

**CHRISTIANE QUINIOU**

**THERMOSTABILISATION DU DOMAINE CATALYTIQUE DE LA  
XYLANASE A DE *STREPTOMYCES LIVIDANS*  
PAR MUTAGENÈSE DIRIGÉE**

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

Jury d'évaluation:

Claude Dupont, Ph.D.  
Peter Tijssen Ph.D.  
Yves Bourbonnais Ph.D.

Mai 1999

INRS- Institut Armand-Frappier

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS:.....</b>	<b>IX</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
2.1 Glycosyles hydrolases .....	5
2.1.1 Diversité des glycosyles hydrolases: .....	5
2.1.2 Mécanisme d'action des glycosyles hydrolases: .....	5
2.1.2.2 Mécanisme d'inversion : .....	8
2.1.3 Classification: .....	10
2.1.3.1 Classification basée sur la spécificité de substrat:.....	10
2.1.3.2 Classification basée sur le mécanisme d'action : .....	10
2.1.3.3 Classification basée sur le mode d'action : .....	11
2.1.3.4 Classification par similarité des séquences primaires:.....	11
2.1.3.5 Clans: .....	12
2.2 Xylanase A de <i>Streptomyces lividans</i> : .....	13
2.2.1 Classification: .....	13
2.2.2 Structure: .....	15
2.3 Définitions de la stabilité:.....	17
2.3.1 Stabilité thermodynamique :.....	17
2.3.2 Stabilité cinétique: .....	18
2.4 Approches utilisées pour améliorer la thermostabilité des enzymes:.....	20
2.4.1 Augmentation de la quantité de prolines .....	21
2.4.2 Liens hydrogènes et les ponts salins :.....	22
2.4.3 Effet d'hydrophobicité et renforcement du cœur hydrophobe : .....	23
2.4.4 Stabilisation des hélices $\alpha$ .....	24

2.5	Amélioration de la thermostabilité des glycosyles hydrolases:.....	29
2.5.1	Famille 10:.....	29
2.5.2	Famille 1: .....	30
2.5.3	Enzymes n'appartenant pas au clan GH-A: .....	31
2.6	Objectifs du projet de maîtrise:.....	32
2.6.1	Objectifs principaux: .....	33
2.6.2	Objectifs spécifiques: .....	34
<b>3.</b>	<b>APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>37</b>
3.1	PRODUITS CHIMIQUES: .....	38
3.2	Microorganismes .....	38
3.2.1	<i>E. coli</i> DH11S.....	38
3.2.1.1	Conditions de culture et conservation des souches.....	38
3.2.2	<i>S. lividans</i> 10-164.....	39
3.3	Phagemides et plasmides .....	40
3.3.1	Phagemide pIAF831 .....	40
3.3.2	Plasmides pIAF906 et pC109 .....	41
3.4	Manipulations de l'ADN .....	41
3.4.1	Mutagenèse dirigée par PCR .....	41
3.4.2	Amplification élective <i>in vitro</i> .....	43
3.4.3	Purification du produit de PCR .....	43
3.4.4	Extraction et purification de l'ADN plasmidique.....	44
3.4.4.1	<i>E. coli</i> .....	44
3.4.4.2	<i>S. lividans</i> .....	44
3.4.5	Extraction et purification de l'ADN monocaténaire.....	45
3.4.5.1	À l'aide de M13mp18 et M13mp19.....	45
3.4.5.1.1	Formation des plages de lyse .....	46
3.4.5.1.2	Extraction de l'ADN simple brin.....	46
3.4.5.1.3	Analyse à la nucléase S <sub>1</sub> .....	47
3.4.6	Séquençage.....	48
3.4.7	Digestion enzymatique .....	48
3.4.8	Ligation.....	49
3.4.9	Électrophorèse sur gel d'agarose .....	49
3.4.10	Transformation .....	49
3.4.10.1	Cellules compétentes de <i>E. coli</i> .....	49
3.4.10.2	Protoplastes de <i>S. lividans</i> 10-164 .....	50
3.4.10.2.1	Criblage des recombinants.....	50

3.5	Production des enzymes mutantes.....	50
3.6	Manipulations des protéines .....	51
3.6.1	Dosage des protéines .....	51
3.6.1.1	Méthode de Bradford.....	51
3.6.1.2	Méthode de Lowry .....	51
3.6.2	Purification des enzymes mutantes .....	52
3.6.2.1	Ultrafiltration à débit tangential .....	52
3.6.2.2	Dialyse.....	52
3.6.2.2.1	XlnA <sub>tr</sub> .....	52
3.6.2.2.2	XlnA <sub>2</sub> .....	53
3.6.2.3	Chromatographie sur échangeuse d'ions .....	53
3.6.2.3.1	XlnA <sub>tr</sub> .....	53
3.6.2.3.2	XlnA <sub>2</sub> .....	54
3.6.2.4	Chromatographie sur tamis moléculaire.....	55
3.6.2.5	Électrophorèse SDS-PAGE .....	56
3.6.3	Caractérisation des enzymes mutantes .....	57
3.6.3.1	Détermination des sucres réducteurs par le test de PAHBAH ( <i>p</i> -hydroxybenzoïc acid hydrazide).....	57
3.6.3.2	Détermination de l'activité spécifique des enzymes mutantes ....	57
3.6.3.3	Détermination de la température optimale d'hydrolyse .....	58
3.6.3.4	Détermination de la stabilité des mutants en absence de substrat .....	58
3.6.3.5	Détermination de la stabilité en présence de substrat.....	58
3.6.3.6	Spectres dans les ultra-violets lointains et température de dénaturation par dichroïsme circulaire .....	59
3.6.4	Caractérisation approfondie des enzymes mutantes .....	60
3.6.4.1	Paramètres cinétiques .....	60
3.6.4.2	Thermoinactivation et énergie d'activation .....	60
4.	<b>RÉSULTATS</b> : .....	62
4.1	Simple mutants de la XlnA <sub>tr</sub> .....	63
4.1.1	Sous-clonage des gènes .....	63
4.1.2	Production et purification.....	64
4.1.3	Caractérisation des mutants .....	65
4.1.3.1	Activité spécifique .....	65
4.1.3.2	Température optimale d'hydrolyse.....	67
4.1.3.3	Détermination du temps de demie-vie sans substrat: .....	68
4.1.3.4	Détermination du temps de demi-vie avec substrat .....	73

4.1.3.5	Température de dénaturation et spectre dans les UV lointains déterminés par dichroïsme circulaire .....	75
4.1.3.6	Énergie d'activation .....	78
4.1.3.7	Paramètres cinétiques : .....	80
4.2	Doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub> .....	81
4.2.1	Mutagenèse par PCR et sous-clonage dans <i>S. lividans</i> .....	81
4.2.2	Production et purification .....	82
4.2.3	Caractérisation des enzymes mutantes: .....	82
4.2.3.1	Activité spécifique .....	82
4.2.3.2	Température optimale d'hydrolyse : .....	82
4.2.3.3	Temps de demi-vie en absence de substrat .....	84
4.2.3.4	Température de dénaturation et spectre UV-lointains .....	87
4.2.3.5	Énergie d'activation .....	87
	Figure 21 .....	89
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION :</b> .....	<b>90</b>
5.1	Production et purification des enzymes mutantes .....	91
5.2	Caractérisation des enzymes mutantes .....	91
5.2.1	I49P 94 .....	
5.2.2	M105L .....	100
5.2.3	V230Y, M93F et L143Y .....	101
5.2.4	A104D, A104E, E37H et L143W .....	106
5.2.5	Paramètres cinétiques : .....	108
5.3	Doubles mutants .....	108
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>112</b>
	<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>116</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>118</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>127</b>

## LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau 1	Familles composant les clans des glycosyles hydrolases	13
Tableau 2	Familles et enzymes composant le clan GH-A	14
Tableau 3	Programme d'élution de la XlnA <sub>tr</sub> sur la DEAE-5PW	54
Tableau 4	Programme d'élution de la XlnA <sub>2</sub> sur CM-Sépharose AP2	55
Tableau 5	Liste des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	63
Tableau 6	Activités spécifiques des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	68
Tableau 7	Paramètres de stabilité des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	70
Tableau 8	Paramètres cinétiques des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	80
Tableau 9	Paramètres de stabilité et activité spécifique des doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub>	83

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 Mécanisme de rétention des glycosyles hydrolases	7
Figure 2 Mécanisme d'inversion des glycosyles hydrolases	9
Figure 3 Modes d'action des glycosyles hydrolases	12
Figure 4 Représentation du domaine catalytique de la XlnA de <i>S. lividans</i>	16
Figure 5 Graphique de la variation d'énergie libre d'une réaction de dénaturation	19
Figure 6 Effet d'hydrophobicité et enfouissement des groupements fonctionnels hydrophobes	24
Figure 7 Hélice $\alpha$ et ses dipôles	26
Figure 8 Motif de recouvrement ou « Capping box »	27
Figure 9 Alignement de séquences de xylanases thermophiles de la famille 10 avec celle de la XlnA	36
Figure 10 Méthode de mutagenèse dirigée par PCR	42
Figure 11 Gels SDS-PAGE des enzymes purifiées	66
Figure 12 Stabilité sans substrat à 60°C des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	71
Figure 13 Stabilité sans substrat à 70°C des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	72
Figure 14 Stabilité avec substrat à 60°C des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	74
Figure 15 Stabilité avec substrat à 70°C des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	76
Figure 16 Courbes de dénaturation thermiques des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	77
Figure 17 Spectres dans les UV lointains déterminés par dichroïsme circulaire des mutants de la XlnA <sub>tr</sub>	79
Figure 18 Stabilité sans substrat à 60°C des doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub>	85

Figure 19	Stabilité sans substrat à 70°C des doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub>	86
Figure 20	Courbes de dénaturation thermique des doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub>	88
Figure 21	Spectres UV lointains déterminés par dichroïsme circulaire des doubles mutants de la XlnA <sub>2</sub>	89
Figure 22	Position des mutants dans la structure du domaine catalytique de la XlnA	92
Figure 23	Environnement à 3 Å de I49	95
Figure 24	Environnement à 3 Å de P49	97
Figure 25	Environnement à 3 Å de M105	102
Figure 26	Environnement à 3 Å de L105	104

## LISTE DES ABRÉVIATIONS:

A	Alanine
ADN	Acide déoxyribonucléique
Ala	Alanine
amp	Ampicilline
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Cystéine
CM	Carboxy méthyle
Cys	Cystéine
D	Aspartate
DC	Dichroïsme circulaire
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxide
E	Glutamate
EDTA	Éthylènediaminetetraacétate
F	Phénylalanine
G	Glycine
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
Glu	Glutamate
H	Histidine
His	Histidine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
I	Isoleucine
Ile	Isoleucine
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
K	Lysine
kb	Kilo paires de base
kDa	Kilodaltons
L	Leucine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
M	Méthionine
Met	Méthionine
N	Asparagine
P	Proline
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PEG	Polyéthylène glycol
Phe	Phénylalanine
PI	pH isoélectrique
Pro	Proline
p/v	Poids/volume
Q	Glutamine
R	Arginine
RBB	Remazol Bleu Brilliant
S	Sérine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
T	Thréonine
TE	Tris-EDTA
TES	Acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique
Thr	Thréonine
TIM	Triose phosphate isomérase
Tm	Température de dénaturation
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trp	Tryptophane
TSB	Bouillon tryptone de soya
TY	Tryptic soya broth-Yeast extract
Tyr	Tyrosine
V	Valine
Val	Valine
v/v	Volume/volume
W	Tryptophane
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.
XlnA	Xylanase A de <i>Streptomyces lividans</i>
XlnA <sub>2</sub>	Domaine catalytique de la XlnA (302 acides aminés)
XlnA <sub>r</sub>	Domaine catalytique de la XlnA (d'une longueur non définie)
Y	Tyrosine

# **SOMMAIRE**

La xylanase A de *Streptomyces lividans*, membre de la famille 10 et du clan GH-A des glycosyles hydrolases présente un grand intérêt dans l'industrie des pâtes et papier, l'industrie alimentaire et l'agriculture. Cependant les propriétés physico-chimiques de celle-ci ne correspondent pas aux exigences de l'industrie en terme de thermostabilité.

À partir d'alignements de structures primaires de la XlnA et d'enzymes thermophile de la famille 10, les objectifs majeurs de ce projet étaient d'utiliser la mutagenèse dirigée afin d'améliorer la thermostabilité de la XlnA et d'étudier les facteurs contribuant à la stabilité thermique de ce type d'enzymes. Sur neuf mutants caractérisés, I49P, M105L et V230Y se sont avérés posséder des propriétés de thermostabilité améliorées. Le mutant I49P a obtenu un temps de demi-vie en absence de substrat cinq fois supérieur à la XlnA<sub>tr</sub> sauvage à 60°C. M105L a obtenu un temps de demi-vie à 60°C en présence de substrat deux fois plus élevé que l'enzyme sauvage. Ces trois mutants ont aussi obtenu des augmentations de leur température de dénaturation (T<sub>m</sub>) de 3, 2, et 1°C respectivement.

Une approche incrémentielle a ensuite été amorcée afin de créer un effet d'additivité sur la thermostabilité. La mutation I49P a été couplée à d'autres mutations bénéfiques ou à tout le moins non débilantes pour la thermostabilité. Les doubles mutants I49P-V230Y et I49P-M105L se sont démarqués en démontrant véritablement un effet d'additivité au niveau du temps de demi-vie sans substrat (huit et cinq fois supérieurs à l'enzyme sauvage) et de la T<sub>m</sub> (4 et 3 °C plus élevée). La position I49 s'est donc révélée importante pour la thermostabilité et le remplacement par une proline à cet endroit a pu favoriser énergétiquement le repliement de la protéine. Les deux autres positions M105 et V230 ont fait ressortir l'importance que pourraient prendre les interactions hydrophobes dans la stabilisation de la structure de la protéine.

# **INTRODUCTION**

La xylanase A de *Streptomyces lividans* (XlnA) est membre de la famille 10 et du clan GH-A des glycosyles hydrolases. Elle hydrolyse le xylane, composant majeur de la paroi végétale. Sa structure tridimensionnelle a été résolue par Derewenda *et al.* (1994) et se présente comme un baril  $(\alpha/\beta)_8$ .

La XlnA présente un intérêt au niveau industriel pour le rôle qu'elle peut jouer, en outre, dans le blanchiment des pâtes et papier mais aussi dans l'industrie de l'alimentation et de l'agriculture. Par contre, cette enzyme ne rencontre pas pour l'instant les critères de température voulus par l'industrie (75-95°C). Pour concevoir des biocatalyseurs efficaces, il serait important d'étudier les facteurs jouant un rôle dans la stabilité thermique des protéines et de pouvoir utiliser les connaissances acquises pour stabiliser d'autres enzymes de même structure.

