

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

MARÍA EUGENIA ZALCE OLVERA

EXPRESSION DU GÈNE DE LA XYLANASE DE

Cryptococcus albidus

CHEZ LA LEVURE *Pichia stipitis*

MARS 1993

" à Sylvia, José Luis et Yvon "

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
SOMMAIRE	viii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTERATURE	4
1. LE MATERIEL LIGNOCELLULOSIQUE	5
1.1 Généralités	5
1.2 La structure du xylane	6
2. L'HYDROLYSE DES HEMICELLULOSES	6
2.1 L'hydrolyse physique	6
2.2 L'hydrolyse acide	7
2.3 L'hydrolyse microbienne	7
2.4 L'hydrolyse enzymatique	9
2.5 Le système xylanase chez <i>Cryptococcus albidus</i>	9
3. FERMENTATION DU XYLOSE: METABOLISME ET GENETIQUE	11
3.1 Chez les bactéries	12
3.2 Chez les champignons et les levures	13
3.3 Amélioration génétique des microorganismes fermenteurs de xylose	14
4. <i>Pichia stipitis</i>	16
4.1 Taxonomie	16
4.2 Métabolisme du xylose chez <i>Pichia stipitis</i>	16
4.3 Mutants, plasmides et transformation chez <i>Pichia stipitis</i>	21
5. L'ETHANOL	23
5.1 L'importance industrielle	23
5.2 Production chimique	24
5.3 Production microbologique	25
5.4 Les processus alternatifs	25
6. OBJECTIF DE LA RECHERCHE	26

MATERIEL ET METHODES	27
1. SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE	28
1.1 <i>Escherichia coli</i>	28
1.2 <i>Pichia stipitis</i>	28
1.3 Milieux de culture	28
2. VECTEURS	29
3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	30
3.1 Isolement d'ADN plasmidique de bactérie	30
3.1.1 Mini-préparation	30
3.1.2 Maxi-préparation	30
3.2 Isolement d'ADN chromosomique de levure	30
3.3 Détermination de la concentration d'ADN	33
3.4 Analyse de l'ADN avec des enzymes de restriction et électrophorèse sur gel d'agarose	33
4. CLONAGE	34
4.1 Préparation des vecteurs	34
4.2 Electroéluion des fragments d'ADN	34
4.3 Ligation	34
4.4 Transformation chez <i>E. coli</i>	35
4.5 Transformation chez <i>Pichia stipitis</i>	35
5. HYBRIDATION MOLECULAIRE	35
5.1 Marquage de l'ADN	35
5.1.1 Marquage des oligonucléotides	35
5.1.2 Marquage de l'ADN	36
5.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose	36
5.2.1 Transfert d'ADN plasmidique sur membrane de nitrocellulose (dot-blot)	36
5.2.2 Transfert d'ADN à partir de colonies bactériennes	36
5.3 Hybridation	37
5.3.1 Avec des oligonucléotides	37
5.3.2 Avec de l'ADN radioactif	38
6. MUTAGENESE DIRIGEE	38
6.1 Production des phagemides contenant des uraciles	38
6.2 Production d'ADN simple brin	38
6.3 Mutagénèse	39
6.3.1 Phosphorylation des oligonucléotides	39
6.3.2 Hybridation	39
6.3.3 Synthèse du brin d'ADN complémentaire	40
6.4 Transformation d' <i>E. coli</i> MC1061	40

7. SEQUENÇAGE	40
8. REACTION DE LA POLYMERASE EN CHAINE (PCR)	40
9. ANALYSE DES PROTEINES	41
9.1 Préparation des échantillons	41
9.1.1 Récupération du surnageant de culture	41
9.1.1.1 Précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)	41
9.1.1.2 Lyophilisation	42
9.1.2 Cassage cellulaire	42
9.2 Dosage de protéines	42
9.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	42
9.4 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	43
9.5 Immuno-détection	43
9.6 Test enzymatique	44
10. ANALYSE PAR HPLC ("High Performance Liquid Chromatography")	44
RESULTATS	45
1. CONSTRUCTION DES PLASMIDES	46
2. TRANSFORMATION DE <i>Pichia stipitis</i>	51
3. CROISSANCE SUR XYLANE	58
4. IDENTIFICATION DE LA XYLANASE PAR IMMUNO-DETECTION	60
5. FERMENTATION	62
6. STABILITE DU PLASMIDE pIAF 145	63
DISCUSSION	68
CONCLUSION	75
REMERCIEMENTS	78
BIBLIOGRAPHIE	80

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.	ORGANISMES PRODUCTEURS DE XYLANASES	8
------------	-------------------------------------	---

