phages M13. Par contre, le clonage du fragment de 1,5 kpb codant pour la partie carboxyle de BxIA s'est révélé plus difficile à cause de l'emplacement des sites de restriction *Sac* I-*Eco* RI qui sont situés côte à côte. Cependant, après quelques reprises, le clonage de ce fragment a fonctionné. Par la suite, le gène *bxIA* a été reconstruit et sous-cloné dans le vecteur multi-copie pIJ702 aux sites de restriction *Sph* I et *Bgl* II. Il est reconnu que l'expression des gènes dans ce vecteur multi-copie est très avantageuse pour la production des enzymes. En effet, une sur-expression a été remarquée lors du clonage de différents gènes dans ce plasmide (Arcand *et al.*, 1993; Manin *et al.*, 1994).

Les gènes de nombreux microorganismes produisant des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques, dont ceux de *S. lividans*, sont sous le contrôle de la répression catabolique exercée par le glucose. En effet, l'addition de 1% de glucose dans le milieu de culture réprime complètement la synthèse de toutes les enzymes du système cellulolytique et xylanolytique. Des études entreprises par Flores *et al.* (1996) ont montré que l'introduction des substrats tel que le MBX ( $\beta$ -méthyl-xylopyranoside), un analogue du xylobiose ou d'une source de carbone neutre, tel que le xylose, pouvaient induire la synthèse des xylanases et de  $\beta$ -xylosidases. Par conséquent, pour assurer la production de la  $\beta$ -xylosidase, nous devions éviter d'utiliser le glucose. Cependant, pour contourner le problème de répression catabolique, nous avons cloné en amont du gène *bxlA*, le promoteur pC109. Ce promoteur muté, provenait du gène de la xylanase C et avait la propriété d'être insensible à la répression catabolique causée par le glucose. Ainsi, l'utilisation de ce promoteur nous a permis d'observer une excellente production de la protéine BxIA sur des gels de SDS-PAGE 12,5% quand celle-ci a été produite dans un milieu de culture contenant du glucose 1%. Cependant, il a été difficile par la suite de reproduire ces résultats : après quelques temps, la répression catabolique causée par le glucose est réapparue. Nous avons alors mis en culture cette même souche en présence de xylose (1%) et aucune répression catabolique causée par ce substrat n'a été observée.

Tel que constaté par plusieurs auteurs (Mihoc et Kluepfel, 1990; Heupel et al., 1993; Perez-Pons et al., 1994; Vroemen et al., 1995), la sonication était la méthode la plus efficace pour briser les cellules. Elle a donc été le premier moyen employé pour casser le mycélium. Toutefois, l'utilisation de cette méthode s'est révélée fastidieuse car elle ne permettait pas la désintégration d'un grand volume de mycélium ni de sa désintégration complète. En effet, après cinq minutes de cassage, seulement 30% du mycélium avait été brisé. Comme le mycélium était très difficile à briser, l'appareil de sonication a été employé pendant de longs moments, ce qui a occasionné un dégagement de la chaleur. Cette chaleur était néfaste pour l'enzyme et ce, même si l'échantillon était conservé dans un bain de glace. Comme les essais de désintégration du mycélium effectués avec l'appareil de sonication n'étaient pas satisfaisants, une autre méthode a dû être utilisée : la presse de French. L'utilisation de la presse de French comportait plusieurs avantages : d'une part, elle permettait la désintégration d'un grand volume d'échantillon à la fois (40 à 50 mL) et d'autre part, elle empêchait la dénaturation de l'échantillon enzymatique par la chaleur. La presse de French a permis d'obtenir un meilleur degré de désintégration du mycélium que la sonication.

L'extrait enzymatique brut a été conservé pendant 24 heures à 4°C. L'extrait a perdu plus de 50% de son activité après ce temps d'incubation. Cette perte d'activité serait attribuée à la présence de protéases libérées lors de la désintégration cellulaire et ce, malgré l'ajout du PMSF dans l'extrait enzymatique. L'inefficacité du PMSF serait due au fait que son action est dirigée spécifiquement contre les sérines protéases pendant une période de temps très courte (60 minutes). Pour remédier à ce problème, un mélange de plusieurs inhibiteurs de protéases a été dissous dans l'échantillon protéique intracellulaire. Contrairement au PMSF, ce mélange agit sur plusieurs types de protéases (contre les sérines protéases, les cystéines et des métalloprotéases). Certains de ces inhibiteurs ont

même une action irréversible contre plusieurs protéases. Leur présence a donc permis de stabiliser quelque peu l'enzyme.

Mihoc et Kluepfel (1990) ont réussi aussi à stabiliser une β-glucosidase intracellulaire en ajoutant 10% de glycérol dans la préparation enzymatique. Cet ajout leur a permis de maintenir efficacement l'activité enzymatique. Or, il a été impossible dans notre situation d'ajouter du glycérol à notre échantillon car celui-ci devait être ensuite injecté dans les colonnes de chromatographie. Malheureusement, le glycérol a tendance à s'accrocher fermement à la résine et il est très difficile de l'enlever par la suite lors de la régénération de la résine. Pour obtenir une enzyme pure et active, il a fallu mettre au point un schéma de purification nécessitant le moins d'opérations possibles en se basant essentiellement sur la chromatographie à interactions hydrophobiques, l'ultrafiltration et le tamis moléculaire. Idéalement, les étapes de purification devaient s'effectuer à basse température (4°C), ce qui n'était pas notre cas car les appareils de HPLC et FPLC étaient installés à la température de la pièce. Au départ, la protéine BxlA devait être purifiée par chromatographie à échangeur ionique sur HPLC. Des tests préliminaires ont été entrepris pour déterminer le type d'échangeur (anionique ou cationique) compatible avec la protéine BxIA. De l'activité enzymatique a été tout de suite détectée dans les fractions non retenues de la membrane cationique (S 15). Ces résultats ont démontré rapidement que la colonne cationique n'était pas appropriée pour purifier la protéine BxIA. Par contre, dans les fractions non retenues de la membrane anionique (Q 15), aucune activité n'a été présente. Cela signifiait que l'enzyme était accrochée sur l'échangeur anionique. Toutefois, un test IEF de l'échantillon intracellulaire brut montrait que celui-ci ne contenait que des protéines de nature acide qui avaient des valeurs de pl similaires. Par conséquent, la séparation des protéines par chromatographie à échangeur ionique a été rejetée.