La disponibilité de sa structure tridimensionnelle en fait aussi un outil précieux pour l'étude fondamentale de la thermostabilité chez ce type de protéines. Chez la famille 10 des glycosyles hydrolases, d'autres xylanases stables à des températures de 80 à 100°C peuvent servir de modèles pour démarrer un programme rationnel d'ingénierie des protéines. Une d'entre elles, la xylanase XYNZ de *Clostridium thermocellum* a même été cristallisée et sa structure a été résolue (Dominguez *et al.*, 1995). De plus, la méthodologie permettant la surexpression de la XlnA ainsi que les conditions de culture de *S. lividans* sont déjà au point. Tous ces facteurs font de la XlnA un excellent modèle d'étude à portée de main pour étudier les facteurs jouant un rôle dans la thermostabilité des enzymes ayant le motif de repliement  $(\alpha/\beta)_8$ .

Chez les enzymes du clan GH-A et particulièrement chez la XlnA, un programme rationnel de thermostabilisation n'a jamais été amorcé malgré un potentiel au niveau biotechnologique. Certains travaux chez la xylanase A de *Caldocellum saccharolyticum* (Lüthi *et al.*, 1992) ont été effectués et ont obtenu un certain succès mais aucun travail subséquent n'a été reporté dans la littérature.

Les objectifs principaux du projet étaient d'utiliser la mutagenèse dirigée pour améliorer la thermostabilité de la XlnA de *S. lividans* sans en compromettre l'activité et aussi d'étudier les facteurs contribuant à la stabilité de la structure en tonneau  $(\alpha/\beta)_8$  en utilisant le domaine catalytique de la XlnA comme modèle. À partir des conclusions qui auront pu être tirées de cette étude, il sera possible de développer une méthodologie d'ingénierie applicable à toutes les protéines présentant ce type de structure pour ainsi en améliorer la stabilité.

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de produire le simple brin servant à séquencer et sous-cloner les gènes mutés dans un vecteur d'expression pouvant se répliquer dans *S. lividans*. Les enzymes mutantes étaient ensuite produites et purifiées et enfin caractérisées. Dans le cas où certaines mutations se sont avérées intéressantes des doubles mutants ont été générés dans le but de vérifier s'il existe un effet d'additivité ou de synergie des effets positifs sur la thermostabilité de la XlnA.

L'importance de ce projet réside alors dans le fait que les conclusions tirées de cette étude pourront être appliquées à tous les enzymes du clan GH-A (dont les cellulases de la famille 5 et les  $\beta$ -glucosidases de la famille 1) car ces enzymes ont la même structure que la XlnA. De plus, le motif de repliement de la XlnA  $((\alpha/\beta)_8)$  est largement répandu chez les enzymes qui catalysent différentes réactions (plus de 50 protéines représentatives dont la pyruvate kinase, la triose phosphate isomérase, l'adénosine déaminase et la phosphoestérase) ce qui élargira encore l'impact de ces résultats.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 2.1 Glycosyles hydrolases

### 2.1.1 Diversité des glycosyles hydrolases:

Les glycosyles hydrolases clivent le lien *O*-glycosidique entre deux carbohydrates ou entre un carbohydrate et un groupement aglycone (Henrissat et Bairoch, 1999). Les glycosyles hydrolases jouent un rôle important chez les organismes vivants puisqu'elles dégradent plusieurs polysaccharides qui démontrent une grande variation stéréochimique puisqu'un hexosaccharide a au-dessus de  $10^{12}$  isomères possibles. Toutes ces possibilités résultent en une diversité structurale et fonctionnelle de ces substrats permettant aux glycosyles hydrolases de jouer plusieurs rôles biologiques dans, en outre, l'invasion virale et la signalisation cellulaire chez les organismes vivants en plus d'être impliquées dans la disponibilité de la principale source d'énergie nécessaire au travail mécanique et aux réactions chimiques que sont les carbohydrates (Quioco, 1986; Davies et Henrissat, 1995). Conséquemment, les glycosyles hydrolases, présentent une grande versatilité fonctionnelle et sont impliquées dans plusieurs processus biologiques.

### 2.1.2 Mécanisme d'action des glycosyles hydrolases:

Les glycosyles hydrolases peuvent agir selon deux mécanismes d'hydrolyse résultant en la rétention ou l'inversion de configuration du carbone anomérique (Sinnott, 1990). Deux résidus catalytiques participent directement à la réaction, soit le résidu nucléophile et le résidu acide/base (McCarter et Withers, 1994). Les acides aminés jouant ces rôles ont été identifiés comme étant l'acide aspartique et /ou l'acide glutamique.

### 2.1.2.1 Mécanisme de rétention

Le mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique en est un de double déplacement qui implique un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme et les résidus catalytiques situés de part et d'autre du site actif à 5,5 Å. Un résidu catalytique fonctionne comme un acide/base et l'autre comme un nucléophile et groupe partant (McCarter et Withers, 1994; Sinnot, 1990).

Le mécanisme de rétention comporte une étape de glycosylation et une de déglycosylation (Figure 1). À l'étape de glycosylation le saccharide se lie au sous-site -1 ce qui induirait un changement de conformation du saccharide qui perdrait la conformation chaise. Cette nouvelle conformation permet le positionnement du lien glycosidique à proximité du résidu acide/base et évite l'encombrement stérique entre le carbone anomérique ( $C_1$ ) et le résidu nucléophile. Il permet de présenter l'aglycone en position axiale (White et Rose, 1997). Le résidu acide/base donne alors un proton à l'atome d'oxygène du lien glycosydique et le résidu nucléophile attaque le carbone anomérique. Le lien glycosydique est clivé et l'aglycone libéré via un état de transition portant une charge positive au carbone anomérique (ion oxocarbonium). Le nucléophile forme alors un lien covalent en configuration  $\alpha$  avec le  $C_1$  du saccharide au sous-site -1 ce qui permet la formation de l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme (White et Rose, 1997). La formation du glycosyl-enzyme affecte l'état d'ionisation du résidu acide/base en diminuant localement la charge et en altérant le réseau de liens hydrogènes ce qui lui permet d'être dans un état d'ionisation approprié pour jouer un rôle de base. L'espace est maintenant disponible pour la diffusion d'une molécule d'eau dans l'environnement de cette base. À l'étape de déglycosylation, par un mécanisme concerté, la base arrache un proton à la molécule d'eau qui une fois activée effectuera une attaque nucléophile sur le  $C_1$  et un état de

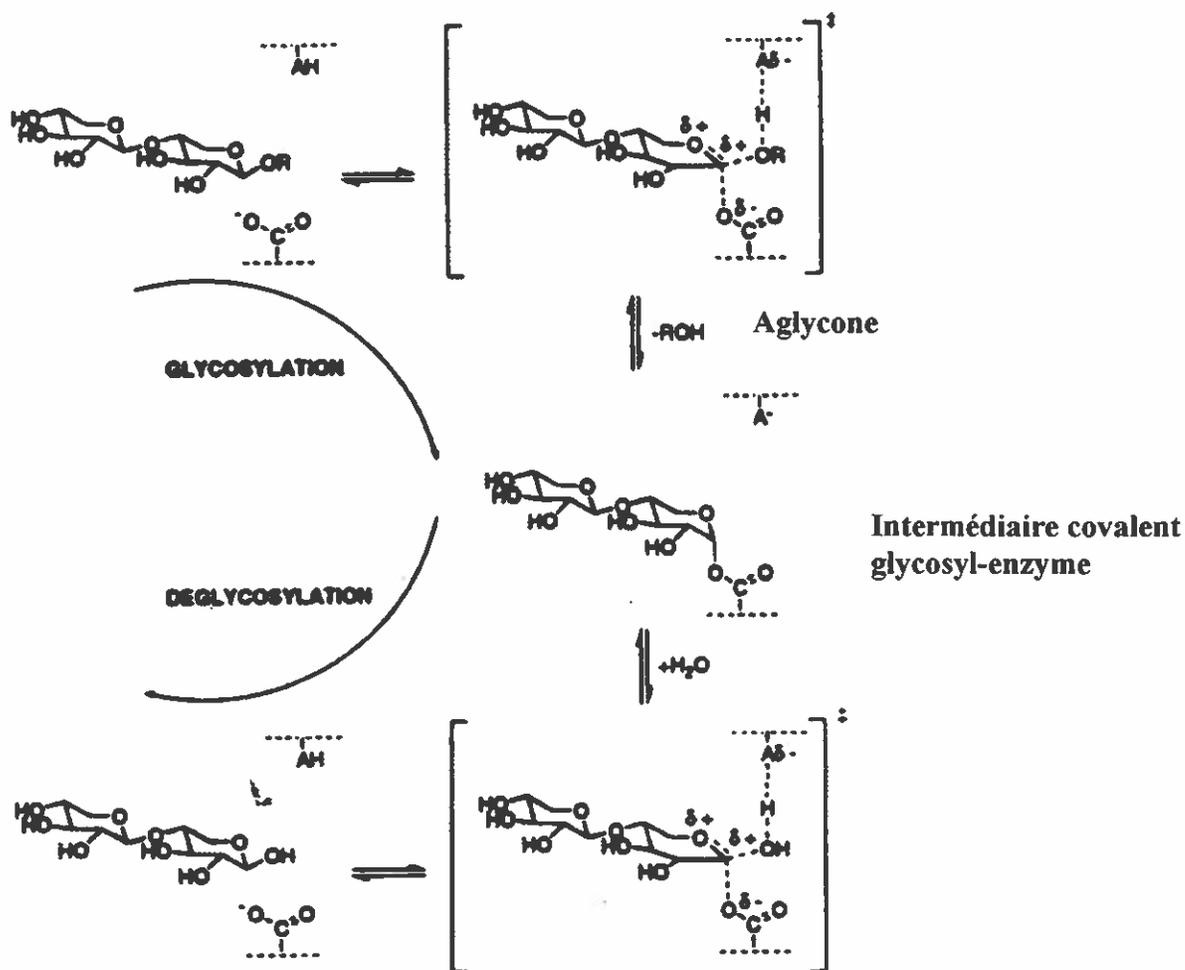


Figure 1. Mécanisme d'hydrolyse résultant en la rétention de la configuration du carbone anomérique. Tiré de Mackenzie *et al.*, 1997.

transition comportant les mêmes caractéristiques que précédemment sera formé. Le produit final de la réaction présente une configuration du carbone anomérique conservée par rapport au substrat initial.

#### 2.1.2.2 Mécanisme d'inversion :

Le mécanisme d'inversion de la configuration du carbone anomérique est un déplacement direct du groupe partant par une molécule d'eau (Figure 2). Un résidu catalytique agit comme acide et l'autre comme base (McCarter et Withers, 1994). La protonation de l'atome d'oxygène glycosidique par le résidu acide et le départ de l'aglycone se font de façon concomitante avec l'attaque d'une molécule d'eau qui a été activée par le nucléophile. Comme pour le mécanisme de rétention, les résidus catalytiques sont situés de part et d'autre du site actif mais la distance entre eux est de 9 à 10 Å ce qui permet à une molécule d'eau de se positionner près des résidus et du substrat dès le départ de façon à pouvoir jouer son rôle de nucléophile. Le produit qui s'en suit présente une configuration du carbone anomérique inversée par rapport au substrat initial.

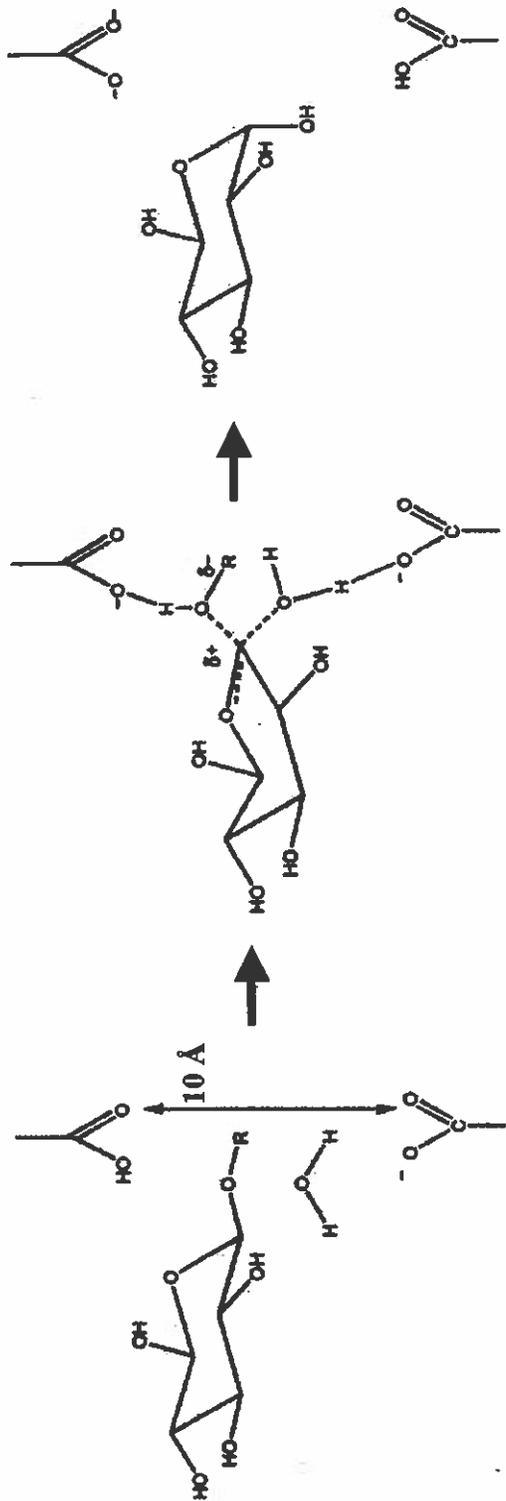


Figure 2. Mécanisme d'hydrolyse résultant en l'inversion de la configuration du carbone anomérique

### 2.1.3 Classification:

De plus en plus de séquences de glycosyles hydrolases ont été identifiées au cours des dernières années et plusieurs systèmes de classification ont été appliqués à celles-ci afin d'en soutirer des renseignements précieux sur leurs fonctions, leurs structures et leurs spécificités.

#### 2.1.3.1 Classification basée sur la spécificité de substrat:

Cette classification est basée sur la spécificité de substrat et est celle de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) chaque enzyme portant un code E.C. Les xylanases, par exemple, ont le code E.C. 3.2.1.8 où "3" identifie le mécanisme c'est-à-dire dans ce cas-ci l'hydrolyse, "2" signifie que ce sont des glycosyles hydrolases, "1" signifie qu'elles hydrolysent le lien O-glycosyle et "8" spécifie le substrat particulier hydrolysé dans ce cas-ci, le xylane. L'avantage de cette classification est sa simplicité et le fait qu'elle est employée partout et acceptée par tous les biochimistes. Le grand désavantage est qu'elle n'a pas été conçue pour refléter les différences et ressemblances structurales et évolutives des enzymes. De plus, cette classification ne tient pas compte du fait que certaines enzymes ont une spécificité plus élargie et agissent sur plusieurs substrats.