LISTE DES FIGURES

Fig. 1.	Voies de fermentation du xylose par des bactéries, levures et champignons	18
Fig. 2.	Utilisation des cofacteurs pour la fermentation de xylose par des levures	20
Fig. 3.	Carte de restriction du plasmide PJH-S	31
Fig. 4.	Carte de restriction du plasmide p5'XYL 32	32
Fig. 5.	Criblage des clones après mutagénèse	49
Fig. 6.	Vérification de la construction des plasmides sur gel d'agarose	52
Fig. 7.	Stratégie utilisée pour rapprocher le promoteur de la xylose réductase de <i>Pichia stipitis</i> au ATG de départ du gène de la xylanase	53
Fig. 8.	Cartes de restriction des inserts construits	54
Fig. 9.	Hybridation de l'ADN chromosomique de <i>C.albidus</i> et <i>Pichia stipitis</i> avec le gène de la xylanase	56
Fig. 10.	Criblage des transformants producteurs de xylanase	57
Fig. 11.	Courbe de croissance du transformant IAF 145 sur xylane et activité de la xylanase	59
Fig. 12.	Analyse des protéines du surnageant de culture des transformants de <i>Pichia stipitis</i>	61
Fig. 13.	Fermentation du xylose par <i>Pichia stipitis</i> PJH53 et le transformant IAF 145	65
Fig. 14.	Fermentation du cellobiose et du xylobiose par la souche PJH53 de <i>Pichia stipitis</i>	66
Fig. 15.	Fermentation du xylane 0.1% et 1% par le transformant IAF 145	67

SOMMAIRE.

A l'heure actuelle, il existe un grand intérêt pour la recherche de nouvelles sources d'énergie qui, contrairement au pétrole, seraient moins polluantes, peu coûteuses et si possible renouvelables. La biomasse, constituée principalement de polysaccharides, pourrait s'avérer une solution, à condition de pouvoir dégrader efficacement ces polymères en monosaccharides plus facilement utilisables. Le sujet de ce travail porte sur la bioconversion du xylane, un constituant de l'hémicellulose, en éthanol. De nombreux microorganismes sont capables de dégrader la biomasse et de l'utiliser comme source de carbone pour leur croissance, mais ils ne produisent pas d'éthanol. D'autre part, certaines levures, dont *Pichia stipitis*, fermentent les monosaccharides en éthanol, mais elles ne possèdent pas les enzymes qui permettent la dégradation des polysaccharides. Nous avons donc tenté de relier ces deux caractéristiques en créant, par génie génétique, une levure capable de fermenter directement le xylane en éthanol en clonant chez *P. stipitis* le gène de la xylanase de *Cryptococcus albidus*. Le gène de la xylanase produit par cette levure a été isolé à partir d'une banque génomique et un fragment d'environ 3 Kb a été séquencé (Boucher *et al.*, 1988; Morosoli *et al.*, 1988b). La séquence a montré que le gène contient 7 introns. Le gène de la xylanase sous forme de cADN a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis* et a été cloné dans cette souche. Le gène est exprimé et une xylanase de 50 kDa est sécrétée par le transformant dans le milieu de culture. Cette souche IAF 145 est capable de croître dans un milieu xylane, en conditions aérobiques mais sans pour cela produire de l'éthanol. En conditions anaérobiques, ce clone fermente le xylane et produit jusqu'à 30 mM d'éthanol.

INTRODUCTION

Le xylane, provenant des résidus agricoles et des pâtes et papiers, est un composé hémicellulosique qui a un potentiel comme source de carbone pour la production d'hydrocarbures comme l'éthanol et le butanol, ou pour la production de protéines d'origine unicellulaire. On a développé des méthodes d'hydrolyse chimique, physique et enzymatique. Actuellement, des études portent surtout sur l'hydrolyse enzymatique du xylane par les bactéries, les champignons et les levures, plutôt que l'utilisation de l'hydrolyse acide. Celle-ci constitue une méthode rapide mais elle a comme désavantage de produire des composés toxiques. L'hydrolyse physique est assez coûteuse à cause des dépenses d'énergie nécessaires à sa réalisation.

Jusqu'à maintenant, on a décrit très peu de microorganismes producteurs de xylanases capables de réaliser la fermentation directe du xylane en éthanol (Hahn-Hägerdal et al., 1991). La levure *Cryptococcus albidus* sécrète une xylanase (Biely et al., 1980) qui fait l'hydrolyse du xylane en molécules de xylose et xylobiose. Toutefois, la souche ne fermente pas en éthanol les sucres résultants de l'hydrolyse du xylane.

Le gène de la xylanase de *C. albidus* a déjà été cloné chez *Saccharomyces cerevisiae* (Moreau et al., 1992). Ce transformant sécrète une xylanase dans le milieu de culture mais cette levure est incapable de métaboliser les molécules de xylose et xylobiose accumulées dans le milieu de culture.