La protéine BxlA a donc été purifiée par chromatographie à interactions hydrophobiques suivie du tamis moléculaire et ce, en moins de 24 heures afin d'éviter les pertes d'activité. D'abord, l'enzyme a été séparée sur la colonne phényl sépharose HP à une concentration de 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les résultats obtenus suite à l'injection dans la colonne hydrophobique (Figure 21 de la section des résultats) démontraient que l'enzyme a été très bien retenue à la colonne. Suite à la purification sur FPLC, l'enzyme a été injectée à la colonne Superdex 200 HR. L'enzyme a été ensuite conservée dans 50% de glycérol à -20 °C, permettant ainsi de préserver toute l'activité de la protéine BxIA. À cette concentration élevée de glycérol, l'extrait enzymatique pur n'était pas congelé à -20 °C et donc, n'était pas sujet aux problèmes de gel-dégel qui sont très néfastes pour les protéines.

La préparation d'enzyme pure obtenue suite à l'application sur tamis moléculaire a été analysée sur un gel de SDS 12,5%. Les analyses ont montré la présence d'une bande de 90 kDa et de quelques bandes à faible intensité qui sont probablement le résultat de dégradation de protéines produite lors de la concentration sur membrane Amicon. Afin de vérifier le degré de pureté de la préparation enzymatique, un test IEF a été réalisé en utilisant un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et non réductrices (i.e. sans SDS ni de  $\beta$ -mercaptoethanol). Les résultats montraient que l'enzyme n'était pas tout à fait pure. En fait, il était possible d'observer la présence de deux autres bandes. Malgré cette impureté, la préparation enzymatique purifiée a été caractérisée au niveau de son pH et de sa température optimaux et a été aussi analysée au niveau de sa spécificité envers différents substrats. Dans la littérature, plusieurs études de caractérisation ont été également effectuées avec des  $\beta$ -xylosidases partiellement purifiées (Choi *et al.*, 1996; Taj-Aldeen et Alkenany, 1996; Lorenz et Wiegel, 1997).

Selon l'alignement des séquences en acides aminés établi par Larocque (1997) et remis à jour récemment (1999) (voir figure 4), BxIA serait une enzyme qui possède une forte homologie avec les  $\beta$ -xylosidases et les  $\beta$ -glucosidases de la famille 3 des glycosyl hydrolases. C'est pourquoi la caractérisation de BxIA a débuté par des essais enzymatiques avec les substrats tels que le *p*NPX et le *p*NPG. Or, les résultats obtenus ont démontré que BxIA ne possédait qu'une activité  $\beta$ -xylosidasique. Pour supporter ces

résultats, un zymogramme a été effectué avec deux autres types de substrats, le MUX et le MUG. Les résultats obtenus ont confirmé que BxlA était bien une  $\beta$ -xylosidase et que cette enzyme ne possédait aucune activité  $\beta$ -glucosidasique. Pourtant, la séquence en acides aminés de BxlA montrait de fortes similarités avec de nombreuses β-glucosidases appartenant à la famille 3 des glycosyl hydrolases. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont également observé ce phénomène (Margolles et al., 1996; Janbon et al., 1995b). Ils ont tenté de déterminer dans leurs études, les différents acides aminés impliqués dans la spécificité de la β-xylosidase à partir de l'homologie de séquences en acides aminés. Ces auteurs ont suggéré l'existence de certains acides aminés hautement conservés qui sont présents chez des  $\beta$ -glucosidases mais absents chez les  $\beta$ -xylosidases. Tout d'abord Margolles-Clark et al. (1996), ont étudié la β-xylosidase de Trichoderma reesei (Bxl1) qui montrait une forte homologie avec des ß-glucosidases de la famille 3 des glycosyl hydrolases. Ces auteurs ont établi l'alignement de séquences de la  $\beta$ -xylosidase (Bxl1) avec des β-glucosidases de la famille 3 et ont remarqué la présence d'un acide aspartique (D) très conservé qui serait potentiellement le nucléophile des réactions d'hydrolyse des oligosaccharides par les *B*-glucosidases et les *B*-xylosidases. Proche de ce résidu aspartique, se trouve un motif hautement conservé composé de A/S-G-L-D-M/L et contenant un deuxième acide aspartique. Selon les auteurs, ce deuxième acide aspartique serait essentiel pour l'activité catalytique spécifique aux ß-glucosidases puisqu'il était absent chez les β-xylosidases. Ce motif appartiendrait donc seulement aux βglucosidases. Cependant, l'analyse de l'alignement des séquences en acides aminés de BxIA illustré à la figure 4 va à l'encontre de l'hypothèse émise par Margolles et al. (1996), puisqu'elle démontre la présence du motif A/S-G-L-D-M/L chez la plupart des βxylosidases. Par conséquent, le deuxième résidu aspartique du motif A/S-G-L-D-M/L ne serait pas l'acide aminé donnant la spécificité aux β-glucosidases. Par ailleurs, en 1995 (b), Janbon et al. ont fait l'étude d'une β-xylosidase (βGlu) provenant de Candida molischiana. Un alignement des séquences en acides aminés de ßGlu a été effectué et a démontré que cette dernière appartenait à la famille 3 des glycosyl hydrolases.