#### 2.1.3.2 Classification basée sur le mécanisme d'action :

Les glycosyles hydrolases peuvent hydrolyser le substrat par deux mécanismes soit de rétention ou d'inversion de la configuration du carbone anomérique. Malgré que ce ne soit pas en soit une classification, cette connaissance de la stéréochimie fournit des informations essentielles au niveau mécanistique (Henrissat et Davies, 1997). Une description détaillée des

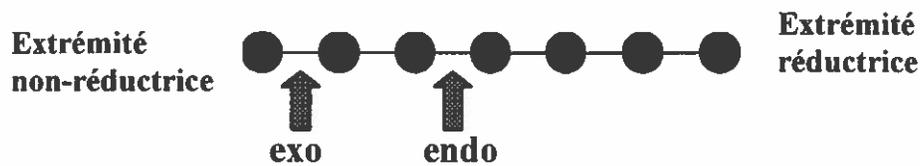
mécanismes de rétention et d'inversion est présentée précédemment (2.1.2.1 et 2.1.2.2).

### 2.1.3.3 Classification basée sur le mode d'action :

Les glycosyles hydrolases peuvent aussi être classées selon le mode d'action exercé sur le substrat. Les enzymes « exo » attaquent l'extrémité non-réductrice du polysaccharide libérant ainsi un monosaccharide et celles de type « endo » attaquent quelque part à l'intérieur du polysaccharide (Figure 3). Cette classification peut être très utile car elle permet de prédire la topologie du site de liaison au substrat. En effet, les enzymes de type « exo » ont un site de liaison en forme de pochette tandis que les types « endo » ont un site en forme de crevasse (Henrissat et Davies, 1997). Le grand désavantage est que certaines enzymes démontrent un mode d'action intermédiaire entre le « exo » et l'« endo », par exemple les cellobiohydrolases qui attaquent de façon multiple les substrats comme la cellulose (Henrissat et Davies, 1997).

### 2.1.3.4 Classification par similarité des séquences primaires:

En 1991, Bernard Henrissat proposa une classification basée sur la similarité des séquences primaires des glycosyles hydrolases. La structure et la séquence étant reliée, il devait être possible, par cette classification, d'en soutirer de précieux renseignements structuraux et mécanistiques. Plus de 1070 enzymes ont ainsi été classées en 74 familles (Henrissat et Bairoch, 1999). Cette classification reflète donc les aspects structuraux mieux que les classifications précédentes, permet de mettre en évidence les relations évolutives et aide à développer un outil permettant dériver des données mécanistiques car le mécanisme d'action est



**Figure 3. Illustration des modes d'actions « exo » et « endo » des glycosyles hydrolases.**

conservé chez toutes les enzymes d'une même famille. De plus, le repliement des enzymes chez une même famille étant conservé, la modélisation par homologie s'en trouve facilitée (Henrissat et Davies, 1997).

#### 2.1.3.5 Clans:

Ces dernières années ont vu apparaître un grand nombre de structures tridimensionnelles résolues de glycosyles hydrolases. Comme la structure tridimensionnelle semble plus hautement conservée que la séquence en acides aminés, les familles de glycosyles hydrolases ont pu être regroupées en clans à partir de leur similitudes structurales, mécanistiques et de la comparaison des amas hydrophobes (HCA ou "Hydrophobic Cluster Analysis") dans l'environnement des résidus catalytiques (Henrissat *et al*, 1995; Jenkins *et al*, 1995; Henrissat et Bairoch, 1999). Les familles faisant partie du même clan regroupent donc des enzymes comportant une structure tridimensionnelle semblable, le même mécanisme d'hydrolyse (de rétention ou d'inversion de la configuration du carbone anomérique) et la position ainsi que l'identité des résidus catalytiques sont conservés (Tableau 1).

**Tableau 1. Classification par clans des familles des glycosyles hydrolases selon Henrissat et Bairoch (1999)**

Clans	Familles
GH-A	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 51, 53
GH-B	7, 16
GH-C	11, 12
GH-D	27, 36
GH-E	33, 34
GH-F	43, 62
GH-G	37, 63
GH-H	13, 70

## 2.2 Xylanase A de *Streptomyces lividans*:

La xylanase A de *Streptomyces lividans* ((E. C. 3.2.1.8) (XlnA)) est responsable de l'hydrolyse du xylane, composant majeur de la paroi cellulaire et est particulièrement intéressante pour le bioblanchiment du papier kraft.

### 2.2.1 Classification:

La XlnA est membre de la famille 10 (Henrissat et Bairoch, 1993) et du clan GH-A (Tableau 2) des glycosyles hydrolases (Henrissat *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1995). Les enzymes faisant partie de ce clan se caractérisent par une structure de leur domaine catalytique en forme de tonneau ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> ou "TIM barrel", par deux résidus catalytiques glutamates situés à l'extrémité C-terminale des brins  $\beta_4$  et  $\beta_7$ , le résidu acide/base (donneur de proton) étant précédé par une asparagine conservée chez tous les membres de ce clan, et par un mécanisme réactionnel de rétention de la configuration du carbone anomérique.

**Tableau 2. Clan GH-A des glycosyl hydrolases selon Henrissat & Bairoch (1999).**

Famille	EC	Nom	# <sup>a</sup>	3D <sup>b</sup>
1	3.2.1.21	$\beta$ -glucosidase	28	√
	3.2.1.85	6-phospho- $\beta$ -galactosidase	5	√
	3.2.1.86	6-phospho- $\beta$ -glucosidase	9	
	3.2.1.108	lactase	3	
	3.2.3.1	myrosinase	6	√
2	3.2.1.23	$\beta$ -galactosidase	24	√
	3.2.1.25	$\beta$ -mannosidase	4	
	3.2.1.31	$\beta$ -glucuronidase	5	√
5	3.2.1.4	endoglucanase	101	√
	3.2.1.58	glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase	9	
	3.2.1.78	$\beta$ -mannanase	9	
10	3.2.1.8	xylanase	62	√
17	3.2.1.39	glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase	38	√
	3.2.1.73	lichenase	13	√
26	3.2.1.78	mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase	9	
30	3.2.1.45	glucosylceramidase	2	
35	3.2.1.23	$\beta$ -galactosidase	24	
39	3.2.1.37	$\beta$ -xylosidase	12	
	3.2.1.76	$\alpha$ -L-iduronidase	3	
42	3.2.1.23	$\beta$ -galactosidase	24	
51	3.2.1.55	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	12	
53	3.2.1.89	arabinogalactan endo-1,4- $\beta$ -galactosidase	5	

<sup>a</sup> : nombre de séquences dans SWISS-PROT version 36.0

<sup>b</sup> : structure en trois dimensions déterminée

### 2.2.2 Structure:

La XlnA de *S. lividans* possède un domaine de liaison au substrat insoluble en C-terminal lié par un domaine de jonction au domaine catalytique situé à l'extrémité N-terminale de la protéine. La structure en trois dimensions du domaine catalytique de 32 kDa de la XlnA a été déterminée à une résolution de 2,6 Å par Derewenda *et al.*, en 1994. La structure en est une de tonneau ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> ou "TIM barrel" (Figure 4). Cette structure a, pour la première fois, été observée chez la triosephosphate isomérase du muscle du poulet (Banner *et al.*, 1975) et se caractérise par un coeur hydrophobe composé de 8 brins  $\beta$  parallèles reliés entre eux par 8 hélices  $\alpha$  anti parallèles par rapport aux brins  $\beta$ . Ces hélices se retrouvent à l'extérieur du tonneau.



**Figure 4.** Représentation du domaine catalytique de la XlnA de *S. lividans*. Les hélices  $\alpha$  du tonneau ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> sont en rouge, les brins  $\beta$  sont en jaune et les boucles sont en bleu et vert. Cette structure a été générée à l'aide du logiciel MOE (Molecular Operating Environment); Chemical Computing Group Inc.; Version 1998.10.

Le site actif est situé dans une crevasse formée par les boucles connectant les extrémités C-terminales des brins  $\beta$  aux hélices  $\alpha$  adjacentes (Brandén et Tooze, 1999). D'autres structures de domaines catalytiques de xylanases de la famille 10 ont été déterminées et démontrent la même structure en trois dimensions (Harris *et al.*, 1994; White *et al.*, 1994; Dominguez *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1998).

## 2.3 Définitions de la stabilité:

Avant de parler de thermostabilité, il serait important de donner une brève définition de ce qu'est la stabilité d'une protéine en terme d'énergie et de cinétique de repliement car ces principes jouent un rôle majeur dans l'amélioration de la thermostabilité.

### 2.3.1 Stabilité thermodynamique :

Contrairement à ce qu'on pourrait croire les protéines ne sont pas des macromolécules stables et l'exposition à des températures élevées peuvent les dénaturer. La différence d'énergie entre la conformation native et dénaturée est à peine plus élevée que la contribution d'un lien hydrogène (2-5 kcal/mol) (Brandën et Tooze, 1999).

Deux composantes énergétiques majeures contribuent à la stabilité des protéines. L'enthalpie englobe l'énergie impliquée dans les interactions hydrophobes, les liens hydrogènes et les liaisons ioniques. Lorsque la dénaturation est réversible les liens covalents (liens peptidiques) entre les acides aminés restent les mêmes dans la conformation native et dénaturée de la protéine. Par contre, les liens non-covalents sont maximisés chez la protéine native pour produire une structure compacte et solide tandis que la forme dénaturée est beaucoup plus ouverte et les interactions non-covalentes sont moins fréquentes. La participation de l'enthalpie ( $\Delta H$ ) est donc très importante pour la stabilité de la structure tridimensionnelle et peut atteindre plusieurs centaines de kcal/mole (Brandën et Tooze, 1999).

L'autre composante, l'entropie dérive de la seconde loi de la thermodynamique qui stipule que de l'énergie est requise pour créer l'ordre. La forme native est très ordonnée par rapport à la forme dénaturée qui comporte

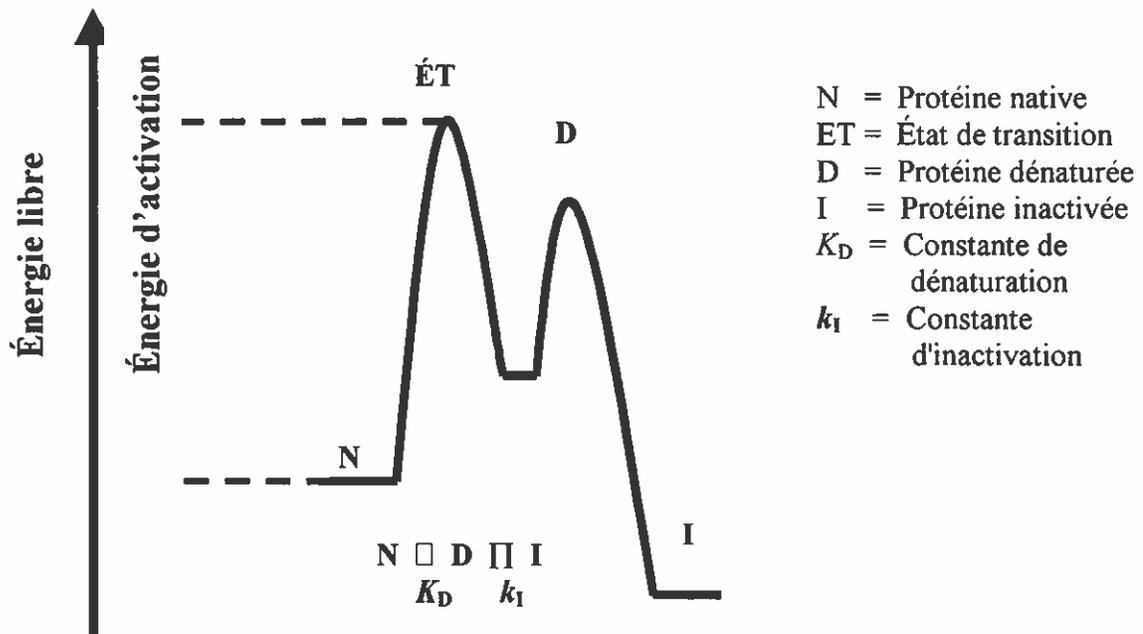
plusieurs conformations. Sans facteurs de compensation comme l'enthalpie, il serait alors plus favorable énergétiquement pour la protéine d'être dénaturée puisque cela requiert moins d'énergie. La contribution de l'entropie ( $\Delta S$ ) est donc du même ordre de grandeur que l'enthalpie mais dans le sens opposé. La recherche a démontré que  $\Delta H$  est habituellement positif mais que l'augmentation de l'entropie due à l'augmentation du désordre de l'environnement, soit l'eau, fait en sorte que le repliement est finalement favorable énergétiquement. La stabilité d'une protéine est donc définie comme la variation d'énergie libre ( $\Delta G$ ) générée lors de la réaction réversible de dénaturation (a):



et qui illustre la différence entre deux grandes composantes énergétiques: l'enthalpie et l'entropie ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). La réaction réversible s'observe lorsqu'après avoir enlevé les conditions dénaturantes, l'on retrouve la forme native de la protéine. La variation d'énergie libre entre les formes natives et dénaturée est le paramètre thermodynamique décrivant la stabilité thermique d'une protéine et la différence de cette variation d'énergie libre entre une protéine naturelle et un mutant ( $\Delta\Delta G$ ) permet de quantifier le gain ou la perte de stabilité de ce dernier.

### 2.3.2 Stabilité cinétique:

La stabilité cinétique décrit la quantité d'énergie nécessaire à l'accomplissement des différentes étapes de repliement (ou dénaturation) de la protéine (Figure 5). Dans le cas de plusieurs protéines, la réaction de dénaturation est irréversible car certains événements comme l'aggrégation ou la dégradation chimique de la forme dénaturée peuvent se produire et empêcher la renaturation lorsque la protéine n'est plus en conditions dénaturantes (inactivation et plus seulement dénaturation).



**Figure 5. Diagramme illustrant la variation d'énergie libre gouvernant une réaction de dénaturation suivie d'une inactivation irréversible de la protéine.**

La stabilité cinétique devient alors plus adéquate pour décrire l'amélioration de la stabilité thermique car l'évaluation de paramètres thermodynamiques demande qu'on ait une réaction réversible. Le paramètre décrivant le mieux l'amélioration de la stabilité thermique au point de vue de la cinétique de la réaction est l'énergie d'activation c'est-à-dire la différence d'énergie libre entre la forme native et l'état de transition de la réaction de dénaturation car c'est la magnitude de cette différence qui détermine le taux de dénaturation de la protéine. Que la réaction complète soit réversible ou non, cette barrière doit être atteinte pour que la dénaturation se poursuive. La plus grande thermostabilité d'une protéine se traduira donc ici comme une augmentation de l'énergie nécessaire pour atteindre cette barrière qu'est l'état de transition (Day, 1998).

#### 2.4 Approches utilisées pour améliorer la thermostabilité des enzymes:

La thermostabilité d'une protéine est définie comme la préservation de la structure chimique et spatiale d'un polypeptide lorsqu'exposé à des températures extrêmes. Plusieurs microorganismes qui vivent dans des habitats comportant des conditions extrêmes (boues volcaniques, lacs alcalins et milieux très acides) ont été découverts ces dernières années et les enzymes produites par ceux-ci ont été cristallisées et caractérisées. Celles provenant de microorganismes thermophiles (température de croissance maximale dépassant 45°C) possèdent des propriétés de thermostabilité très intéressantes non seulement pour l'industrie (pâtes et papier, alimentation, textile) mais aussi pour la recherche fondamentale. En effet, la comparaison des structures primaires et tertiaires de ces enzymes avec leurs homologues mésophiles a permis une plus grande compréhension des changements mis en place par la pression évolutive pour permettre une stabilité thermique accrue de ces enzymes. Celles-ci possèdent une grande homologie de séquence avec leur contreparties mésophiles et le mécanisme ainsi que le mode d'action enzymatique est semblable. Alors l'adaptation de ces enzymes aux températures élevées dépend en grande partie de mutations dans la structure primaire ou de changements locaux de structures (Gazerro, 1997).