Par contre, la levure *Pichia stipitis* fermente efficacement le xylose en éthanol, mais elle ne sécrète pas de xylanase.

C'est pour cette raison que nous avons envisagé une approche originale dans le but de construire une souche de levure capable de fermenter directement le xylane en éthanol.

Pour atteindre cet objectif, nous avons introduit le gène de la xylanase de *C. albidus* chez *P. stipitis* afin de lui donner la capacité d'hydrolyser le xylane.

Le clonage du cADN de la xylanase de *C. albidus* sous le contrôle du promoteur du gène de la xylose réductase (Xyl 1) de *P. stipitis* lui permet de produire une xylanase qui est sécrétée dans le milieu de culture. La xylanase hydrolyse le xylane en molécules de xylose et xylobiose, lesquelles sont assimilées par la cellule et ensuite fermentées en éthanol.

Le transformant ainsi obtenu est capable d'utiliser en conditions aérobiques le xylane comme seule source de carbone et, de plus, peut réaliser dans une certaine mesure la fermentation de ce substrat en éthanol dans des conditions anaérobiques, ce clone fermente le xylane et produit jusqu'à 30 mM d'éthanol.

REVUE DE LITTERATURE

1. LE MATERIEL LIGNOCELLULOSIQUE.

1.1 Généralités.

Au cours des dernières années, le recyclage du matériel lignocellulosique a suscité un grand intérêt. Ce matériel, qui représente 95% de la biomasse terrestre (Janshekar et Fiechter, 1983), constitue une source de carbone renouvelable. Son caractère d'abondance et sa synthèse constante en font un élément recherché pour son utilisation industrielle et sa bioconversion (Fan *et al.*, 1982).

Les recherches actuelles s'orientent vers une meilleure utilisation du matériel lignocellulosique contenu dans les déchets provenant de l'agriculture, de l'industrie forestière, de la fabrication des pâtes de papier et de l'industrie de sciage (Janshekar et Fiechter, 1983). La cellulose 65-80%, l'hémicellulose 15-20% et la lignine 10% constituent l'essentiel du matériel lignocellulosique et la distribution respective de ces polymères varie selon leur provenance (Janshekar et Fiechter, 1983 ; Gong *et al.*, 1981). Les hémicelluloses permettent plusieurs applications, notamment la production microbienne de méthane, des acides organiques, des alcools, des solvants et de nourriture animale (Gong *et al.*, 1981).

La cellulose est composée des polymères de glucose tandis que l'hémicellulose peut contenir du xylose, du mannose, de l'arabinose, du galactose (Gong *et al.*, 1981).

Après avoir subis des traitements physiques ou chimiques, les composés du matériel lignocellulosique sont hydrolysés en molécules facilement assimilables par les microorganismes. Ce sont surtout les traitements chimiques qui causent des dommages à l'environnement en

produisant des dérivés toxiques. C'est pourquoi il serait préférable de développer de nouveaux procédés ou d'améliorer les procédés enzymatiques déjà existants afin d'obtenir une biodégradation efficace du matériel lignocellulosique (Fan et al., 1982).

1.2 La structure du xylane.

Le xylane est la composante majeure des hémicelluloses dans les bois durs. Sa structure est basée sur une chaîne de D-xyloses unis par des liens β -1,4. Différentes molécules substituantes peuvent se retrouver le long de la chaîne qui contribue à augmenter la complexité du polymère. Les substituants sont des groupes acétylés, des molécules d'arabinofuranose ou d'acide 4-O- méthyle glucuronique (Biely, 1985).

2. L'HYDROLYSE DES HEMICELLULOSES.

La séparation et la récupération des hémicelluloses du matériel lignocellulosique peuvent être réalisées par des procédés physiques, chimiques, microbiens et enzymatiques (Fan et al., 1982; Wong, 1988).

2.1 L'hydrolyse physique.

Les prétraitements physiques employés pour l'hydrolyse du matériel lignocellulosique sont le broyage à sec, en solution ainsi que d'autres procédés qui utilisent la vapeur, l'ébullition, la haute pression, etc. Toutes ces méthodes sont très coûteuses car elles nécessitent de la machinerie spécialisée et consomment beaucoup d'énergie (Chung et al., 1986).

2.2 L'hydrolyse acide.

La méthode la plus courante est l'hydrolyse par des acides dilués, comme l'acide sulfurique à température modérée et à pression atmosphérique (Gong *et al.*, 1981). L'hydrolyse acide s'avère une méthode rapide pour produire du xylose mais elle provoque des réactions secondaires qui conduisent à la formation de produits toxiques nocifs à l'environnement, comme le furfural et l'hydroxyméthylfurfural. Ces produits empêchent la fermentation ultérieure du xylose par les levures (Jeffries, 1983).