L'alignement de séquences en acides aminés a révélé aussi deux motifs hautement

conservés situés dans la région catalytique : le motif S/TDW et le motif GLD. Le motif S/TDW est très conservé chez toutes les β-glucosidases et les β-xylosidases. Quant au motif GLD, celui-ci est très similaire au motif A/S-G-L-D-M/L décrit plus tôt par Margolles-Clark et al. (1996). Selon les auteurs Bause et Legler (1980), ces deux motifs hautement conservés sont essentiels pour le fonctionnement de plusieurs ß-glucosidases. En étudiant l'alignement des séquences en acides aminés de la figure 4, on retrouve au niveau de la région A3 le motif S/TDW présent chez toutes les ß-glucosidases à l'exception de deux dont la  $\beta$ -glucosidase d'*E. coli* et celle de *Microbispora bispora*. Par contre, ce motif est remplacé par le motif S/GDY/C chez les  $\beta$ -xylosidases. Par ailleurs, en analysant la région A1 et la région A2, il est possible de déterminer les acides aminés conservés uniquement chez les  $\beta$ -xylosidases. On retrouve entre autres dans la région A1, le résidu Y (position 121) et dans la région A2, le résidu T (position 221). Ces deux résidus sont conservés chez les β-xylosidases et inexistants chez les β-glucosidases. Ils sont donc probablement impliqués dans la spécificité des ß-xylosidases. Cependant, l'homologie des séquences primaires d'acides aminés permet seulement de prédire les acides aminés donnant la spécificité. Seule la forme tridimensionnelle d'une β-xylosidase et d'une β-glucosidase appartenant à la famille 3 des glycosyl hydrolases pourrait éventuellement permettre de connaître les régions ou les résidus d'acides aminés réellement impliqués dans la spécificité d'une enzyme pour un substrat.

Les caractéristiques biochimiques de la  $\beta$ -xylosidase chez *S. lividans* ont été étudiées et peuvent être comparées à celles des autres enzymes citées dans la littérature (voir tableau 4). On retouve par exemple la  $\beta$ -xylosidase provenant de *Caldocellum saccharolyticum* (Hudson *et al.*, 1991), une enzyme très thermostable possédant une température optimale de 70 °C et un temps de demi-vie de 4,85 heures à 60°C et de 40 minutes à 70°C. Par rapport à cette enzyme, la  $\beta$ -xylosidase de *S. lividans* est très thermoinstable. En effet, son activité maximale était de 40°C mais après une incubation de 10 minutes à 50°C, l'activité a chuté de plus de 50%. La  $\beta$ -xylosidase de *S. lividans* est donc très sensible à la chaleur. Selon Ghosh et Nanda (1993), chauffer une enzyme thermoinstable comme BxlA ou une enzyme thermostable comme la  $\beta$ -xylosidase de *Caldocellum saccharolyticum* peut mener à l'inactivation ou à la dénaturation irréversible de l'enzyme. La dénaturation peut causer une modification de la forme tridimensionnelle de la protéine menant à une perte de la capacité de fixation de l'enzyme au substrat. Dans certains cas, la chaleur peut également affecter la structure du site catalytique.

Le pH optimal de la  $\beta$ -xylosidase a été testé à plusieurs reprises. Cependant, il a été difficile de se prononcer sur une valeur exacte du pH optimal et ceci, à cause probablement de la pureté partielle de la  $\beta$ -xylosidase. Donc, par mesure de précaution, nous avons décidé de continuer à travailler à un pH neutre (pH 7,0) durant les étapes de caractérisation.

Le K<sub>m</sub> de *S. lividans* calculé au *p*NPX était de 0,706 mM. Plus la valeur du K<sub>m</sub> est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat ou la stabilité du complexe enzymesubstrat est grande. Par rapport au K<sub>m</sub> de la  $\beta$ -xylosidase de *Caldocellum saccharolyticum* (10 mM) et à celui de la  $\beta$ -xylosidase de *Bacillus pumilus* (3,9 mM), le K<sub>m</sub> de BxlA chez *S. lividans* est assez faible. Cela signifierait que la  $\beta$ -xylosidase a une bonne affinité envers le substrat *p*NPX. Cependant, d'autres  $\beta$ -xylosidases provenant de *Trichoderma harzianum* ou de *Thermomonospora curvata* montrent des K<sub>m</sub> relativement plus faibles que celui de BxlA (0,0053 mM et 0,004-0,006 mM respectivement). Ces  $\beta$ -xylosidases auraient donc une meilleure affinité envers le *p*NPX que la  $\beta$ -xylosidase de *S. lividans*.

Un profil d'hydrolyse de différents substrats par la  $\beta$ -xylosidase a montré que celle-ci avait une activité d'hydrolyse très spécifique sur le X2 et le X3. En effet, après 72 heures d'incubation à la température de la pièce, 100% de xylose a été relâché à partir de X2 et près de 85% de xylose à partir de X3. La  $\beta$ -xylosidase a donc moins d'affinité pour le X3 que pour le X2. Par contre, l'hydrolyse des xylo-oligosaccharides à degré de polymérisation élevé, tels que le X4 et le X5, s'est avérée plus lente et difficile. L'hydrolyse de X5 par BxlA a donné 25% de xylose et 20% du X4 tandis que celle de X4 a libéré plus de 20% de xylose et 30% de X3. Donc, la  $\beta$ -xylosidase est une exoenzyme