En comparant les structures primaires et tridimensionnelles d'enzymes mésophiles et thermophiles d'une même famille il a été possible d'identifier plusieurs facteurs qui pourraient être responsables de la plus grande stabilité thermique de ces dernières et d'élaborer des approches expérimentales permettant d'améliorer cette thermostabilité. Ces approches consistent en mutations d'acides aminés par des prolines à certaines positions stratégiques permettant ainsi de diminuer la valeur d'entropie de la forme dénaturée, la diminution de la flexibilité de la structure de la protéine par l'augmentation de liens hydrogènes, l'addition de ponts salins et la diminution de la longueur des boucles à la surface des protéines et le renforcement du coeur hydrophobe par la création de nouvelles interactions

hydrophobes. Elles ont toutes été utilisées pour augmenter la thermostabilité des enzymes et sont brièvement développées dans ce qui suit.

#### 2.4.1 Augmentation de la quantité de prolines

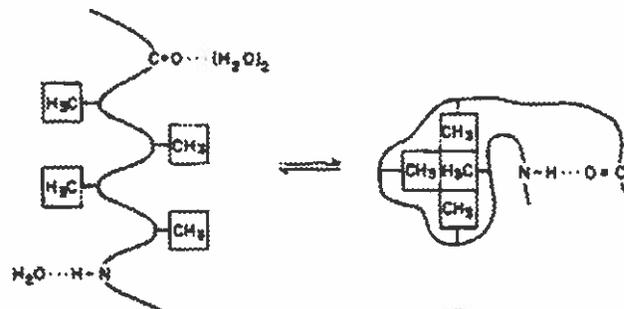
La proline restreint la rotation autour du carbone  $\alpha$  car elle possède un cycle pyrrolidine qui lui confère une géométrie unique. La proline réduit la liberté conformationnelle de la forme dénaturée car celle-ci ne peut alors adopter qu'un certain nombre de conformations (Li *et al.*, 1997; Hardy *et al.*, 1993). L'introduction de prolines à certains endroits précis dans la structure soit au N-terminal des hélices  $\alpha$  et dans les boucles peut contribuer à augmenter la thermostabilité des enzymes. L'entropie de la forme dénaturée s'en trouve alors réduite ce qui favorise le repliement de la protéine (Hardy *et al.*, 1993). Outre la rigidité que la structure de la proline confère à la protéine native, elle pourrait également empêcher le dépliement local à certains endroits dans la structure de la protéine (Hardy *et al.*, 1993). Hardy *et al.*, (1993) ont effectué des mutations dans une boucle exposée au solvant de la protéase neutre de *Bacillus stearothermophilus*. Ils ont remplacé deux résidus S65 et A69 par des prolines et ont obtenu une amélioration de la température de dénaturation de 4,2 et 5,6 °C. Nakamura *et al.*, (1997) ont introduit plusieurs prolines (une à la fois) dans une hélice  $\alpha$  de la protéase neutre de *Bacillus stearothermophilus*. Celles qui ont été introduites à l'extrémité N-terminale de l'hélice (I140P et D141P) ont augmenté la température de dénaturation de 4,4 et 2,3 °C. L'enzyme était aussi moins susceptible à la protéolyse par l' $\alpha$ -chymotrypsine ce que les auteurs ont expliqué par la plus grande rigidité de la structure. Par contre, la mutation L147P située à l'intérieur de l'hélice a déstabilisé la protéine. Ces travaux ont démontré que l'introduction de prolines dans la structure d'une protéine était une approche très efficace mais que l'endroit où ces prolines étaient introduites devait être choisi judicieusement.

#### 2.4.2 Liens hydrogènes et les ponts salins :

Un lien hydrogène survient lorsque deux atomes électronégatifs capables de former un dipôle comme l'azote et l'oxygène forment une interaction avec le même hydrogène. Cet hydrogène est lié à l'atome donneur mais interagit de façon électrostatique avec l'accepteur (Day, 1996). Les ponts salins sont des liens ioniques plus forts formés entre deux résidus chargés comme l'arginine et l'aspartate. Un lien hydrogène contribue pour 0,5 –2,0 kcal/mol à la stabilité de la protéine et un pont salin contribue pour 3-5 kcal/mol (Fersht et Serrano, 1993). La comparaison de deux 3-isopropylmalate déhydrogénases mésophiles avec une thermophile a permis de constater que la plus grande thermostabilité de cette dernière pouvait être expliquée par des réseaux de ponts salins à la surface de l'enzyme thermophile mais pas des mésophiles (Wallon *et al.*, 1997). Ces mêmes réseaux ont aussi été retrouvés chez la glutamate déhydrogénase de *Pyrococcus furiosus* (Yip *et al.*, 1995) et chez la  $\beta$ -glucosidase de *Sulfolobus solfataricus* (Aguilar *et al.*, 1997). Ces réseaux ont permis de relier entre elles des régions des protéines non contiguës dans la structure primaire. Chez la barnase de *Bacillus amyloliquefaciens* Serrano *et al.* (1990) ont effectué la mutation T16R de façon à ce que l'arginine forme un pont salin avec D12. La géométrie du pont s'est retrouvée être la même que chez la binase de *Bacillus intermedius*, homologue thermophile de la barnase. Le mutant s'est avéré plus stable que l'enzyme sauvage de 0,5 kcal/mole. Par contre, Dao-pin *et al.* (1991) ont créés des doubles mutants de façon à former des ponts salins à la surface du lysozyme du phage T<sub>4</sub> mais, malgré le fait que les paires histidines-aspartates aient formé des ponts salins qui pouvaient stabiliser, la contrainte structurale introduite s'est avérée défavorable énergétiquement et l'effet général a été déstabilisateur. L'introduction de ce type d'interactions dans la structure de la protéine peut donc s'avérer délicate et peu d'exemples de cette approche sont donc présents dans la littérature.

### 2.4.3 Effet d'hydrophobicité et renforcement du cœur hydrophobe :

L'effet d'hydrophobicité appelé aussi le facteur entropique est la principale force d'entraînement responsable du repliement des protéines. Elle résulte en l'enfouissement à l'intérieur du cœur de la protéine des résidus hydrophobes (Figure 6). Lorsque la chaîne polypeptidique est déroulée en solution aqueuse, les molécules d'eau solvatent les chaînes latérales hydrophiles exposées. Par contre, l'eau s'organise en cage autour des chaînes latérales non polaires car les interactions eau-eau sont plus fortes ce qui occasionne une diminution d'entropie défavorable énergétiquement (car les molécules de solvant sont ordonnées). Lorsque la protéine se replie et que ces chaînes non-polaires se retirent du contact avec le solvant pour interagir entre elles, ces cages sont brisées et les molécules d'eau regagnent le solvant et sont chassées de l'intérieur de la structure de la protéine (Rawn, 1991). Au niveau enthalpique des interactions eau-eau sont perdues mais l'augmentation d'entropie provenant du solvant vient largement compenser pour cette perte et le repliement devient alors thermodynamiquement favorable. Moins le cœur hydrophobe de la protéine contient de cavités, moins il y a de molécules d'eau présentes à l'intérieur pouvant vibrer lorsque la température augmente et briser les interactions non-covalentes. Chaque groupement méthyle enlevé ou ajouté dans le cœur hydrophobe génère une variation d'énergie d'environ 1,3-1,5 kcal/mol (Pace, 1995; Fersht et Serrano, 1993). Shih *et al.*, (1995) ont fait certaines mutations dans le cœur hydrophobe du lysozyme du blanc d'oeuf de poulet. La mutation S91T a permis de remplir une cavité (par l'addition d'un groupement méthyle) tandis que I55L a fait se déplacer des molécules de solvant enfouies à l'intérieur de la protéine. La thermostabilité du lysozyme a été alors améliorée de 0,6-1,3 kcal/mol.



**Figure 6. Schéma illustrant l'effet d'hydrophobicité et l'enfouissement des groupements fonctionnels hydrophobes à l'intérieur du coeur de la protéine (Tiré de Pace *et al.*, 1996)**

Delboni *et al.*, (1995) ont remarqué, en comparant plusieurs structures tridimensionnelles de triose phosphate isomérases (TIM) mésophiles et thermophiles, que les TIM thermophiles possédaient moins de cavités dans leurs coeurs hydrophobes que les mésophiles et ainsi bénéficiaient d'une structure plus compacte. Par contre, Kim *et al.*, (1995) ont remplacé un résidu phénylalanine à la position 51 par un résidu leucine moins volumineux et ont obtenu une  $\alpha_1$ -antitrypsine plus stable de 1 kcal/mol malgré la création d'une cavité. Les auteurs ont expliqué ces résultats par la plus grande facilité qu'aurait l' $\alpha_1$ -antitrypsine de se replier en absence de la phénylalanine.

#### 2.4.4 Stabilisation des hélices $\alpha$

Cette dernière approche ne tire pas sa source uniquement de comparaisons de structures d'enzymes mésophiles et thermophiles mais elle est abondamment utilisée pour étudier la thermostabilité des protéines. L'hélice  $\alpha$  est la structure secondaire la plus commune chez les protéines globulaires (Doig et Baldwin,

1995). Elle comporte 3,6 résidus par tour d'hélice et est stabilisée par la formation de liens hydrogène de type  $n \rightarrow n + 4$ , c'est-à-dire qu'un lien hydrogène se forme entre l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du résidu  $\forall n$  au niveau du squelette carboné de l'hélice et le groupement amide du résidu  $\forall n + 4$ , et ainsi de suite parallèlement au squelette carboné (voir figure 7a). Les liens hydrogène pointent tous en direction C-terminale. Le résidu appelé Ncap est le premier résidu impliqué dans le réseau de liens hydrogène décrit plus haut. Les quatre premiers groupements amides de l'extrémité N-terminale et les quatre derniers groupements carbonyles à l'extrémité C-terminale ne sont donc pas occupés par des liens hydrogène.

Harper et Rose en 1993 ont décrit les motifs de liens hydrogènes permettant de pallier à ce fait. Ils ont remarqué que dans plusieurs hélices  $\alpha$  des liens hydrogènes se sont formés entre la chaîne latérale du résidu  $N + 3$  (3e résidu après le N-cap) et le groupement NH du N-cap. Réciproquement, la chaîne latérale du N-cap a formé un lien hydrogène avec le NH du squelette carboné du résidu  $N + 3$ . Ils ont appelé ce motif la "capping box" ou motif de recouvrement (Figure 8).

Une autre propriété intrinsèque de l'hélice  $\alpha$  a été utilisée pour stabiliser la structure des protéines. Il y a formation de dipôles à chacune des extrémités de l'hélice due à la différence de polarité dans le lien peptidique entre le groupement NH et C=O. Ces différences s'additionnent le long du squelette carboné et

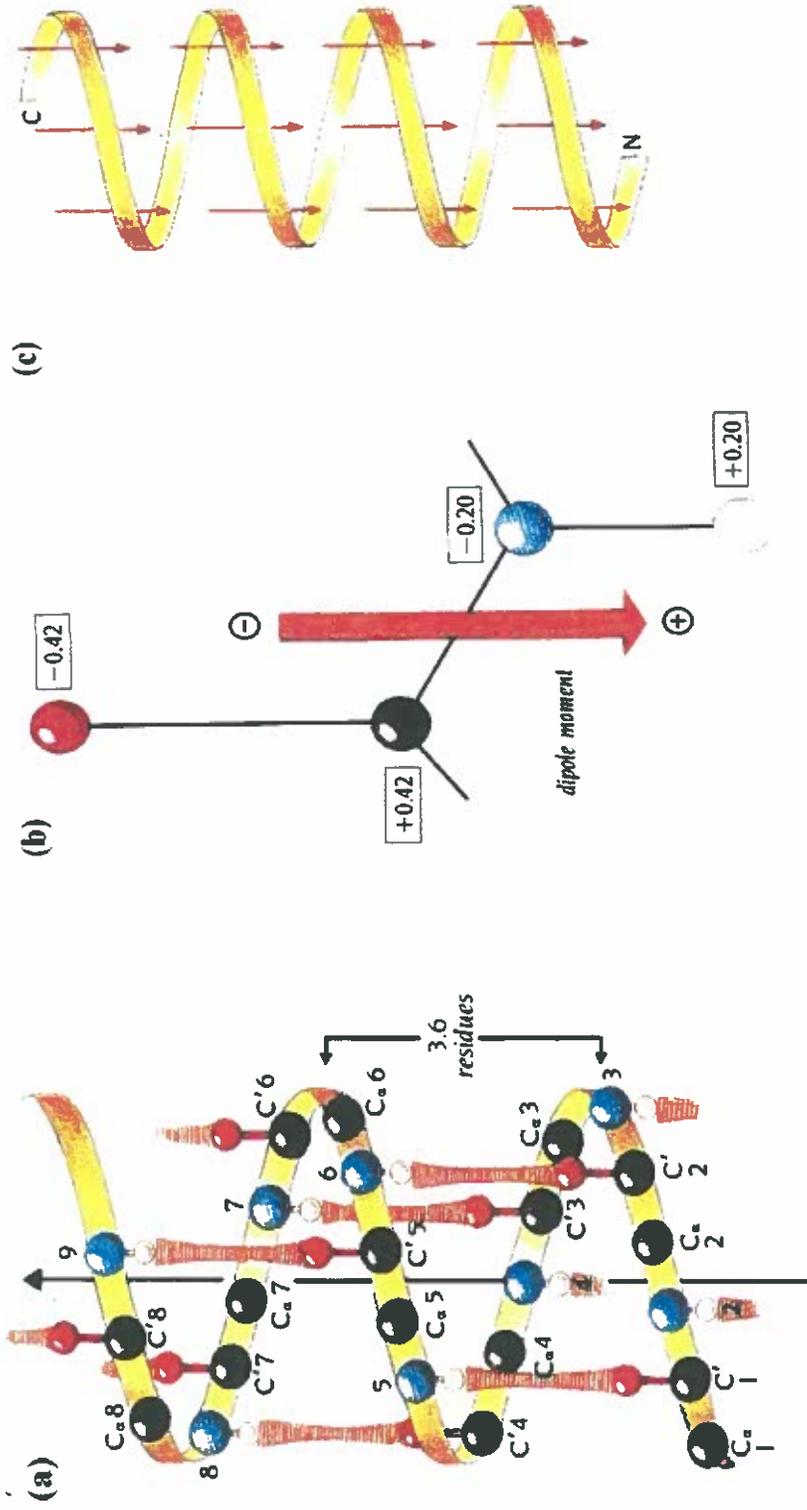
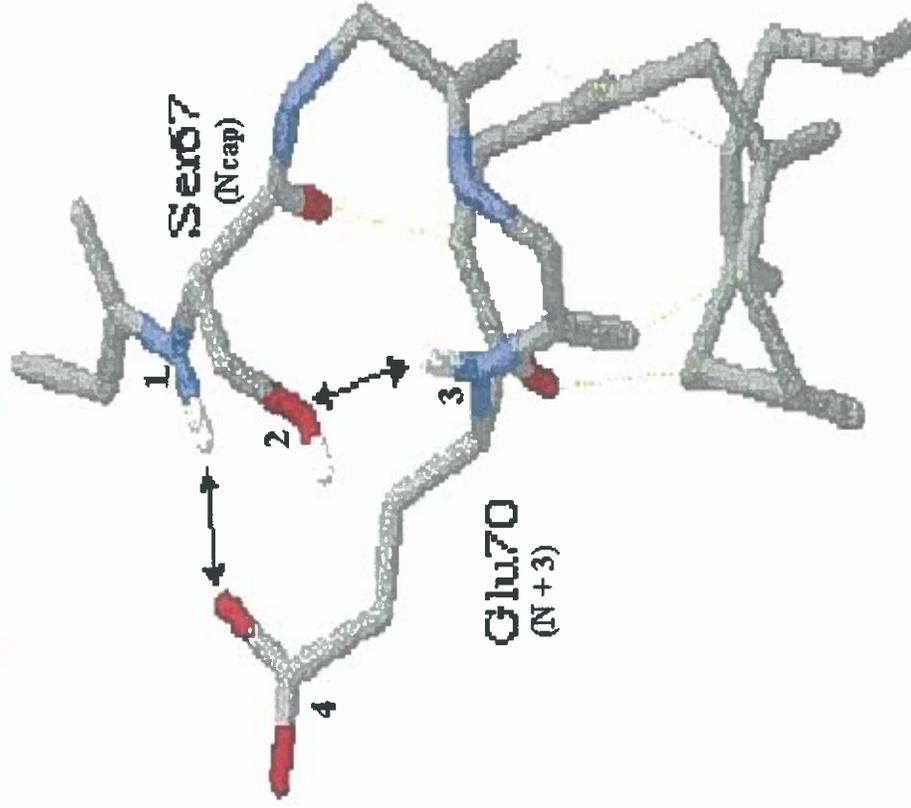
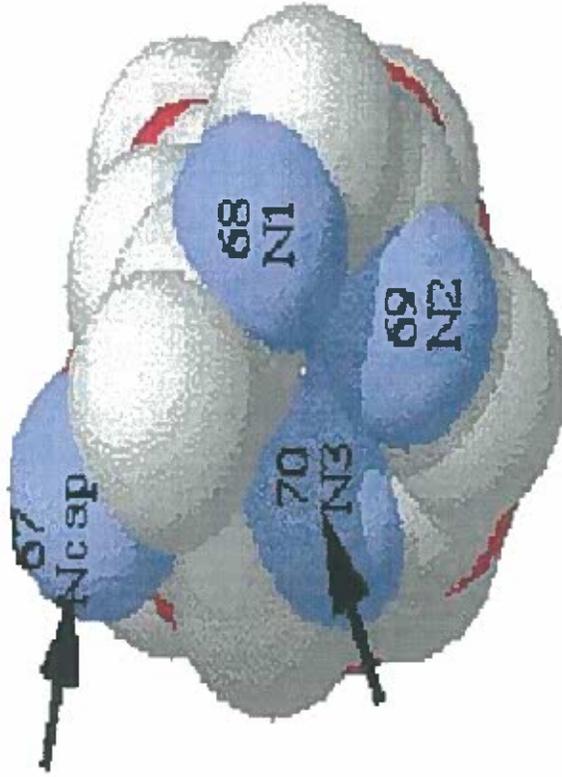