2.3 L'hydrolyse microbienne.

Actuellement, il serait très pertinent de développer des souches microbiennes capables d'hydrolyser l'hémicellulose, et d'utiliser efficacement leurs produits de dégradation (Biely, 1985).

Les enzymes qui dégradent le xylane en oligosaccharides de xylose sont les xylanases (E.C. 3.2.1.8) (Woodward, 1984; Wong *et al.*, 1988). Le Tableau I présente quelques bactéries, champignons et levures qui produisent une ou plusieurs xylanases. Parmi les bactéries, un des meilleurs producteurs est le genre *Streptomyces* (Morosoli *et al.*, 1986a). *Fusarium oxysporus* est le plus étudié des champignons car en plus de produire la xylanase, il peut fermenter le xylose en éthanol. Quant aux autres levures, le genre *Cryptococcus* a été bien étudié, et le système xylanasiq ue de *C. albidus* est assez connu (Biely, 1985).

TABLEAU I.

ORGANISMES PRODUCTEURS DE XYLANASES.

Organisme	Espèce	Référence
Bactéries	<i>Bacillus circulans</i>	Esteban <u>et al.</u> , 1982
	<i>Bacillus coagulans</i>	Esteban <u>et al.</u> , 1983
	<i>Bacillus pumilus</i>	Moriyama <u>et al.</u> , 1987
	<i>Bacillus subtilis</i>	Bernier <u>et al.</u> , 1983; Poutanen <u>et al.</u> , 1987
	<i>Bacteroides succinogenes</i>	Sipat <u>et al.</u> , 1987
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Lemmel <u>et al.</u> , 1985; Lee <u>et al.</u> , 1985
	<i>Clostridium stercorarium</i>	Bérenger <u>et al.</u> , 1985
	<i>Streptomyces sp</i>	Wong <u>et al.</u> , 1988; Nakajima <u>et al.</u> , 1984; Marui <u>et al.</u> , 1985
	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Sreenath <u>et al.</u> , 1982
	<i>Streptomyces lividans</i>	Morosoli <u>et al.</u> , 1986a
	Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Candida shehatae</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Cryptococcus lomentii</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Cryptococcus luteolus</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Cryptococcus tenens</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Cryptococcus podzolicus</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Cryptococcus albidus</i>		Biely <u>et al.</u> , 1980
<i>Pichia stipitis</i>		Lee <u>et al.</u> , 1986
<i>Trichosporon cutaneum</i>		Stuttgen <u>et al.</u> , 1982
<i>Trichosporon beigeli</i>	Leathers <u>et al.</u> , 1984	
Champignons	<i>Aspergillus niger</i>	Wong <u>et al.</u> , 1988
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Stewart <u>et al.</u> , 1983
	<i>Aspergillus awomoi</i>	Poutanen <u>et al.</u> , 1987
	<i>Fusarium oxysporus</i>	Poutanen <u>et al.</u> , 1987
	<i>Trichoderma reesi</i>	Dekker <u>et al.</u> , 1983

2.4 L'hydrolyse enzymatique.

Le xylane est une molécule complexe qui contient différentes molécules substituantes. Sa dégradation requiert un système enzymatique comprenant plusieurs enzymes. Les enzymes qui hydrolysent le xylane sont des xylanases (E.C. 3.2.1.8). Elles hydrolysent les liens β -1,4 entre les molécules de xylose pour donner de courts oligosaccharides. Les molécules de xylotriase et xylobiose sont hydrolysées en xylose par la β -xylosidase (E.C. 3.2.1.37) (Woodward, 1984; Biely, 1985).

Il existe deux classes de xylanases qui diffèrent par leur séquence primaire mais aussi par la taille des enzymes et leur point isoélectrique. Le groupe A représente des xylanases acides dont la taille varie entre 43000 et 50000 Da. Elles génèrent des molécules de xylose, xylobiose et xylotriase. Dans le groupe B, on trouve des xylanases basiques avec un poids moléculaire entre 16000 et 22000 Da. Elles génèrent en majorité des molécules de xylotriase et xylobiose. Par exemple, la xylanase de la levure *C. albidus* utilisée dans ce travail, appartient au groupe A, ce qui est avantageux car parmi ses produits d'hydrolyse, le xylose est fermenté par *P. stipitis* (Woodward, 1984; Wong *et al.*, 1988; Tovoila *et al.*, 1984).

2.5 Le système xylanasiqne chez *Cryptococcus albidus*.

Le système d'enzymes qui permet la dégradation du xylane est assez connu chez *C. albidus*. Il est composé d'une endo-1,4- β -xylanase qui est sécrétée dans le milieu de culture pour dégrader le xylane en molécules de xylotriase et xylobiose. Ces molécules sont hydrolysées par la β -xylosidase, une enzyme attachée à la membrane cellulaire (Biely, 1985).