car elle clive un xylose à la fois et à chaque extrémité du substrat. Le X5 est un substrat qui, dans le milieu naturel, est hydrolysé par la xylanase A en X3 et en X2. Contrairement à la xylanase A, BxIA clive le X5 pour donner comme produit final le xylose. D'ailleurs, plusieurs auteurs tels que Shao et Wiegel (1992), Ghosh et Nanda (1993) et Saxena et al. (1995) en sont venus aux mêmes conclusions : les  $\beta$ -xylosidases ont une action très spécifiques sur le X2 et le X3. En effet, le rôle de la β-xylosidase dans le complexe xylanolytique est axé sur la dégradation de petits xylo-oligosaccharides en xylose. Les xylo-oligosaccharides ayant un degré de polymérisation supérieur à 5 sont d'abord dégradés en X5 par les xylanases B et C présents dans le milieu extracellulaire de la bactérie. Le X5 généré est ensuite clivé en X3 et en X2 par la xylanase A. C'est ensuite grâce au système de perméases que le X3 et le X2 sont transportés à l'intérieur de la cellule pour être dégradés en xylose par la  $\beta$ -xylosidase. Par contre, chez les  $\beta$ -xylosidases extracellulaires, la spécificité est plus large : par exemple, Garcia-Campayo et Wood (1992) ont purifié une  $\beta$ -xylosidase extracellulaire de N. frontalis qui était capable d'hydrolyser le X2, le X3, le X4, le X5, le X6 et le X7. Ils ont démontré que l'enzyme hydrolysait le X2 à une faible vitesse comparativement au X3 et au X4. En effet, le pourcentage de dégradation du X2 n'était que de 15% par rapport à 30% de dégradation pour le X3 et de 40% pour le X4 après 30 minutes d'incubation à 37°C. Quant aux dégradations des X5, X6 et X7, elles étaient de l'ordre de 33%, 57% et 29% respectivement. Contrairement à la *β*-xylosidase intracellulaire, la *β*-xylosidase extracellulaire semble être plus spécifique pour les xylo-oligosaccharides à degré de polymérisation élevé que pour le X3 et le X2. Certains auteurs ont aussi révélé l'existence de réactions de transglycosylation permettant la formation des xylo-oligosaccharides à haut degré de polymérisation (Hermann et al., 1997). Ce mécanisme d'action n'a pas été retrouvé chez la β-xylosidase de S. lividans. Finalement, la β-xylosidase ne possède aucune activité envers les cello-oligosaccharides. Des expériences d'hydrolyse des G2, G4 et G5 par BxIA ont été entreprises mais aucun produit d'hydrolyse n'a été observé. Le gène bxlA code donc seulement pour une β-xylosidase et celle-ci n'est spécifique que sur les xylo-oligosaccharides impliqués dans la dernière étape de dégradation du xylane en xylose. Pourtant, les résultats du gel natif d'IEF ont révélé l'existence d'impuretés dans la

préparation enzymatique qui a servi pour effectuer les réactions d'hydrolyse de différents substrats. Néanmoins, malgré cette impureté, seule l'activité de la β-xylosidase a été détectée au cours des analyses.

# Conclusion

.

Les objectifs sur l'étude de la protéine BxlA ont été atteints. Il s'agissait d'abord de cloner le gène bxlA codant pour une  $\beta$ -xylosidase intracellulaire dans le vecteur multicopie, pIJ702 afin de la sur-exprimer. Une fois exprimée en abondance, BxlA est purifiée par chromatographie à interactions hydrophobiques et par tamis moléculaire. La protéine pure est ensuite soumise à de différents essais enzymatiques afin de déterminer sa spécificité.

Par PCR, deux amplicons d'une longueur de 1,1 kpb et de 1,5 kpb ont été obtenus. Le premier codait pour la partie aminée de BxlA tandis que le deuxième codait pour la partie carboxyle. Le gène bxlA a été ensuite reconstruit en entier dans le phage M13 avant d'être cloné dans le vecteur d'expression de *S. lividans*, le plasmide pIJ702. De plus, un promoteur pC109, insensible à la répression catabolique exercée par le glucose, a été cloné en amont du gène bxlA dans le plasmide pIJ702. Cependant, malgré la présence de ce promoteur, la production de la  $\beta$ -xylosidase de *S. lividans* a été inhibée en présence du glucose. Pour remédier à ce problème, le glucose a été remplacé par le xylose, une source de carbone neutre.

La  $\beta$ -xylosidase est une protéine intracellulaire de 90 kDa. La presse de French a été la méthode employée pour libérer la  $\beta$ -xylosidase du mycélium. Par la suite, de nombreuses difficultés ont ralenti la purification de l'enzyme. Ces difficultés étaient surtout associées à l'instabilité de l'enzyme intracellulaire : la  $\beta$ -xylosidase perdait plus de 50% de son activité après 24 heures de conservation à 4°C. Cependant, des agents à potentiel réducteur (DTT) ont été ajoutés ainsi qu'une panoplie d'inhibiteurs de protéases et ont contribué à ralentir la perte de l'activité enzymatique. Les travaux effectués ont montré l'importance de bien choisir un système de purification pour obtenir dans un court délai, une protéine pure et active. Le schéma utilisé pour la purification est basé sur la chromatographie à interactions hydrophobiques sur FPLC, l'ultrafiltration et le tamis moléculaire. À la fin, la conservation de l'enzyme purifiée était assurée par la présence de 50% glycérol.

La ß-xylosidase n'a été purifiée que partiellement : le gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes de focalisation isoélectrique montrait trois bandes. L'activité envers le pNPX a été maximale à 40°C. Néanmoins, l'enzyme perdait 50% de son activité par exposition à 50°C pendant 10 minutes. L'affinité envers le substrat pNPX était de 0,706 mM et des tests de profil d'hydrolyse de la g-xylosidase ont montré que celle-ci n'hydrolysait que les xylo-oligosaccharides de X5 à X2. La dégradation de X2 a été complète suite à une incubation de 72 heures à la température de la pièce. Par contre, le degré d'hydrolyse a diminué en fonction de l'augmentation du degré de polymérisation des substrats. Ainsi, la dégradation du X3 dans les mêmes conditions que X2, a été observée mais seulement 85% du xylose était libéré. Quant à l'hydrolyse de X4 et X5, celle-ci n'a été effectuée que partiellement. En somme, la β-xylosidase chez S. lividans n'hydrolyse que le X2 et le X3. Ces résultats ne font que confirmer le modèle qui a été proposé sur le système xylanolytique. Seuls les petits xylo-oligosaccharides tels que le X3 et le X2 peuvent être transportés par le complexe de perméases à l'intérieur de la cellule pour être dégradés par la B-xylosidase. Finalement, aucune hydrolyse des cello-oligosaccharides et aucun phénomène de transglycolysation n'ont été observés.