Figure 7. a) Représentation du squelette carboné d'une hélice  $\alpha$  et des liens hydrogènes qui lient celui-ci. Les liens hydrogènes sont rouges et striés; Les atomes de carbone sont en noir, les atomes d'azote en bleu, ceux d'oxygène en rouge et ceux d'hydrogène en blanc. La position C1 est le N-cap, la position C2 se nomme N + 1, C3 donne N + 3 etc. b) et c) Les dipôles d'un unité peptidique et l'alignement de ceux-ci le long de l'axe de l'hélice. (Adapté de Branden and Tooze, 1999)

“Capping Box”  
(Ser - X - X - Glu)



Helix N-terminus



Berndt, K., 1996

Figure 8. Représentation d'un motif "capping box". Les atomes d'azote sont en bleu, l'oxygène en rouge et l'hydrogène en blanc. Les liens hydrogène impliqués dans la "capping box" sont représentés par des flèches. Les liens hydrogènes  $n \rightarrow n + 4$  sont en jaune. 1) Groupement NH du squelette carboné du Ncap; 2) Chaîne latérale du Ncap; 3) Groupement NH du squelette carboné du  $N + 3$ ; 4) Chaîne latérale du résidu  $N + 3$ .

confèrent une charge partielle positive à l'extrémité N-terminale et négative à l'extrémité C-terminale (figure 7 b) et c)).

Plusieurs études statistiques ont été conduites de façon à faire ressortir les préférences de certains acides aminés pour les positions et les motifs décrits plus haut dans les hélices  $\alpha$ . Richardson et Richardson (1988) ont comparé 215 hélices  $\alpha$  provenant de 45 protéines globulaires. En position Ncap les résidus glycine, thréonine, sérine, aspartate et asparagine se sont avérés favorisés pour leur plus grande capacité à former les liens hydrogène de la  $\forall$ capping box $\forall$ décrite précédemment. En position N + 1, la proline, de par sa conformation, jouerait un rôle d'initiateur de tour d'hélice (vers l'extrémité C-terminale) et de signal d'arrêt de l'hélice (en N-terminal). En position N + 2, N + 3 et N + 4 les acides aminés chargés négativement auraient la préférence car ces résidus stabiliseraient le dipôle positif en N-terminal par des interactions électrostatiques. Les résultats de Richardson et Richardson ont été corroborés par d'autres études statistiques plus récentes incluant, dans certains cas, plus de 1 000 hélices  $\alpha$  (Kumar et Bonsal, 1998 ; Doig et Baldwin, 1995 ; Doig *et al.*, 1997 ; Gunasekaran *et al.*, 1998 et Harper et Rose, 1993) . Toutes ces données ont donc été utilisées pour améliorer la thermostabilité des enzymes. Nicholson *et al.*, (1988) ont fait deux mutations dans deux hélices  $\alpha$  du lysozyme du phage T<sub>4</sub> en introduisant deux aspartates dans la région du dipôle positif en N-terminal et ont obtenu une température de dénaturation de 4 ° C supérieure à l'enzyme sauvage. Mainfroid *et al.*, (1996) ont remplacé une glutamine au dipôle en N-terminal de l'enzyme TIM par une aspartate et ont obtenu une amélioration de la thermostabilité de 1,5 kcal/mol. Ils ont aussi remplacé une alanine par une proline au N-cap d'une hélice  $\alpha$  et ont obtenu une amélioration de 0,6 kcal/mol.

L'étude des protéines thermostables et des interactions stabilisant la structure des protéines a donc permis d'obtenir certains succès dans l'amélioration

de la thermostabilité des enzymes provenant de microorganismes mésophiles. Il faudra tout de même plus de structures tridimensionnelles d'enzymes thermostables et des méthodes de prédictions de changements conformationnels encore plus puissantes qui permettront alors de démarrer des programmes d'ingénierie des protéines plus performants entre autre pour modéliser des réseaux de ponts salins et des coeurs hydrophobes plus compacts (Russell et Taylor, 1995).

## 2.5 Amélioration de la thermostabilité des glycosyles hydrolases:

Il existe dans la littérature quelques exemples de travaux qui ont été effectués dans le but d'améliorer la thermostabilité des glycosyles hydrolases ayant un domaine catalytique de forme  $(\alpha/\beta)_8$ .

### 2.5.1 Famille 10:

Moreau *et al.*, en 1994, en comparant les séquences primaires des acides aminés des xylanases de la famille 10 ont remarqué que certains résidus étaient hautement conservés à certaines positions spécifiques chez toutes les xylanases de cette famille. Voulant étudier le rôle que ces résidus conservés jouaient dans la structure et la fonction de la XlnA de *S. lividans*, les acides aminés asparagine, phénylalanine et arginine aux positions 173, 155 et 156 ont été mutés par des acides aminés ayant, soit la même polarité, soit la même grosseur de chaîne latérale mais une polarité différente. Le mutant N173D a vu son temps de demie-vie en absence de substrat augmenter de 50 % par rapport à l'enzyme sauvage. La température optimale du mutant R156E était de 5°C supérieure à celle de l'enzyme sauvage. Chez certaines xylanases thermophiles ayant une température optimale supérieure à celle de la XlnA de *S. lividans* on a retrouvé effectivement un glutamate à la position 156 plutôt qu'une arginine. Le remplacement de l'arginine à cette position aurait donc influencé la thermostabilité de l'enzyme. La

substitution de l'asparagine à la position 173 par un aspartate aurait elle augmenté l'hydrophobicité moyenne de la protéine.

La xylanase A de la bactérie thermophile *Caldocellum saccharolyticum* est une autre xylanase de la famille 10 qui a été l'objet de travaux de mutagenèse en vue d'étudier sa stabilité (Lüthi *et al.*, 1992). Par comparaison de séquences d'acides aminés de xylanases thermophiles et mésophiles de la famille 10, les auteurs ont déterminé les régions où les xylanases présentaient une forte similarité de séquence entre elles. Leur but était de déterminer quelles régions étaient importantes pour l'activité et la thermostabilité de la protéine. Pour ce faire, six mutants ont été créés en insérant deux acides aminés supplémentaires près ou dans les régions conservées de la protéine. Le mutant Xyn1 présentait une insertion de deux acides aminés (proline et arginine) à la position 29. Le temps de demie-vie de l'enzyme mutante à 75°C s'est avéré 75 % plus bas que l'enzyme sauvage ce qui était une indication que la région touchée pouvait jouer un rôle dans la thermostabilité de l'enzyme. La comparaison de séquences d'acides aminés entre les xylanases provenant de microorganismes thermophiles par rapport aux mésophiles a fait ressortir la présence plus élevée de résidus chargés conservés chez les enzymes de thermophiles. D'après les auteurs ces résidus ont formés des ponts salins supplémentaires permettant une plus grande stabilité de ces enzymes. Les insertions du mutant Xyn1 auraient perturbé certains de ces liens..

#### 2.5.2 Famille 1:

Parmi les autres enzymes faisant partie du clan GH-A, la  $\beta$ -glucosidase de *Bacillus polymyxa* qui est membre de la famille 1 a aussi été modifiée en vue d'améliorer sa thermostabilité (Lopez-Camacho *et al.*, 1996). Les auteurs ont cette fois-ci utilisé la mutagenèse aléatoire par hydroxylamine suivi d'un criblage intensif afin de sélectionner les mutants les plus stables. Après une heure

d'incubation à 60°C ayant pour effet d'inactiver l'enzyme sauvage, cinq mutants se sont avérés toujours actifs. Le séquençage des gènes mutés a montré une seule mutation présente dans le cas des cinq mutants: E96K. Le temps de demie-vie sans substrat à 48°C était deux fois plus élevé chez ce mutant que chez l'enzyme sauvage. Des analyses par dichroïsme circulaire ont démontré que le contenu en hélices  $\alpha$  du mutant E96K était plus élevé que dans l'enzyme sauvage au détriment du contenu en feuillet  $\beta$ . Une deuxième ronde de mutagénèse aléatoire pratiquée sur le premier gène muté a permis l'émergence d'un double mutant comportant non seulement la première mutation mais aussi la mutation M416I. Cette enzyme présentait encore de l'activité à 70°C quand le mutant E96K était complètement inactivé. Le temps de demie-vie à 48°C de ce double mutant a été de trente fois supérieur à l'enzyme sauvage. Le contenu en structures secondaires par contre, n'a pas varié par rapport au premier mutant. Le remplacement du glutamate par la lysine a pu avoir un effet sur la stabilisation du dipôle d'une hélice  $\alpha$  et la seconde mutation a pu réduire le potentiel d'oxydation engendré par la présence de la méthionine. Les auteurs ont d'ailleurs remarqué que le contenu en cystéines et méthionines des glycosyles hydrolases provenant de microorganismes thermophiles de la famille I était moins élevé que chez les mésophiles et que la  $\beta$ -glucosidase de *B. polymyxa* était la seule à avoir une méthionine plutôt qu'une isoleucine à la position 416 parmi toutes les enzymes de la famille I.

### 2.5.3 Enzymes n'appartenant pas au clan GH-A:

D'autres travaux sur la stabilité des glycosyles hydrolases ont été réalisés avec l' $\alpha$ -amylase (Declerck *et al.*, 1990, 1995, 1997; Joyet *et al.*, 1992) et l'oligo-1,6-glucosidase (Watanabe *et al.*, 1991, 1994 et 1997) deux membres de la famille 13. Malgré le fait que ces deux enzymes ne soit pas membres du clan GH-A leur domaine catalytique est de structure semblable mais le résidu nucléophile est un aspartate au lieu d'un glutamate. Dans le cas de l' $\alpha$ -amylase un mutant a pu être

obtenu en utilisant une combinaison de deux approches précédentes: une comparaison des séquences en acides aminés qui a permis de cibler, en outre, une position stratégique qui a été mutée (H133I) et ensuite une ronde de mutagenèse aléatoire avec le gène du premier mutant pour obtenir un double mutant encore plus stable (H133I/A209V). Ils ont ainsi obtenu un mutant démontrant un temps de demi-vie amélioré de huit fois par rapport à celui de l'enzyme sauvage. Avec l'oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*, les auteurs ont démontré l'importance du rôle des prolines dans la stabilisation de la structure de l'enzyme encore une fois en utilisant comme approche la comparaison des séquences primaires d'enzymes semblables provenant de microorganismes thermophiles. Les enzymes thermostables se sont avérées contenir une quantité plus grande de prolines et les positions occupées par celles-ci étaient: le deuxième résidu des boucles  $\beta$ , le N-cap des hélices  $\alpha$  et dans une moindre proportion à l'intérieur des boucles. Ils ont identifié chez les glucosidases thermostables plusieurs prolines situées à des positions critiques qui ne se retrouvaient pas chez l'oligo-1,6-glucosidase de *B. cereus*. Ces positions ont donc été mutées et l'amélioration de la température de dénaturation pour les enzymes mutantes a été de 0,8°C à 1,4°C.

## 2.6 Objectifs du projet de maîtrise:

Les glycosyles hydrolases présentent un grand intérêt au niveau des industries de pâtes et papier, dans le domaine de l'agriculture, du textile et de l'alimentation. Le groupe de recherche en biotechnologie des streptomycètes de l'Institut Armand-Frappier a cloné, purifié et caractérisé plusieurs de ces enzymes qui sont produites par *Streptomyces lividans* dont la XlnA. La XlnA est responsable de l'hydrolyse du xylane, composant majeur de l'hémicellulose et est particulièrement intéressante pour le bioblanchiment du papier kraft.