La xylanase est produite constitutivement en très faible quantité. Lorsque la levure croît sur du xylane, la synthèse de xylanase et de β -xylosidase est induite par les molécules de xylotriase et de xylobiose issues de la dégradation du xylane. L'accumulation de xylose réprime la synthèse enzymatique de xylanase et de xylosidase. Le glucose également exerce une répression sur ces deux enzymes (Woodward, 1984; Biely, 1985).

La xylanase de *C. albidus* a été purifiée par chromatographie sur hydroxyapatite (Morosoli et al., 1986b). La température et le pH optimum pour l'activité xylanasique sont de 30 °C et 5.4, respectivement (Biely et al., 1980). Dans sa forme mature, cette enzyme hautement glycosylée a une masse moléculaire de 48000 Da. Par déglycosylation chimique à l'acide trifluorométhanosulfonique ou par inhibition de la glycosylation *in vivo* au moyen de la tunicamycine, la masse moléculaire est réduite à 40000 Da (Morosoli et al., 1988a).

Le gène qui code pour la xylanase a été isolé d'une banque génomique et il a été séquencé. La séquence du fragment Sph I-Pst I du gène est d'environ 3 Kb, et une séquence de 21 acides aminés est attribuée au peptide signal (Boucher, 1988).

D'après la séquence du fragment Sst I-Pst I, on retrouve un codon de départ ATG situé à 300 pb en amont du site Xba I. Une séquence TATAA est située à environ 120 pb en amont du site ATG (position 1). Tous les introns se situent entre les sites Kpn I et Hind III (Fig. 8, pIAF 143). Le codon d'arrêt est situé à 1480 pb du site de départ ATG. Dans l'extrémité 3' de l'ARNm (messager), on retrouve un résidu cytosine en position 1646 où est ajoutée une séquence de poly A.

La comparaison de la séquence du gène chromosomique avec celle du cDNA permet d'identifier 7 introns qui ont une taille entre 51 et 69 paires de bases (pb). Les exons ont des séquences courtes d'environ 150 pb, ce qui avait rendu impossible l'identification des introns dans le gène par cartographie à la nucléase S1 (Morosoli *et al.*, 1992).

A l'extrémité 5' de tous les introns, on retrouve une séquence consensus $GT^A_GAG^C_T$ et à l'extrémité 3' une séquence consensus c_TAG que l'on retrouve dans les introns des eucaryotes. D'autre part, à l'intérieur de la séquence des introns 2,5 et 6, il y a une séquence semblable aux séquences consensus de mammifères $CT^A_GA^c_T$. Dans l'intron 3, il y a la séquence TACTTAAC. Elle est presque identique à celle des levures mais elle possède un T de trop. Pour les introns 1, 4 et 7, aucune séquence consensus a été trouvée (Morosoli *et al.*, 1992).

3. FERMENTATION DU XYLOSE: METABOLISME ET GENETIQUE.

L'importance du matériel lignocellulosique, en tant que substrat possible dans la production de l'éthanol, a été signalée plus haut. Cette conversion comporte deux étapes principales: l'hydrolyse acide ou enzymatique du matériel lignocellulosique, puis la fermentation du xylose provenant de la fraction des pentoses issue de cette hydrolyse.

Même s'il existe plusieurs microorganismes producteurs de xylanases, peu d'entre eux sont capables de fermenter directement le xylane en éthanol (Gong *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1986). Nous présenterons ici un aperçu des voies possibles de fermentation du xylose chez les bactéries, les champignons et les levures, ainsi que les connaissances sur la génétique et le clonage des gènes des enzymes impliquées dans les premières étapes de la fermentation du

xylose.

3.1 Chez les bactéries.

Certaines bactéries donnent de l'éthanol comme produit principal de la fermentation du xylose, mais la plupart génèrent aussi d'autres composés tels que le lactate, le butanediol, l'acétone, le butanol, l'acide acétique, l'isopropanol, etc... (Gong et al., 1981).

Chez les bactéries, le métabolisme des pentoses a été davantage étudié : chez *Aerobacter aerogenes* (Wilson et Mortlock, 1973); *Escherichia coli* (David et Weismeyer, 1970); *Salmonella typhimurium* (Shamanna et Sanderson, 1979) et *Zymomonas mobilis* (Gong et al., 1981; Tubb, 1984).

Les enzymes de ce métabolisme comprennent une perméase, une D-xylose isomérase et une D-xylulose kinase. Toutes ces enzymes sont inductibles par le xylose ou autres pentoses et leur synthèse est réprimée par la glucose (Gong et al., 1981).