D'après l'homologie des séquences en acides aminés, la  $\beta$ -xylosidase appartient à la famille 3 des glycosyl hydrolases. Cette famille regroupe des  $\beta$ -glucosidases et des  $\beta$ -xylosidases provenant de d'autres microorganismes. L'analyse des séquences montre trois régions (A1, A2 et A3) qui constituent le domaine catalytique des enzymes de la famille 3 des glycosyl hydrolases. On retrouve à l'intérieur de ces régions, des résidus hautement conservés tel que l'acide aspartique (D). Pour toutes les  $\beta$ -xylosidases et  $\beta$ -glucosidases de cette famille, l'acide aspartique est reconnu comme étant le nucléophile de la réaction enzymatique d'hydrolyse d'oligosaccharides par ces enzymes. L'alignement des séquences en acides aminés a permis aussi de déterminer les résidus hautement conservés uniquement chez les  $\beta$ -xylosidases et qui pourraient distinguer une  $\beta$ -xylosidase d'une  $\beta$ -glucosidase. Jusqu'à maintenant, aucune  $\beta$ -xylosidase ni de  $\beta$ -glucosidase issue de la famille 3 des glycosyl hydrolases n'a encore été cristallographiée. La détermination de la structure tridimensionnelle est donc nécessaire pour l'étude de la spécificité des enzymes.

De plus, grâce à la cristallographie, il serait plus aisé de prédire par modélisation, les acides aminés conservés et les liens hydrogène qui sont déterminants pour la spécificité de l'enzyme au substrat.

La  $\beta$ -xylosidase n'a été purifiée que partiellement à cause de sa thermoinstabilité. Par conséquent, des études sur l'amélioration de la thermostabilité de la  $\beta$ -xylosidase devraient être envisagées dans le futur. Il serait aussi intéressant d'obtenir une enzyme tout à fait pure afin d'approfondir les études au niveau de sa caractérisation.

Ţ.

Bibliographie

Abelson, J.N. et Simon, M.L. 1990. Guide to protein purification. Murray Ed., Academic Press, Methods Enzymol. 182, 555-566

Agarwal, R. et Gupta, M.N. 1996. Sequential precipitation with reversibly soluble polymers as a bioseparation strategy : purification of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. Protein Expression Purification 7, 294-298

Arcand, N., Kluepfel, D., Paradis, F.W., Morosoli, R. et Shareck, F. 1993.  $\beta$ -mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. **290**, 857-863

Armand, S., Vieille, C., Gey, C., Heyraud, A., Zeikus, J.G. et Henrissat, B. 1996. Stereochemical course and reaction products of the action of  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. Eur. J. Biochem. **236**, 706-713

Bachmann, S.L. et Mc Carthy, A.J. 1989. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermomonospora fusca*. J. Gen. Microbiol. **135**, 293-295

Barnett, C.C., Berka, R.M. et Fowler, T. 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* : evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology* **9**, 1459-1465

Bauer, M.W., Bylina, E.J., Swanson, R.V. et Kelly, R.M. 1996. Comparison of a  $\beta$ -glucosidase and a  $\beta$ -mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* furiosus. Purification, characterization, gene cloning and sequence analysis. J. Biol. Chem. **271**, 23749-23755

Bause, E. et Legler, G. 1980. Isolation and structure of a tryptic glycopeptide from the active site of beta-glucosidase A3 from *Aspergillus wendtii*. Biochem. Biophys. Acta 626, 459-465

Ben-Naim, A. 1980. The hydrophobic effect. Wiley Ed., N.Y.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. 3, 286-290

Bio-Rad. 1993. HPLC columns : methods and applications. Catalogue de Bio-Rad

Bisaria, V.S. et Ghose, T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials : substrates, microorganisms, enzymes and products. Enz. Microbiol. Technol. **3**, 90-104

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Buchert, J., Ranua, M., Siikaaho, M., Pere, J. et Viikari, L. 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in the bleaching of Kraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 941-945

Buttner R. et Bode R. 1992. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase activities from the yeast *Arxula adeninivorans*. J. Basic. Microbiol. **32**, 159-166

Choi, Y.J., Kim, C.J. et Ji, G.E. 1996. A partially purified  $\beta$ -glucosidase from *Bifidobacterium adolescentis* converts cycasin to a mutagenic compound. Lett. Appl. Microbiol. **22**, 145-148

Coughlan, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Editions G.E., Russell, England. Biotechnol. Gen. Rev. **3**, 39-40

De A Ximenes, F., de Paula Silveira, F.Q. et Filho, E.X. 1996. Production of  $\beta$ -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. Curr. Microbiol. **3**, 71-77

Deleyn, F., Claeyssens, J.V. et van Beelmen, C.F. 1978. Purification and properties of  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium wortmannii*. Can. J. Biochem. **56**, 43-50

Deutscher, M.P. 1990. Maintaining protein stability. Methods Enzymol. 182, 83-89

Ferreira Filho, E.X. 1996. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from solidstate cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Can. J. Microbiol. **42**, 1-5

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

Flores, M.E., Perea, M., Rodriguez, O., Malvaez, A. et Huitron, C. 1996. Physiological studies on induction and catabolite repression of  $\beta$ -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. J. Biotechnol. **49**, 179-187

Freifelder, D. 1982. Physical biochemistry : applications to biochemistry and molecular biology. WH. Freeman and Co, N.Y.