De façon à satisfaire les exigences de l'industrie, en particulier celle des pâtes et papier, la XlnA doit pouvoir conserver son activité enzymatique à des conditions de pH et de température qui compromettent son activité et sa stabilité. Pour en faire un biocatalyseur efficace, les propriétés physico-chimiques, en outre la thermostabilité, doivent être améliorées.

La résolution de la structure en trois dimensions de la XlnA de *S. lividans* a permis de démarrer un programme rationnel de mutagenèse dirigée de façon à améliorer la stabilité thermique de l'enzyme . La première approche considérée par le groupe pour améliorer la thermostabilité de l'enzyme fut la comparaison entre les séquences primaires d'acides aminés des domaines catalytiques de xylanases provenant de microorganismes thermophiles de la famille 10 et celles du domaine catalytique de la XlnA de *S. lividans*. Ceci a permis d'identifier les résidus qui pourraient être responsables de la thermostabilité accrue des enzymes provenant des thermophiles. Ainsi, il a été possible d'identifier 7 positions pouvant être ciblées pour la mutagenèse qui ont fait l'objet de la première partie mon projet de maîtrise (11 mutants en tout) (Figure 9). La mutagenèse a ensuite été effectuée par la méthode de Kunkel (Roberge, 1994 ; Kunkel *et al.*, 1985).

Les objectifs principaux du projet sont d'utiliser la mutagenèse dirigée pour améliorer la thermostabilité de la XlnA de *S. lividans* sans en compromettre l'activité et aussi d'étudier les facteurs contribuant à la stabilité de la structure en tonneau  $(\alpha/\beta)_8$  en utilisant le domaine catalytique de la XlnA comme modèle.

### 2.6.1 Objectifs principaux:

À partir des conclusions qui auront pu être tirées de cette étude, il sera possible de développer une méthodologie d'ingénierie applicable à toutes les protéines présentant ce type de structure pour ainsi en améliorer la stabilité.

### 2.6.2 Objectifs spécifiques:

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de produire le simple brin servant à séquencer (service de séquençage) les gènes mutés de la XlnA à partir des phagemides ayant servi à la mutagenèse dirigée de façon à s'assurer de la présence des mutations, sous-cloner les gènes mutés dans un vecteur d'expression pouvant se dans *S. lividans*. La présence de la mutation était reconfirmée par la suite par séquençage de façon à s'assurer aussi que le reste du gène ne comporte aucune autre mutation. Les enzymes mutantes étaient ensuite produites et purifiées et enfin caractérisées. Dans le cas où certaines mutations se sont avérées intéressantes des doubles mutants ont été générés dans le but de vérifier s'il existe un effet d'additivité ou de synergie des effets positifs sur la thermostabilité de la XlnA.

**Figure 9. Alignement de séquences primaires de xylanases thermophiles de la famille 10 avec la XlnA de *S. lividans*. Les positions mutées sont indiquées par des flèches. L'alignement a été effectué avec CLUSTALW (Thompson et al, 1994).**



# **APPROCHE EXPÉRIMENTALE**

### 3.1 Produits chimiques:

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

### 3.2 Microorganismes

#### 3.2.1 *E. coli* DH11S

La souche DH11S (*mcrA*,  $\Delta(mrrRMSmcrBC)$ ,  $\Delta(lac^-proAB)$ ,  $\Delta(recA1398)$ , *deoR*, *rpsH*, *srI*, *thiIF*, *proAB*<sup>+</sup>, *lacI9Z*  $\Delta M15$ ) a été utilisée comme souche hôte pour le phagemide pIAF831 et 832 contenant les gènes mutés de la XlnA tronquée et de la XlnA<sub>2</sub> respectivement. Cette souche a aussi servi comme bactérie hôte des phages M13mp18 et M13mp19 pour la production d'ADN monocaténaire.

##### 3.2.1.1 Conditions de culture et conservation des souches

Toutes les cultures de *E. coli* DH11S ont été faites à 37°C dans le milieu 2xTY (Annexe II) avec agitation à 240 rpm lorsque liquides et le cas échéant les antibiotiques ampicilline et kanamycine étaient ajoutés à raison de 100 µg/mL final.

Les souches de *E. coli* ont été conservées soit sur milieu solide 2xTY ou dans une solution stérile contenant 20% de glycérol dans l'eau distillée.

### 3.2.1.2 Préparation de cellules compétentes de *E. coli* DH11S

À partir d'une pré-culture de 18 heures, une dilution 1/10 dans le milieu 2xTY a été effectuée et celle-ci a été réincubée jusqu'à une croissance exponentielle indiquée par une absorbance entre 0,25 et 0,50 à une longueur d'onde de 600 nm. La culture a ensuite été incubée sur glace 15 minutes et centrifugée à 1100 g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans le tampon CB1 (Annexe III) (1/2 du volume initial de la culture), le tout laissé sur glace 1 heure et ensuite recentrifugé aux mêmes conditions. Le culot obtenu a été resuspendu dans le tampon CB2 (Annexe III) (1/25 du volume initial de la culture) et laissé sur glace 15 minutes. Les cellules compétentes ont ensuite été aliquotées (300 µL) dans des tubes Eppendorf stériles et gardées à -80°C.

### 3.2.2 *S. lividans* 10-164

La souche *S. lividans* 10-164 (MsiK), sans activité xylanolytique et cellulolytique, a été produite par mutagenèse de la souche sauvage *S. lividans* 1326 avec le *N*-méthyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (Mondou *et al.*, 1986). Contenant une mutation dans le gène de la protéine MsiK, cette souche est déficiente dans le transport à l'intérieur de la cellule du cellobiose et du xylobiose, inducteurs présumés de l'expression des gènes de cellulases et xylanases. Le changement d'un acide aspartique par une asparagine empêcherait la liaison et l'hydrolyse de l'ATP alors l'énergie nécessaire à l'entrée des disaccharides dans la cellule ne serait donc pas fournie (Hurtubise *et al.*, 1995).

Cette souche a servi de bactérie hôte pour les plasmides recombinants dans lesquels ont été insérés les gènes mutants de la XlnA<sub>1r</sub> et de la XlnA<sub>2</sub>.

### 3.2.2.1 Conditions de culture et conservation des souches

Le milieu minimal utilisé pour les cultures liquides est le M14-xylose 1% (Annexe IV). Le milieu Bennett (Annexe V) solide a été utilisé pour la sporulation des souches et le milieu Remazol-Brilliant-Blue (RBB)-xylane (Annexe VI) pour le criblage par activité xylyanolytique des bactéries recombinantes. Dans tous les cas, l'antibiotique thiostreptone (dilué dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO)) a été ajouté au milieu à raison de 5 µg/mL. Les cultures ont été incubées à 34°C et les cas échéant soumises à une agitation de 240 rpm.

Les souches de *S. lividans* ont été conservées soit sur milieu solide Bennett avec thiostreptone ou lyophilisées. Pour la lyophilisation, une suspension de spores a été préparée avec une solution de lait écrémé 10% (p/v) et déposée dans des ampoules de verre stériles. Après lyophilisation, les ampoules ont été scellées sous vide et conservées à -4°C. Le mycélium a été conservé dans une solution de glycérol 20% (v/v) dans l'eau distillée stérile et congelé à -20°C.

## 3.3 Phagemides et plasmides

### 3.3.1 Phagemide pIAF831

Le phagemide pIAF831 contenant le gène *xlnA* tronqué a été utilisé pour la mutagenèse dirigée. Dérivé du phagemide pTZ19U il porte un gène de résistance à l'ampicilline (*amp*), une origine de réplication phagique (*f<sub>1</sub>IG*) et une origine de réplication dans *E. coli* (*Ori*).

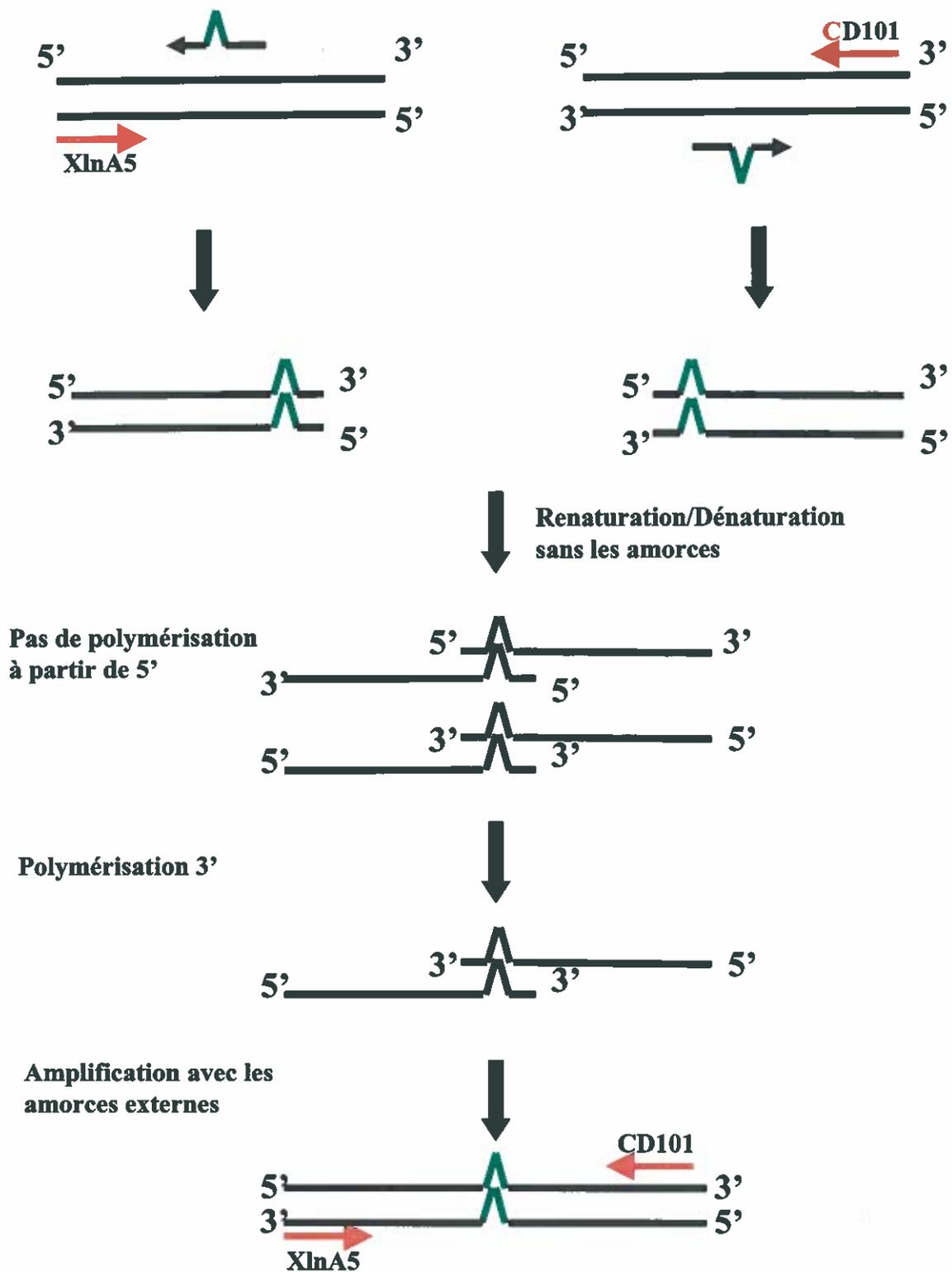
### 3.3.2 Plasmides pIAF906 et pC109

Dérivés du plasmide multicopie pIJ702 (Katz *et al.*, 1983), les plasmides pIAF906 (Pagé *et al.*, 1996) et pC109 (François Shareck, communication personnelle) contiennent un gène de résistance au thiostreptone (*tsr*), le gène de la tyrosinase (*mel*) permettant la production de mélanine et une origine de répllication dans *S. lividans*. De plus, le plasmide pC109 contient un promoteur insensible à la répression par le glucose. Ces plasmides ont été utilisés comme vecteurs pour la production des XlnA<sub>r</sub> (308 acides aminés) et XlnA<sub>2</sub> (302 acides aminés ; P. Jodoin résultats non publiés) dans *S. lividans*.

## 3.4 Manipulations de l'ADN

### 3.4.1 Mutagenèse dirigée par PCR

La mutagenèse dirigée du gène *xlnA<sub>2</sub>* pour les doubles mutants a été effectuée par PCR. Deux amorces internes portant la mutation ont été utilisées pour amplifier le gène à muter. Dans un premier temps, l'extrémité 3' du gène a été amplifiée à l'aide d'une amorce mutagène et d'une amorce externe. Parallèlement, dans un autre microtube Eppendorf, l'extrémité 5' a été amplifiée de la même façon. Les deux produits de PCR ont ensuite été combinés et soumis à une série d'hybridations et de dénaturations de façon à apparier les brins complémentaires ce qui a permis ensuite à la polymérase de synthétiser le gène muté en entier (Figure 10) .



**Figure 10. Méthode de mutagenèse dirigée par PCR.** Les extrémités du gène sont d'abord amplifiées séparément en présence d'amorces mutagènes et externes. Après une étape de renaturation et dénaturation l'amplification du gène a lieu en direction de l'extrémité 3'.

### 3.4.2 Amplification élective *in vitro*

L'amplification élective *in vitro* (PCR) a été effectuée dans les conditions suivantes: le milieu réactionnel était composé de 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) Triton X-100, 100µg/mL de nucléase exempte d'albumine de sérum bovin (BSA), 10 mM de chacun des nucléotides (A (adénine), G (guanine), C (cytosine), T (thymine)), 0,05% (v/v) de Tween 20, 4% (v/v) de propionamide, 10 fmol de matrice, 50 pmol de chaque amorce et de 2.5 U de polymérase *Pfu*. Cent µL d'huile minérale ont ensuite été ajoutés pour limiter l'évaporation. Le PCR a été effectué à l'aide d'un appareil de la compagnie Perkin Elmer modèle 480. La matrice d'ADN a ensuite été dénaturée pendant 5 minutes à 95°C, ensuite les oligonucléotides correspondants ont été hybridés à la matrice et le tout a ensuite été dénaturés à 55°C pendant 5 minutes. Il y a eu par la suite polymérisation d'un nouveau brin à 72°C pendant 3 minutes. Par la suite, le cycle suivant a été répété 30 fois: dénaturation à 94°C pendant 1 minute, hybridation à 55°C pendant 1 minute, polymérisation à 72°C pendant 3 minutes. Le tout s'est terminé par une polymérisation finale à 72°C pendant 10 minutes.

### 3.4.3 Purification du produit de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés avec la trousse de Boehringer Mannheim. Partant du principe que les acides nucléiques se lient spécifiquement aux surfaces de verres ou de silice en présence d'un sel chaotrope, l'échantillon en présence de ces sels est déposé sur une colonne et éluée avec un tampon 10mM Tris/HCl pH 8,5 de façon à obtenir un produit purifié exempt de sels, de nucléotides et de protéines. Les produits de PCR ont pu aussi être purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose à l'aide de la trousse Band-Prep de Pharmacia ( Voir section 3.4.7).