Dans une première étape, le xylose est transporté dans la cellule par une perméase où il est transformé en xylulose par la D-xylose isomérase (Fig 1). C'est cette réaction qui représente la différence majeure entre la fermentation chez les procaryotes et celle chez les eucaryotes. Ces derniers transforment le xylose en xylulose en deux étapes, avec le xylitol comme intermédiaire (Jeffries et al., 1983).

Chez les bactéries, la fermentation du xylose en éthanol est comparable à celle obtenue à partir d'hexoses chez les levures avec un rendement de 0.51 g d'éthanol par litre.

Toutefois, on note un désavantage important: la fermentation à l'éthanol amène la formation d'autres produits finaux comme l'acétone, l'acide lactique, le butanol et le butanediol (Gong et al., 1981; Skoog et Hahn-Hägerdal, 1988).

3.2 Chez les champignons et les levures.

L'assimilation du xylose chez les champignons et les levures se fait par transport actif et diffusion facilitée.

Contrairement aux bactéries, les eucaryotes incorporent le xylose à leur métabolisme par des réactions d'oxydo-réduction (Enari, 1984). Le xylose est ainsi transformé par la xylose réductase en xylitol, lequel est ensuite réduit en xylulose par une déshydrogénase (Fig. 1). Ce sont les deux réactions déterminantes dans le métabolisme du xylose. A partir d'ici, le xylulose emprunte la voie des pentoses phosphates et la voie d'Embden-Meyerhof pour donner de l'éthanol comme produit final (Gong et al., 1981).

D'autre part, certaines levures, comme *Candida utilis* et *Rhodotorula gracilis*, possèdent une activité xylose isomérase inductible comparable à celle des bactéries. Cela signifie une conversion directe du xylose en xylulose, au lieu de passer par le xylitol comme produit intermédiaire. Dans ces levures, la réaction d'isomérisation du xylose s'ajoutera à la réaction d'oxydo-réduction (Gong et al., 1981; Jeffries, 1983).

Fusarium oxysporum, *Mucor*, *Monilia* sp. et *Neurospora crassa* sont des champignons qui fermentent le xylose, mais à un niveau moindre que les levures (Skoog et Hägerdal, 1988).

La capacité de fermentation des levures a été testée à partir de différents substrats: xylane, xylose et xylulose (Lee et al., 1986; Skoog et Hahn-Hägerdal, 1988). Certaines souches d'*Aureobasidium*, de *Candida*, de *Cryptococcus*, de *Pichia* et de *Trichosporon*, sont capables de pousser sur le xylane (Lee et al., 1986).

La fermentation à partir du xylose et du xylulose a été observée dans les genres *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pachysolen*, *Pichia*, *Sporopachydermia* et *Wingea* (Tovoila et al., 1984; Margaritis et Bajpai, 1982; Schneider et al., 1983; Kurtzman, 1983). Seules quelques souches de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Torulospira* peuvent fermenter le xylulose, mais non le xylose (Skoog et Hägerdal, 1988).

De ces analyses, il résulte que les meilleurs fermenteurs de xylose ont été *Pachysolen tanophilus* et *Pichia stipitis* (Dellweg et al., 1984); tandis que *Saccharomyces cerevisiae* s'avérait être la meilleure souche pour fermenter le xylulose (Gong et al., 1981; Skoog et Hahn-Hägerdal, 1988).

3.3 Amélioration génétique des microorganismes fermenteurs de xylose.

Présentement, on sait que, parmi les microorganismes fermenteurs, les levures *Pachysolen tanophilus* et *Pichia stipitis* donnent la meilleure production d'éthanol à partir de xylose (Dellweg et al., 1984; Lee et al., 1986; Tovoila et al., 1984; Hahn-Hägerdal et al., 1991). Elles sont les plus étudiées au niveau des facteurs qui agissent sur la régulation du métabolisme du xylose, tels que la tolérance à l'éthanol, le transport du xylose et les inhibiteurs de la fermentation.

Les connaissances acquises sur la régulation de ce métabolisme ont permis d'appliquer des techniques de génétique et de biologie moléculaire (fusion de protoplastes, mutation, transformation et clonage moléculaire) dans le but de créer une souche possédant les caractéristiques désirables d'un microorganisme fermenteur de pentoses (Stewart et al., 1984).