Galas, E. et Romanowska, I. 1997. Purification and some properties of  $\beta$ -glucosidase from Aspergillus niger IBT-90. Acta Microbiol. Pol. 46, 241-252

Garcia-Campayo, V. et Wood, T.M. 1992. Hydrolysis of xylo-oligosaccharides by a  $\beta$ -xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Bioch. Soc.Trans. **20**, 274

Gasparic, A., Martin, J., Daniel, A.S. et Flint, H.J. 1995. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4 : sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen
sensibility of a novel enzyme with exoxylanase and  $\beta$ -1,4-xylosidase activities. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2958-2964

Ghosh, M. et Nanda, G. 1993. Thermostability of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus sydowii* MG49. FEBS Lett. **330**, 275-278

Ghosh, M. et Nanda, G. 1994. Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49. FEMS Microbiol. Lett. **117**, 151-156

Godden, B., Legon, T., Helvenstein, P. et Penninckx, M. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. **135**, 285-292

Gong, C.S. et Tsao, G.T. 1979. Cellulase and biosynthesis regulation. D. Perlman Ed., Acad. Press. Inc., N.Y. Ann. Rep. Ferment. Processes 3, 111-140

Gusek, T.W. et Kinsella, J.E. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. Crit. Rev. Microbiol. **18**, 247-260

Han, Y.W. et Srinivasan, V.R. 1969. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. J. Bact. **100**, 1355-1363

Hang, Y.D. et Woodams, E.E. 1997. Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations. Lett. Appl. Microbiol. 24, 389-392

Harris, E.L.V. et Angal, S. 1995. Protein purification methods : a pratical approach. Series editors : Richwood, D et Hames, B.D. IRL Press, pp. 175-228, Oxford

Hébraud, M. et Fèvre, M. 1990. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Microbiol. Lett. **72**, 11-16

Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280, 309-316

Henrissat, B. et Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. **316**, 695-696

Herrmann, M., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P. et Kubicek, C. 1997. The  $\beta$ -xylosidase of the *Trichoderma reesei* is a multifunctional  $\beta$ -D-xylan xylohydrolase. Biochem. J. **321**, 375-381

Heupel, C., Schlochtermeier, A. et Schrempf, H. 1993. Characterization of an intracellular β-glucosidase from *Streptomyces reticuli*. Enzymol. Microb. Technol. **15**, 127-139

Hopwood, D.A. 1989. «*Streptomyces* genetics in pure and applied research » dans Genetic and molecular biology of industrial microorganisms. Hershberger, Queener, Hegeman (Eds), ASM, Washington, pp. 12-19

Hudson, R.C., Schofield, L.R., Colbear, T., Daniel, R.M. et Morgan, H.W. 1991. Purification and some properties of an aryl- $\beta$ -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *E. coli*. Biochem. J. 273, 645-650

Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1995. A cellulase/xylanase negative mutant of *Streptomyces lividans* 66 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol. Microbiol. **17**, 367-377

Janbon, G., Magnet, R. Arnaud, A. et Galzy, P. 1995a. Cloning and sequencing of the  $\beta$ -glucosidase-encoding gene from *Candida molischiana* strains 35M5N. Gene **165**, 109-113

Janbon, G., Derancourt, J., Chemardin, P., Arnaud, A. et Galzy, P. 1995b. A very stable  $\beta$ -glucosidase from a *Candida molischiana* mutant strain : enzymatic properties, sequencing and homology with other yeast  $\beta$ -glucosidases. Biosc. Biotechnol. Biochem. **59**, 1320-1322

Jiresova, M., Dobrova, J., Naprstek, P., Rysavy, P. et Janecek, J. 1987. The cellobiose uptake system in *Streptomyces granaticolor*. FEMS Microbiol. Lett. **41**, 279-282

Kang, S.W., Kim, S.W. et Lee, J.S. 1995. Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. Appl. Biochem. Biotechnol. 53, 101-106

Katz, E., Thompson, C.J. et Hopwood, D.A. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *S. antibioticus* in *S. lividans*. J. Gen. Microbiol. **129**, 2703-2714

Kennedy, R.M. 1990. Hydrophobic chromatography. Methods Enzymol. 182, 339-343

Kluepfel, D., Vats-Mehta, S., Aumont, F., Shareck, F. et Morosoli, R. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans*. Biochem. J. **267**, 45-50

Kluepfel, D., Morosoli, R. et Shareck. F. 1991. Homologous cloning of the xylanase genes and their expression in *Streptomyces lividans* 66. Genetics Product formation in *Streptomyces*. Plenum Press, New-York, pp.207-214

Kluepfel, D., Daigneault, N., Morosoli, R. et Shareck, F. 1992. Purification and characterization of a new xylanase (xlnC) produced by *Streptomyces lividans* 66. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**, 626-631

LaemmLi, U.K. 1990. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

La Grange, D.C., Pretorius, I.S. et van Zyl, W.H. 1997. Cloning of the *Bacillus pumilus*  $\beta$ -xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 262-266

Larocque, D. 1997. Analyse moléculaire du locus *bxl*. Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval.

Leblond, D., Redenbach, M. et Cullum, J. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bact. **175**, 3422-3429

Lee, S.F. et Forsberg, C.W. 1987. Isolation and some properties of a  $\beta$ -D-xylosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 651-654

Lorenz, W.W. et Wiegel, J. 1997. Isolation, analysis and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL YS485 : a  $\beta$ -xylosidase and a novel acetyl xylan esterase with cephalosporin C deacetylase activity. J. Bact. **179**, 5436-5441

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Fan, A.L. et Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275

Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J. et Wyman, C.E. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science 251, 1318

Machida, S., Yu, Y., Singh, S.P., Kim, J.D., Hayashi, K. et Kawata, Y. 1998. Overproduction of  $\beta$ -glucosidase in active form by an *Escherichia coli* system coexpressing the chaperonin GroEL/ES. FEMS Microbiol. Lett. **159**, 41-46

Manin, C., Shareck., F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1994. Purification and characterization of an  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). Biochem. J. **302**, 443-449

Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Nakari-Setala, T. et Penttila, M. 1996. Cloning of genes encoding  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. App. Environ. Microbiol. **62**, 3840-3846

Matsuo, M., Fujie, A., Win, M. et Yasui, T. 1987. Four types of β-xylosidases from *Penicillium wortmannii* IFO 7237. Agric. Biol. Chem. 9, 2367-2379

Matsuo, M., Seki, T., Yasushi, M., Hirofumi, S. et Nakahara, T. 1996. Purification and characterization of an intracellular  $\alpha$ -D-xylosidase from *Penicillium wortmannii* IFO 7237. Biosc. Biotechnol. Biochem. **60**, 341-343

Matern, H., Heinemann, H., Legler, G. et Matern, S. 1997. Purification and characterization of a microsomal bile acid  $\beta$ -glucosidase from human liver. J. Biol. Chem. **272**, 11261-11267

Mihoc, A. et Kluepfel, D. 1990. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces lividans* 66. Can. J. Microbiol. **36**, 53-56

Minami, Y., Takao, H., Kanafuji, T., Miura, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, M. et Matsubara, H. 1997.  $\beta$ -glucosidase in the indigo plant : intracellular localization and tissue specific expression in leaves. Plant Cell Physiol. **38**, 1069-1074

Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene **49**, 323-329

Montero, E., Vallmitjana, M., Perez-Pons, J.A., Querol, E., Jimenez-Barbero, J. et Canada, F.J. 1998. NMR studies of the conformation of thiocellobiose bound to a  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. FEBS Lett. **421**, 243-248

Morosoli, R., Bertrand, J.L., Mondou, F., Shareck, F. et Kluepfel, D. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 239, 587-592

Myburgh, J., Prior, B.A. et Kilian, S.G. 1991. Production of xylan-hydrolyzing enzymes by *Aureobasidium pullulans*. J. Ferment. Bioeng. **72**, 135-137

Nanmori, T., Watanake, T., Shinke, R., Kohno, A. et Kawamura, Y. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. J. Bact. **172**, 6669-6672

Nunoura, N., Ohdan, K., Tanaka, K., Tamaki, H., Yano, T., Innui, M., Yukawa, H., Yamamoto, K. et Kumagai, H. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the  $\beta$ -D-glucosidase gene from *Bifidobacterium breve clb*, and expression of  $\beta$ -D-glucosidase activity in *Escherichia coli*. Biosc. Biotechnol. Biochem **60**, 2011-2018

Panbangred, W., Kawaguchi, O., Tomita, T., Shinmyo, A. et Okada, H. 1984. Isolation of two  $\beta$ -xylosidase genes of *Bacillus pumilus* and comparison of the gene products. Eur. J. Biochem. **138**, 267-273

Paice, M.G., Bernier Jr., R. et Jurasek, L. 1988. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. Biotechnol. Bioeng. 32, 235

Penzès, C. 1996. Purification et étude de la protéine MsiK de *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval

Perez-Gonzalez, J.A., Van Peij, N.N., Bezoen, A., Mac Cabe, A.P., Ramon, D. et De Graaff, L.H. 1998. Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans xlnD* gene encoding a  $\beta$ -xylosidase. Appl. Environ. Microbiol **64**, 1412-1419

Perez-Pons, J.A., Cayetano, A., Rebordosa, X., Lloberas, J., Guasch, A. et Querol, E. 1994. A  $\beta$ -glucosidase gene (*bgl 3*) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814 : molecular cloning, nucleotide sequence, purification and characterization of the encoded enzyme, a new member of family 1 glycosyl hydrolases. Eur. J. Biochem. **223**, 557-565

Perez-Pons, J.A., Rebordosa, X. et Querol, E. 1995. Induction and preliminary characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from a cellulolytic *Streptomyces* strain. FEMS Microbiol. Lett. **128**, 235-239

Pharmacia LKB Biotechnology. 1989. Phastsystem<sup>TM</sup>. Owner's manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden

Pinaga, F., Fernandez-Espinar, M.T., Valles, S. et Ramon, D. 1994. Xylanase production in *Aspergillus nidulans* : induction and carbon catabolite repression. FEMS Microbiol. Lett. **115**, 319-324

Pitson, S.M., Seviour, R.J. et McDougall, B.M. 1997. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in  $\beta$ -glucan degradation. Enz. Microbiol.Technol. **21**, 182-190

Pou-Llinas, J. et Driguez, H. 1987. D-xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **27**, 134-138

Poutanen, K. et Puls, J. 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. Appl. Microbiol. Biotechnol. **28**, 425-432

Pronovost, M. 1991. Clonage homologue et expression d'une  $\beta$ -xylosidase et d'une  $\beta$ -glucosidase chez *Streptomyces lividans* 66. Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval

Raschid, M.H. et Siddiqui, K.S. 1997. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. Folia Microbiol. **42**, 544-550

Redenbach, M., Kieser, H.M., Danapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. et Hopwood, D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. **21**, 77-96

Robinson, D. 1956. The fluorometric determination of  $\beta$ -glucosidase : its occurrence in the tissues of animals, including insects. Biochem. J. 63, 39-44

Robyte, J.F. et White, B.J. 1987. Biochemical techniques. Theory and practice. Iowa State University, Waveland Press Inc.