### 3.4.4 Extraction et purification de l'ADN plasmidique

#### 3.4.4.1 *E. coli*

À partir des souches contenant le phagemide pIAF831 portant les gènes mutés de la XInA tronquée, 1,5 mL de milieu 2xTY-Ampicilline (100 µg/ml) a été inoculé et incubé 16 heures. Les phagemides ont ensuite été extraits à l'aide de la trousse Flexi-Prep (Pharmacia). Les cellules sont d'abord suspendues dans une solution isotonique contenant de la RNase A et subissent ensuite une lyse alcaline. L'ADN chromosomique, les débris cellulaires et les protéines sont précipitées sélectivement par l'ajout d'une solution d'acétate de potassium tandis que l'ADN plasmidique reste en solution. La purification se fait à l'aide de billes Séphaglas<sup>TM</sup> qui lie l'ADN. L'élution s'effectue par l'ajout de tampon TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8,0). Les phagemides sont conservés à -20°C dans le tampon TE pH 8,0.

#### 3.4.4.2 *S. lividans*

Le contenu d'une ampoule de la souche lyophilisée IAF906 a été inoculé dans 12,5 mL de milieu M14-xylose 1%. Après incubation pendant 24 heures, le mycélium a été isolé par centrifugation à 6,000 g pendant 10 minutes (température de la pièce) et transféré dans 100 mL de milieu M14 minimal. Après incubation 24 heures le mycélium a de nouveau été isolé comme précédemment.

L'ADN plasmidique a été extrait selon la méthode de Hopwood (1985). Le culot de mycélium a été lavé avec 5 volumes (équivalent à 5 volumes initiaux de mycélium) de solution I (Annexe VII), centrifugé à 16,000 g (température de la pièce) et resuspendu dans un même volume de solution de lysozyme (2mg/ml de solution I) pour ensuite être incubé 60 minutes à 37°C. La lyse alcaline (Solution II; Annexe VII) a ensuite été effectuée en présence de 120 µM de NaOH et 0,4 %

(p/v) final de SDS à 70°C durant 20 minutes et le tout a été refroidi lentement jusqu'à température de la pièce. Un volume (1 fois le volume initial de mycélium) d'une solution de phénol acide (solution III; Annexe VII) a été ajouté pour permettre la renaturation de l'ADN plasmidique et la précipitation des protéines et de l'ADN chromosomique monocaténaire. Après centrifugation de 10 minutes à 16,000 g (température de la pièce) la phase aqueuse (7 fois le volume initial de mycélium) clarifiée, a été mise en présence d'un volume égal d'isopropanol, additionné d'acétate de sodium 3 M à une concentration finale de 150 mM. Le tout a été incubé à la température de la pièce pendant 5 minutes. Après centrifugation de 10 minutes, l'ADN précipité a été dissout dans du tampon TE (0,5 fois le volume initial de mycélium) en présence de 0,3 M d'acétate de sodium. Un demi-volume de phénol neutre a été ajouté et après centrifugation de 3 minutes, la phase aqueuse a été combinée à un volume égal d'isopropanol et incubée à la température de la pièce 5 minutes. Après centrifugation de 10 minutes (température de la pièce), l'ADN plasmidique précipité a été dissout dans 50 µL d'eau distillée stérile. L'ADN plasmidique a été quantifié par spectroscopie à 260 nm.

### 3.4.5 Extraction et purification de l'ADN monocaténaire

#### 3.4.5.1 À l'aide de M13mp18 et M13mp19

Le génome du phage M13 qui a été utilisé, a été modifié par Messing *et al*, (1977) de façon à y insérer un site de clonage multiple, une section en 5' adjacente à celui-ci permettant l'hybridation avec l'amorce universelle et une partie du gène *lacZ* utilisé pour la sélection. Celle-ci s'effectue à l'aide de l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal), un galactoside qui une fois clivé par la β-galactosidase, passe de l'incolore au bleu. Ainsi lorsque qu'un fragment d'ADN a été inséré dans le site de clonage

multiple situé dans le gène *lacZ* celui-ci ne peut plus exprimer la  $\beta$ -galactosidase et le clivage de X-Gal n'a pas lieu. Les plages restent blanches.

Les variantes de M13 qui ont été utilisées ici soit M13mp18 et M13mp19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ne différaient que par l'orientation du site de clonage multiple permettant alors la production des deux brins complémentaires du gène.

Après extraction et digestion appropriée, une ligation a été effectuée en présence des formes répliquatives (ADN bicaténaire) des phages M13mp18 et M13mp19 digérées avec les mêmes endonucléases de restriction ainsi que des inserts à séquencer.

Le produit de ligation a été inséré par transformation dans *E. coli* DH11S. À 300  $\mu$ L de cellules compétentes ont été ajoutés 10  $\mu$ L du produit de ligation et incubés sur glace 40 minutes. Les cellules ont ensuite subi un choc thermique par incubation à 42°C pendant 2 minutes.

#### 3.4.5.1.1 Formation des plages de lyse

À partir d'une culture pré-culture de 16 heures, une culture de *E. coli* DH11S diluée 1/100 dans le milieu 2xTY a été préparée et incubée 3 heures. À 300  $\mu$ L de cette culture ont été ajoutés de l'IPTG (3 mM) et du X-Gal (2% dans le *N,N*-Diméthylformamide(DMF) 0,3 % (v/v) concentration finale). Dans 3 mL de gélose molle (Annexe VIII), 360  $\mu$ L de ce mélange ainsi que 150  $\mu$ L de cellules transformées ont été incorporés. Le tout a été étalé sur milieu H (Annexe IX) et incubé à 37°C pendant 16 heures.

#### 3.4.5.1.2 Extraction de l'ADN simple brin

Les plages blanches ont ensuite été repiquées avec un cure-dent stérile et inoculées individuellement dans 1,5 ml de cellules préparées à partir d'une pré-

culture de *E. coli* DH11S en phase logarithmique. Le tout a été incubé 6 heures. Toutes les centrifugations ont été effectuées à la température de la pièce. Après centrifugation à 16,000 g pendant 10 minutes le surnageant a été mis en présence de PEG 6000 4 % (p/v) et de NaCl 0,5 M et incubé à 4°C pendant 16 heures. Après centrifugation, le culot de phages obtenu a été resuspendu dans 100 µL de tampon TE pH 8,0. Cinquante µL de phénol saturé en TE pH 8,0 a ensuite été ajouté et le mélange (après agitation au vortex) incubé à température de la pièce pendant 15 minutes. Cinquante µL de chloroforme a été ajouté et le tout incubé à température de la pièce pendant 5 minutes puis centrifugé à 16,000 g pendant 1 minute. Le processus a été répété au besoin jusqu'à obtention d'une interface phase aqueuse/phase organique dénuée de protéines. L'ADN contenu dans la phase aqueuse a été précipité en présence de 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) et 0,1 volume d'acétate de sodium 0,15 M et incubé 15 minutes à -70°C. Après centrifugation (10 minutes à 16,000 g), le culot d'ADN a été resuspendu dans 20 µL d'eau stérile. La pureté de l'ADN monocaténaire a aussi été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% (p/v).

#### 3.4.5.1.3 Analyse à la nucléase $S_1$

Deux µL de solution d'ADN monocaténaire contenant un brin du gène à séquencer a été mélangé à 1 µL de solution d'ADN complémentaire, additionné de NaCl à 2 µM final et le volume complété à 8 µL avec de l'eau distillée stérile. Le tout été incubé à 90° C 3 minutes et refroidi lentement à température de la pièce. Une unité de nucléase  $S_1$  a ensuite été ajoutée et le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 37°C. Le produit de la digestion a été mis sur gel d'agarose 0,7 % (p/v) pour vérifier la présence d'une bande correspondant à la taille de l'insert qui représente le gène à séquencer. La nucléase  $S_1$  digère l'ADN

monocaténaire mais non le bicaténaire. Où il y a eu hybridation, l'ADN donc a été protégé de la digestion.

#### 3.4.6 Séquençage

Le séquençage de l'ADN monocaténaire a été effectué par la méthode des didéoxy de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) à l'aide d'amorces internes en utilisant le Séquenceur automatique ALF (Automated Laser Fluorescence) de Pharmacia (service de séquençage de l'IAF).

#### 3.4.7 Digestion enzymatique

L'ADN plasmidique de pIAF906 a été digéré en présence successivement de 4 U d'endonucléase *Hind*III et de 2 U d'endonucléase *Sac*I dans un volume réactionnel total de 20  $\mu$ L selon le protocole du fabricant (Pharmacia) en présence de tampon One-Phor-All (Pharmacia; 10 mM Tris-acétate pH 7,5; 10 mM Acétate de magnésium; 50 mM Acétate de potassium) 1X. L'ADN plasmidique de pIAF932 (pC109 avec l'insert) a été digéré avec les enzymes *Sph*I et *Sac*I à raison de 2 U chacune dans les mêmes conditions réactionnelles. Le tout a été incubé 3 heures à 37°C et le produit de digestion mis sur gel d'agarose 0,7 (p/v) %. Les bandes correspondant aux poids moléculaires attendus (1,2 kb pour les inserts contenant le gène de la *XlnA<sub>1r</sub>*, 1 kb pour les inserts correspondant au gène de la *XlnA<sub>2</sub>*, 6 kb pour le vecteur pIAF906 et 7 kb pour les vecteurs phagiques M13mp18 ou M13mp19) ont été découpées et l'ADN extrait de l'agarose à l'aide de la trousse Band-Prep de Pharmacia. Brièvement l'agarose a d'abord été solubilisée à l'aide d'une solution d'iodure de sodium. Le Sephaglas<sup>TM</sup> a ensuite été ajouté pour purifier l'ADN et l'élution s'est faite avec le tampon TE pH 8,0. L'ADN a été conservé dans le tampon TE et congelé à -20°C.

### 3.4.8 Ligation

Pour le sous-clonage du gène de la  $XlnA_{tr}$  et de la  $XlnA_2$  de *E. coli* vers *S. lividans* et pour la fabrication de simple brin, les inserts portant le gène ont été mis en présence d'une quantité de vecteur (pIAF906, pC109, M13mp18 ou M13mp19) en respectant un rapport insert:vecteur de 10:1. La réaction a eu lieu en présence d'une unité de d'ADN T4 ligase (Pharmacia), d'ATP 1mM et de tampon One-Phor-All 1X selon le protocole du fabricant, dans un volume final réactionnel de 20  $\mu$ L. Le tout a été incubé à la température de la pièce deux heures. Un contrôle négatif a été fait en parallèle en remplaçant l'insert dans le mélange par de l'eau distillée stérile.

### 3.4.9 Électrophorèse sur gel d'agarose

Toutes les électrophorèses ont été effectuées sur gel horizontal de 0,7% (p/v) d'agarose dans le tampon d'électrophorèse TBE (Tris-Acide borique-EDTA) (Annexe X). Le tampon de chargement (Annexe X) a été ajouté à raison de 3  $\mu$ L/20  $\mu$ L et les conditions de migration ont été de 100-200 V/h ou 25 volts pendant 16 heures.

### 3.4.10 Transformation

#### 3.4.10.1 Cellules compétentes de *E. coli*

À 300  $\mu$ L de cellules compétentes 10  $\mu$ L de produit de ligation ont été ajoutés et le tout a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite subi un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes puis 1 ml de milieu 2xTY avec ampicilline (100  $\mu$ g/mL) a été ajouté. Après incubation pendant 30 minutes, 50, 100 et 200  $\mu$ L de culture ont été étendus uniformément sur un milieu solide 2xTY avec ampicilline et incubés pendant 16 heures.

#### 3.4.10.2 Protoplastes de *S. lividans* 10-164

La transformation a été effectuée selon Hopwood (1985). À 50  $\mu\text{L}$  de protoplastes, 10  $\mu\text{L}$  du produit de ligation ont été ajoutés ainsi que 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de PEG 1500 et le tout a été incubé pendant 2 minutes à la température de la pièce. Les protoplastes transformés ont ensuite été étalés sur milieu R5 (Annexe XI) et incubés 16 heures à 34°C. Ensuite 0,5 mg de thiostreptone préalablement dilué dans l'eau stérile a été réparti uniformément sur chacun des Pétris et le tout réincubé à 34°C jusqu'à la croissance de colonies (72 heures).

##### 3.4.10.2.1 Criblage des recombinants

Les colonies ayant poussées sur le milieu R5 ont été repiquées à l'aide d'un cure-dent stérile sur un milieu RBB-xylane et incubées pendant 48 heures. La présence d'activité xylanolytique a été détectée par la formation d'une zone claire autour des colonies indiquant l'hydrolyse du xylane. Ces dernières ont alors été repiquées sur un milieu Bennett avec thiostreptone en vue de les faire sporuler.

#### 3.5 Production des enzymes mutantes

Après ensemencement sur milieu Bennett solide en présence de thiostreptone et incubation pendant 7 jours jusqu'à sporulation, une suspension de spores a été préparée et utilisée pour inoculer 25 mL de milieu M14-xylose 1% (p/v) . Après incubation pendant 24 heures, le mycélium a été isolé par centrifugation à 6,000 g (température de la pièce), transféré dans 50 mL de milieu M14-xylose 1 % (p/v) et le tout a été réincubé pendant 48 heures. Le mycélium recueilli à partir de cette pré-culture a été homogénéisé et a ensuite servi à inoculer 500 mL de milieu M14-xylose 1% (p/v). Après incubation pendant 24 heures , 4,5 L de milieu M14-xylose 1% (p/v) ont été inoculés avec 10 % (v/v) du

mycélium recueillis et le tout réincubé 72 heures. Le surnageant a ensuite été filtré sur papier filtre Whatman no. 1.

### 3.6 Manipulations des protéines

#### 3.6.1 Dosage des protéines

##### 3.6.1.1 Méthode de Bradford

La méthode de Bradford (Bradford *et al.*, 1976) a été utilisée pour obtenir une approximation rapide des protéines totales à certaines étapes de la purification.

Une courbe standard de 0 à 22  $\mu\text{g/mL}$  a été effectuée en utilisant la  $\gamma$ -globuline de plasma bovin (Bio-Rad). Le réactif «Bio-Rad Protein Assay» a été ajouté selon les instructions du fabricant à tous les échantillons et solutions standard. Après incubation pendant 15 minutes à la température de la pièce, l'absorbance a été lue à 595 nm.

##### 3.6.1.2 Méthode de Lowry

La méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) a été utilisée pour évaluer la quantité de protéines totales à chaque étape de purification.

Une courbe standard utilisant l'albumine sérique bovine (Bio-Rad) à des concentrations allant de 0 à 109,6  $\mu\text{g/mL}$  a été faite. Dans un premier temps, 500  $\mu\text{L}$  de solution I (Annexe XII) ont été ajoutés à 500  $\mu\text{L}$  d'échantillons (volume et solutions standards). La solution II (Annexe XII) a ensuite été ajoutée à raison de 200  $\mu\text{L}$  par tube pour une concentration finale de 20 % (v/v) et le tout a été

vortexé et incubé à température de la pièce pendant 15 minutes. Le réactif de Folin (Bio-Rad), a ensuite été ajouté à raison de 375  $\mu\text{L}$  pour une concentration finale de 31 % (v/v) (la solution de Folin ayant été préalablement diluée dans l'eau dans un ratio 3:1). Le tout a ensuite été incubé à température de la pièce pendant 15 minutes et l'absorbance lue à 700 nm.