Chez les levures, il y a plusieurs approches possibles pour créer une souche pouvant fermenter le xylose (Jeffries, 1983). Puisque *Saccharomyces cerevisiae* fermente le xylulose, un clonage hétérologue du gène de la xylose isomérase d'*E. coli* qui permet de transformer le xylose en xylulose a été réalisé chez la levure (Ho et al., 1989; Chan et al., 1989; Sarthy et al., 1987). Le clonage a été fait en utilisant le promoteur du gène de l'aldéhyde déshydrogénase d'*E. coli* en amont du gène de la xylose réductase. L'expression du gène a donné une activité réduite, probablement due au pH relativement acide de la levure qui peut changer la conformation de la protéine, et modifier la formation de ponts disulfures. On peut aussi invoquer l'absence dans la levure d'un cofacteur (NADH, NADPH) ou d'ions (Mg, Fe, Cu) importants pour l'activité de la xylose isomérase (Sarthy et al., 1987; Hahn-Hägerdal et al., 1991).

Une autre alternative est d'utiliser de la glucose isomérase, purifié d'*E. coli*, qui transforme le xylose en xylulose. Cette enzyme est ajoutée directement au milieu de culture contenant du xylose. *S. cerevisiae* fermente en éthanol le xylose produit par l'enzyme. Cette enzyme est très active, même en présence d'inhibiteurs et les rendements obtenus ressemblent à ceux de la fermentation d'hexoses (Hahn-Hägerdal et al., 1991).

Récemment, le gène de la xylose réductase de *Pichia stipitis* a été caractérisé,

cloné et exprimé chez *S. cerevisiae*. L'expression du gène était constitutive, mais la conversion de xylitol en xylulose atteint un équilibre qui favorise l'accumulation de xylitol, ce qui empêche le transformant d'utiliser par la suite le xylose (Takuma et al., 1991).

Une souche de *S. cerevisiae*, capable de métaboliser le xylose, a été construite par Kötter et al., 1990. Les gènes de la xylose réductase et de la xylitol déshydrogénase de *P. stipitis* ont été clonés chez *S. cerevisiae*. Les gènes s'expriment et la souche peut utiliser jusqu'à 2% de xylose comme seule source de carbone. L'utilisation du xylose est lente, et le temps de génération du transformant est de 5 heures. La souche arrive à produire jusqu'à 18 mM d'éthanol (Kötter et al., 1990).

4. *Pichia stipitis*.

4.1 Taxonomie.

En 1967, Pignal a décrit la levure *P. stipitis* isolée de scarabées provenant d'arbres fruitiers à Lyon, en France.

Cette levure appartient à la Classe Ascosporogenous et à la Famille des Saccaromycetaceae. Elle est très semblable à *Candida shehatae* qui est maintenant considérée comme la forme imparfaite de *P. stipitis* (van Rij, K. 1984).

4.2 Métabolisme du xylose chez *Pichia stipitis*.

Les travaux de Tovoila et al., 1984, ont démontré que *P. stipitis* pouvait fermenter

le xylose en éthanol en conditions anaérobiques.

L'assimilation du xylose par la cellule a été décrite comme un processus actif ("proton symport") et qui requiert de l'énergie (Kilian et van-Uden, 1988).

Comme la plupart des levures qui utilisent le xylose, *P. stipitis* fait parvenir le xylose à la voie métabolique des pentoses phosphates par deux réactions d'oxydo-réduction qui transforment le xylose en xylitol puis en xylulose (Skoog et Hahn-Hägerdal, 1988; Hahn-Hägerdal et al., 1991).

Dans la première réaction, il y a participation d'une xylose réductase avec une activité dépendante de NADPH. La deuxième réaction est réalisée par la xylitol déshydrogénase qui prend le NADH comme cofacteur (Fig. 1). Les différents comportements, lors de la fermentation des levures, sont dûs à la spécificité du coenzyme utilisé dans la première réaction d'oxydation du xylose (Bruinenberg et al., 1984). En plus de l'activité xylose de la réductase liée au NADPH, *P. stipitis* présente une activité aldose réductase liée au NADH qui permet de réutiliser le NADH produit par l'oxydation du xylitol en xylulose (Fig. 2). De cette façon, un équilibre est formé car les équivalents "redox", donnés par l'oxydation du xylitol sont utilisés pour la réduction du xylose. Pour cette raison, *P. stipitis* est l'une des levures qui fermentent le mieux le xylose (Verduyn et al., 1985).