Ruiz-Arribas, A., Fernandez-Abalos, J.M., Sanchez, P., Garda, A.L. et Santamaria, R.I. 1995. Overproduction, purification and biochemical characterization of a xylanase (*Xys1*) from *Streptomyces halstedii* JM8. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2414-2419

Ruttersmith, L.D. et Daniel, R.M. 1993. Thermophile beta-glucosidase and betaxylosidase from *Thermotoga* sp.strain FjSS3-B.1. Biochem. Biophys. Acta 1156, 167-172

Saier, M.H. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. New Biol. **3**, 1137-1147

Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martinez-Ripoll, M., Lequerica, J.L. et Polaina, J. 1998. Crystal structure of  $\beta$ -glucosidase A from *Bacillus polymyxa* : insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. J. Mol. Biol. **275**, 491-502

Saurin, W. et Dassa, E. 1994. Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependant transport systems: Evolution by recurrent gene duplications. Prot. Sci. 3, 325-344

Saxena, S., Fierobe, H.P., Gaudin, C., Guerlesquin, F. et Belaich, J.P. 1995. Biochemical properties of a  $\beta$ -xylosidase from *Clostridium cellulolyticum*. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3509-3512

Seale, D.R. 1987. Bacteria and enzymes as products to improve silage preservation. Dans : Developments in Silage. Eds Wilkinson et Stark, Chalombe Publ., G.B., pp. 47-61

Shao W. et Wiegel J. 1992. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. J. Bact. 174, 5848-5853

Shareck, F., Mondou, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1987. Cloning of DNA sequences involved in overproduction of endoglucanase activity in *Streptomyces lividans* 66. Biotechnol. Lett. 9, 169-174

Shareck, F., Roy, C., Yaguchi, M., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene **107**, 75-82

Skory, C.D., Freer, S.N. et Bothast, R.J. 1996a. Properties of an intracellular  $\beta$ -glucosidase purified from the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**, 353-359

Skory, C.D., Freer, S.N. et Bothast, R.J. 1996b. Expression and secretion of the Candida wickerhamii extracellular  $\beta$ -glucosidase gene, bglB, in Saccharomyces cerevisiae. Current Gen. **30**, 417-422

Snyder, L.R. et Kirkland, J.J. 1979. Introduction to modern liquid chromatography. John Willey and sons, Inc., pp. 168-245

Stutzenberger, F. et Bodine, A.B. 1998. Thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermomonospora curvata*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **20**, 55-60

Sunna, A. et Antranikian, G. 1996. Growth and production of xylanolytic enzymes by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga thermarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 671-676

Taj-Aldeen, S.J. et Alkenany, K.I. 1996. Separation and partial purification of  $\beta$ -glucosidase and two endoglucanases in *Aspergillus niveus*. Microbiol. **12**, 91-98

Tenkanen, M., Luonteri, E. et Teleman, A. 1996. Effect of side groups on the action of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma reesei* against substitued xylo-oligosaccharides. VTT Biotechnol. Food Res. **399**, 303-306

Théberge, M., Lacaze, P., Shareck, F., Morosoli, R. et Kluepfel, D. 1992. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. Appl. Env. Microbiol. **58**, 815-820

Thompson, J., Robrish, S.A., Bouma, C.L., Freedberg, D.I. et Folk, J.E. 1997. Phospho- $\beta$ -glucosidase from *Fusobacterium mortiferum* : purification, cloning and inactivation by 6-phosphoglucono-D-lactone. J. Bact. **179**, 1636-1645

Utt, E.A., Eddy, C.K., Keshav, K.F. et Ingram, L.O. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 1227-1234

Uzii, M., Matsuo, M. et Yasui, T. 1985. Purification and some properties of *Claetomium* trilaterale  $\beta$ -xylosidase. Agric. Biol. Chem. **49**, 1154-1166

Van Peij, N.N, Brinkmann, J., Vrsanska, M., Visser, J. et De Graaff, L.H. 1997.  $\beta$ -xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by

Aspergillus niger but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. Eur. J. Biochnol. 245, 164-173

Vincent, P. 1996. Clonage, purification et caractérisation d'une nouvelle  $\alpha$ -Larabinofuranosidase chez *Streptomyces lividans*. Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval

Vincent, P., Shareck, F., Dupont, C., Morosoli, R, Kluepfel, D. 1997. New  $\alpha$ -Larabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans* : cloning and DNA sequence of the *afbB* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. **322**, 845-852

Vroemen, S., Heldens, J., Boyd C., Henrissat, B. et Keen, N.T. 1995. Cloning and characterization of the *bgxA* gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -xylosidase enzyme. Mol. Gen. Genet. **246**, 465-477

Williams, S.T., Sharpe, M.E. et Holt, J.G. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4. Williams & Wilkins (ed.), pp. 2346

Wittmann, S. 1993. Clonage et séquençage du gène de la cellulase B de *Streptomyces lividans* 66 et caractérisation de l'enzyme. Mémoire de maîtrise. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval

Wittmann, S., Shareck, F., Kluepfel, D. et Morosoli, R. 1994. Purification and characterization of a second endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 1701-1703

Xu, W.Z., Shima, Y. Negoro, S. et Urabe, I. 1991. Sequence and properties of  $\beta$ -xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO. Contradiction of the previous nucleotide sequence. Eur. J. Biochem. **202**, 1197-1203

Yan, T.R. et Lin, C.L. 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. Biosc. Biotechnol. Biochem. **61**, 965-970

Yasui, T. et Matsuo, M. 1988. β-xylosidase/β-glucosidase of *Chaetomium trilaterale*. Methods Enzymol. **160**, 696-700

Zverlov, V.V., Volkov, I.Y., Velikodvorskaya, T.V. et Schwarz, W.H. 1997. *Thermotoga neapolitana bglB* gene, upstream of *lamA*, encodes a highly thermostable  $\beta$ -glucosidase that is laminaribiase. Microbiol. **143**, 3537-3542

## ANNEXE 1

Cocktail d'inhibiteurs de protéases « Complete<sup>TM</sup> » : une tablette inhibe un large spectre de protéases telles que les sérines, les cystéines et les métalloprotéases. Une tablette est habituellement suffisante pour l'inhibition de 50 mL d'un extrait brut. En cas de forte activité protéolytique, il faut alors réduire le volume à 25 mL d'extrait brut. Alternativement, il est possible de préparer une solution stock de 25X : dissoudre une tablette dans 2 mL de tampon phosphate de sodium à une concentration de 100 mM à pH 7.0. Le conserver à 4 °C pendant un mois maximum.