### 3.6.2 Purification des enzymes mutantes

#### 3.6.2.1 Ultrafiltration à débit tangentiel

Après filtration sur papier filtre Whatman No. 1 l'ultrafiltration à débit tangentiel a été utilisée comme première étape de purification de l'enzyme mutante et pour concentrer le surnageant de la culture de 4,5 L de *S. lividans*

L'ultrafiltration a été effectuée à l'aide de la cassette Pall Filtron (membranes (Omega) ayant une porosité supérieure de 3 kDa) et du système Pellicon (Millipore). Après un premier lavage des membranes à l'eau Milli-Q suivi d'un lavage au tampon Bis-Tris propane 20 mM pH 7,0, le surnageant a été concentré environ 15 fois. Les membranes, après avoir été nettoyées avec une solution de NaOH 1 M, ont été rincées avec le tampon initial jusqu'à obtention d'un pH de 7. Après un dernier lavage à l'eau Milli-Q tout le système de filtration a été conservé dans la formaldéhyde jusqu'à une prochaine utilisation. Les surnageants contenant la  $\text{XlnA}_2$  ont été traités de la même façon mais le tampon citrate 50 mM pH 6 a été utilisé pour laver les membranes.

#### 3.6.2.2 Dialyse

##### 3.6.2.2.1 $\text{XlnA}_r$

Le surnageant concentré a été dialysé à l'aide de membranes de porosité de 6 à 8 kDa contre 2 mM de tampon Bis-Tris propane pH 7 à 4°C pendant 16 heures.

#### 3.6.2.2.2 XlnA<sub>2</sub>

Le surnageant de culture concentré par ultrafiltration à débit tangentiel a été distribué dans des sacs à dialyse SpectraPor (Spectrum) de porosité de 3,5 kDa et la solution a été dialysée 16 heures contre 20 litres de tampon acétate 10 mM, pH 4,0 à 4°C.

#### 3.6.2.3 Chromatographie sur échangeuse d'ions

##### 3.6.2.3.1 XlnA<sub>r</sub>

Une première chromatographie a été effectuée par HPLC à l'aide de la colonne DEAE Protein Pak 5 PW (21,5mm x 15 cm) de Waters (Millipore). La colonne a été équilibrée en faisant d'abord circuler le tampon Bis-Tris propane 20 mM contenant 1 M NaCl pendant 1 heure à un débit de 4 ml/min. et ensuite le même tampon sans NaCl pendant 16 heures à un débit de 0,3 ml/min. Les tampons ont tous été filtrés à l'aide de membranes de 0,2 µm.

L' échantillon protéique contenant 200 mg de protéines totales préalablement filtré sur filtre de 0,2 µm a été injecté à un débit de 48 cm/h. La conductivité ainsi que le pH de l'échantillon et du tampon ont été vérifiés avant l'injection. Après l'adsorption de l'échantillon un lavage a été effectué en faisant circuler le tampon sans NaCl à 60 cm/h et ensuite les protéines ont été éluées à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M durant 45 minutes (Tableau 3). L'éluion des protéines a été suivie tout au long de la chromatographie par l'absorbance à 280 nm à l'aide du détecteur Waters Model 441 et les fractions

collectées à raison de 1 ml/tube avec le collecteur de fraction BioRad Model 2128. Les fractions contenant la  $XlnA_{tr}$  ont été combinées et le tout a été concentré à l'aide d'une membrane de porosité 3 kDa de type OMEGA<sup>TM</sup> (Filtron) sur un système AMICON modèle 8200.

**Tableau 3 : Programme d'élution de la  $XlnA_{tr}$  sur la colonne DEAE-5PW de Waters. L'éluant A est le tampon Bis-Tris Propane 20 mM pH 7 et l'éluant B est le tampon Bis-Tris Propane 20 mM pH 7 auquel 1M de NaCl a été ajouté.**

Temps (min.)	Débit (cm/h.)	% A	% B
Initial	0	100	0
2	48	100	0
70	120	100	0
110	120	80	20
115	120	0	100
145	120	0	100
150	120	100	0
180	120	100	0
185	6	100	0

#### 3.6.2.3.2 $XlnA_2$

La chromatographie sur colonne échangeuse de cations carboxy méthyl sépharose AP2 (WATERS) (2,0 cm x 10 cm) a été effectuée avec le système FPLC de Waters (Millipore) modèle 625 LC. Avant l'adsorption de l'échantillon, la colonne a été équilibrée dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,0, à un débit de 1cm/min. Un échantillon d'environ 200 mg filtré à 0,2 $\mu$ m a ensuite été adsorbé sur la colonne à un débit de 60 cm/h. Un lavage de la colonne a ensuite

été effectué avec le tampon acétate 50 mM, pH 4,0 à un débit de 60 cm/h pour éliminer les protéines ne s'accrochant pas à celle-ci. Les protéines ont ensuite été éluées à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 1 M durant 55 minutes (Tableau 4).

**Tableau 4: Programme d'éluion de la xylanase A2 sur la colonne CM-sépharose AP2. L'éluant A est le tampon acétate 50mM pH6 et l'éluant B est le même tampon avec 1 M NaCl.**

Temps (min)	Débit (cm/h)	% A	% B
Initial	60	100	0
5	60	100	0
50	60	50	50
60	60	0	100
90	60	0	100
100	60	100	0
120	6	100	0

Les fractions ont été récupérées à l'aide du collecteur de fractions Frac-300 de Pharmacia Fine Chemicals. L'éluion des protéines a été suivie par absorbance à 280 nm sur le détecteur UV de Waters modèle 484. Les fractions contenant la xylanase A<sub>2</sub>, déterminées par SDS-PAGE (section manipulations des protéines) et par le profil d'éluion, ont ensuite été réunies et concentrées sur une membrane de porosité de 3 kDa de type OMEGA<sup>TM</sup> de la compagnie Filtron avec le système Amicon modèle 8200.

#### 3.6.2.4 Chromatographie sur tamis moléculaire

La chromatographie sur tamis moléculaire a été effectuée à l'aide de la colonne Superdex 75 HR de Pharmacia LKB (2,5 cm x 70 cm) ayant une limite inférieure et supérieure de 3 kDa à 70 kDa. L'échantillon protéique a été injecté à

l'aide de l'injecteur Pharmacia et la phase mobile était le tampon phosphate 100 mM pH 6 et circulait à un débit de 1 ml/min. L'élution a été suivie par absorbance à 280 nm à l'aide du détecteur Pharmacia UV-1 et les fractions collectées à raison de 2 ml/fraction avec le collecteur Pharmacia LKB Frac-100. Les fractions contenant la XlnA<sub>r</sub> (vérifiées par SDS-PAGE) ont été combinées et concentrées sur membrane Amicon de façon à remplacer par dilutions successives (1/100,000) le tampon phosphate par de l'eau Milli-Q (3 lavages) en vue de lyophiliser la protéine pure.

#### 3.6.2.5 Électrophorèse SDS-PAGE

Pour déterminer la présence de XlnA2 dans les fractions recueillies lors de la chromatographie échangeuse d'anions et de la chromatographie sur tamis moléculaire, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été utilisée.

Les gels d'électrophorèse ont été faits d'après la méthode de Laemmli *et al.*, (1970) à 12 % T, 2,67 % C pour le gel de séparation et 4 % T, 2,67 % C pour le gel d'empilement en utilisant le Mini Protean Cell II de BioRad. À 15 µl d'échantillon protéique, du tampon de chargement 5X (Annexe XIII) a été ajouté pour une concentration finale de 1X. Les échantillons ont ensuite été bouillis pendant 7 minutes avant d'être chargés. La migration a eu lieu à 200 volts pendant 45 minutes (160 v/h) en présence de tampon d'électrophorèse 1X (Annexe XIII). Les gels ont ensuite été colorés au Bleu de Coomassie R250 et conservés dans une solution de glycérol 1% v/v dans l'eau distillée et NaN<sub>3</sub> 1mM.

### 3.6.3 Caractérisation des enzymes mutantes

#### 3.6.3.1 Détermination des sucres réducteurs par le test de PAHBAH (*p*-hydroxybenzoïc acid hydrazide)

Le test PAHBAH (Lever, 1984) a été utilisé pour déterminer la quantité de sucres possédant une extrémité réductrice générée par l'hydrolyse du xylane par la XlnA<sub>2</sub>. Ce test est basé sur la réaction en milieu alcalin et en présence de chaleur, du PAHBAH avec l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. Cette réaction produit un chromophore jaune dont l'absorbance peut être lue à 405 nm.

Cent µl du milieu réactionnel (enzyme et substrat ayant réagi) ont été ajoutés à 300 µl de PAHBAH 0,25 % dans le NaOH 0,5N (ou 1:3; volume réactionnel:PAHBAH 0,25%) préalablement déposés dans des tubes Titertek de 1 ml. Les tubes ont ensuite été incubés 5 minutes à 95°C pour permettre la réaction et ensuite refroidit sur glace et eau 5 minutes. Par la suite, 200 µl du mélange ont été prélevés de chaque Titertek et déposés dans des microplaques. L'absorbance a ensuite été lue à 405 nm à l'aide du lecteur Microplate Autoreader Bio-Tek Instruments EL 309.

#### 3.6.3.2 Détermination de l'activité spécifique des enzymes mutantes

L'activité spécifique des mutants a été déterminée en utilisant le xylane de bouleau comme substrat.

Une courbe standard de xylose a été effectuée pour des concentrations de 0 à 1,00 mM. La réaction s'est faite dans un volume final de 1 ml contenant 900 µL de 5 mg/ml de xylane de bouleau (4,5 mg/ml final) dans le tampon citrate de sodium 50 mM pH6 et a été amorcée par l'ajout au substrat préincubé de 100 µL d'une solution de 3 µg/ml d'enzyme. La température était de 60°C et le temps de

réaction de 10 minutes. Tous les tests ont été effectués en triplicata. Des tubes témoins ont été effectués en remplaçant l'enzyme par 100  $\mu$ L de tampon citrate.

#### 3.6.3.3 Détermination de la température optimale d'hydrolyse

Les concentrations d'enzymes et de substrat qui ont été utilisées étaient les mêmes que celles utilisées pour la détermination de l'activité spécifique. La réaction s'est effectuée aux mêmes conditions que plus haut mais à des températures de: 31, 41, 51, 55, 60, 71, 80 °C. La concentration de PAHBAH a été augmentée à 0,5 % (p/v).

#### 3.6.3.4 Détermination de la stabilité des mutants en absence de substrat

Une quantité suffisante d'enzyme à une concentration de 500  $\mu$ g/ml a été préincubée à une température donnée (60 et 70°C) et des prélèvements ont été effectués à différents temps. Ces prélèvements ont été déposés dans un volume de tampon citrate de sodium de façon à avoir la même concentration finale d'enzyme que celle utilisée pour la détermination de l'activité spécifique (3  $\mu$ g/ml) et le tout a été déposé à 4°C (glace et eau). L'activité enzymatique résiduelle a ensuite été déterminée, en triplicata pour tous les prélèvements, dans les mêmes conditions qu'en 3.6.3.2. La concentration de PAHBAH était de 0,5 % (p/v). Le temps de demi-vie qui est le temps d'incubation où l'on retrouve 50 % de l'activité résiduelle de l'enzyme, a ensuite été déterminé à partir d'une régression linéaire du ln de l'activité relative en fonction du temps d'incubation.

#### 3.6.3.5 Détermination de la stabilité en présence de substrat

Le temps de demi-vie a été évalué en incubant une solution d'enzyme de 1  $\mu$ g/ml dans du tampon citrate 50 mM et pH 6 en présence de 7,2 mg/ml final de

xylane de bouleau dans un volume final de 1,5 ml. Le substrat a d'abord été préincubé à la température nécessaire pour le test (60, 70°C) et 150 µL de la solution d'enzyme a ensuite été ajouté pour débiter la réaction enzymatique. À différents temps des prélèvements de 100 µL ont été effectués et déposés dans 300 µL de PAHBAH 0,25 % (p/v). La quantité de sucres réducteurs a ensuite été déterminée comme plus haut et portée sur un graphique de la quantité de sucres réducteurs en mM en fonction du temps de réaction. Le temps de demi-vie correspondant à la production de 50% de sucres réducteurs a été évalué à partir d'une régression non linéaire.

### 3.6.3.6 Spectres dans les ultra-violetes lointains et température de dénaturation par dichroïsme circulaire

Pour la détermination des spectres UV lointains, une solution d'enzyme de 300 µg/ml dans le tampon sodium phosphate 10 mM pH 6 1 mM d'azoture de sodium a été analysée à la température de la pièce avec une cellule de 0,05 cm de largeur et un spectropolarimètre Jasco J-710 relié à un ordinateur IBM. Les spectres finaux ont été obtenus par la moyenne de 10 spectres générés dans un intervalle de longueur d'ondes allant de 190 à 260 nm à un taux de 100 nm/min. Les courbes de dénaturation thermiques ont été déterminées en exposant une solution d'enzymes de 300 µg/ml à une augmentation croissante de température (taux de 1,0 °C/min) de 45° à 85°C à l'aide du bain programmable Neslab 110. Les changements de structures ont été suivis à 210 nm et une lecture d'absorbance a été prise à tous les 0,2°C. Pour obtenir la courbe de dénaturation de chaque enzyme, les données d'absorbance ont été transformées en fractions de protéines dénaturées à partir de l'équation (b) (Pace et al., 1989):

$$b) f_D = X - X_N / X_D - X_N$$

$X_N$  est la valeur de protéines natives  
 $X_D$  est la valeur de la protéine dénaturée

X est la valeur observée à chaque lecture

La température de dénaturation ( $T_m$ ) est la température où l'on observe 50% de dénaturation de la protéine.

#### 3.6.4 Caractérisation approfondie des enzymes mutantes

Pour les mutants ayant démontré des propriétés de thermostabilité intéressantes une caractérisation plus poussée a été effectuée:

##### 3.6.4.1 Paramètres cinétiques

La constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) a été déterminée en évaluant la vitesse initiale à des concentrations de substrat de 0,45 à 4,5 mg/mL par la pente de la relation linéaire générée par la quantité de sucres réducteurs produits en fonction du temps. La représentation graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat a permis de déterminer le  $K_M$  et le  $V_{MAX}$ . Le temps de préincubation des substrats à 60°C a été de 15 minutes et l'activité résiduelle a été déterminée telle que précédemment. Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide du logiciel GraFit version 3,090 (Leatherbarrow, 1996).

##### 3.6.4.2 Thermoinactivation et énergie d'activation

Une solution de 500 µg/mL (dans le tampon citrate 50 mM, pH 6) d'enzyme a été incubée à 55, 60, 65, 70 et 75°C, en absence de substrat. À des temps donnés des prélèvements ont été faits et gardés sur glace. L'activité résiduelle était ensuite déterminée à 60°C. Le taux de thermoinactivation ( $K_D$ ) d'ordre un pour chaque température a été déterminée en effectuant une régression linéaire du logarithme naturel (ln) de l'activité résiduelle en fonction du temps