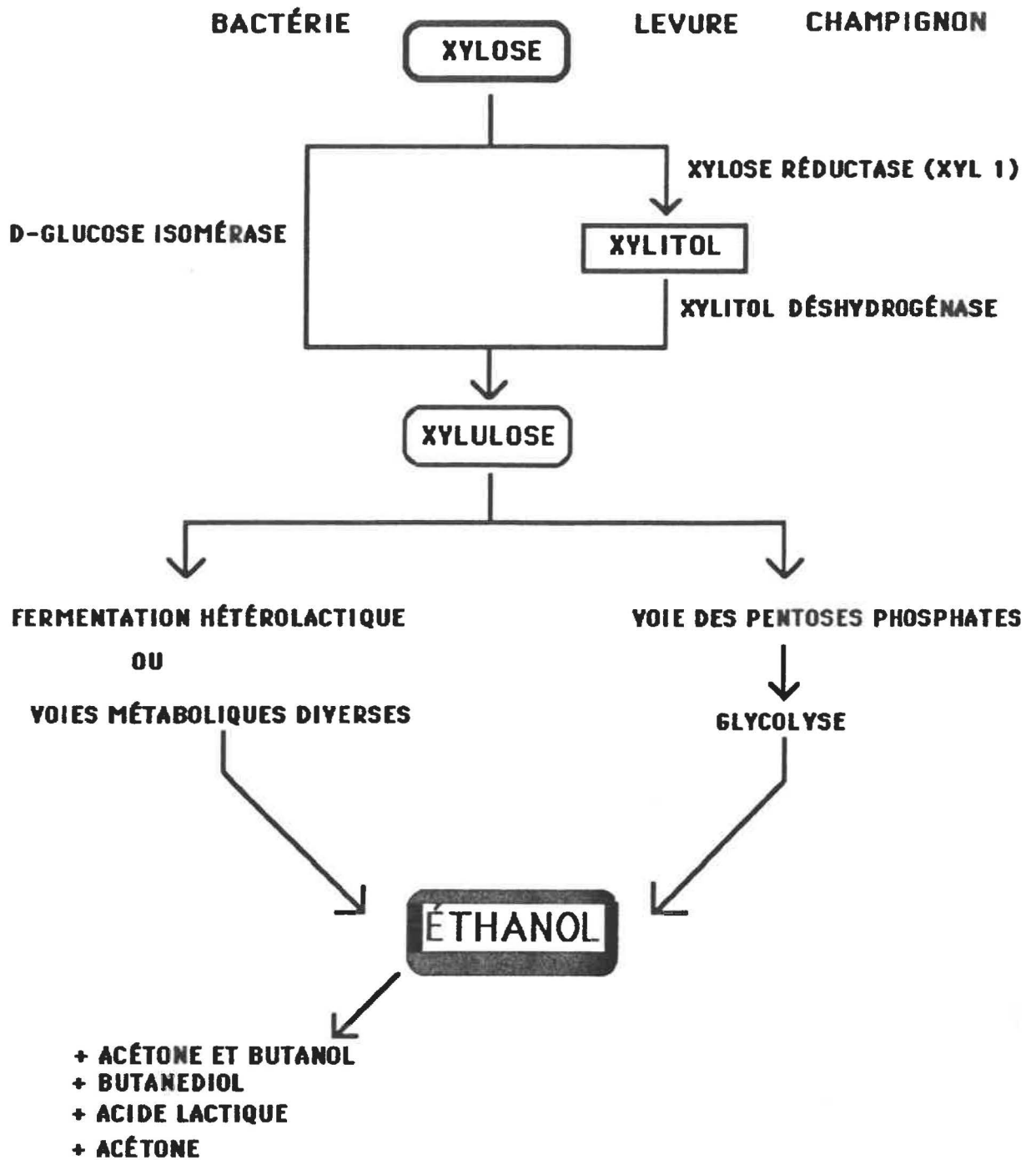


Fig. 1. Voies de fermentation du xylose par des bactéries, levures et champignons.

Chez d'autres levures, par exemple chez *Candida utilis*, l'absence d'une activité réductase dépendante de NADH pour la première réaction, donne une accumulation du NADH et empêche la fermentation du xylose (Bruinenberg et al., 1984). D'autre part, pour la fermentation chez *P. stipitis*, la concentration de l'oxygène est un facteur très important car celui-ci doit être présent en faibles quantités 5 à 35 mmol d'O₂/l h pour permettre une fermentation efficace (0.11 à 0.34 gramme d'éthanol par gramme de xylose consommé). Lorsque la concentration d'oxygène est augmentée à 240 mmol/l, la production d'éthanol diminue à 0.02 gramme d'éthanol par gramme de xylose consommé (Guebel et al., 1991). Plusieurs facteurs doivent être considérés pour contrôler l'oxygène: par exemple, le rapport du volume de culture et du volume du bécher, l'agitation, la tension d'oxygène dissout, etc. Toutefois, le niveau de concentration est difficile à mesurer et à contrôler avec les techniques présentement disponibles (Hahn-Hägerdal et al., 1991).

Une autre caractéristique du métabolisme de *P. stipitis* est que la croissance en xylose n'est observée qu'en conditions aérobiques sans production d'éthanol. Par contre, la fermentation du xylose se fait en conditions anaérobiques sans multiplication cellulaire (Hahn-Hägerdal et al., 1991).

Cependant, il y a certaines limitations à la fermentation du xylose par *P. stipitis*. Par exemple, sa basse tolérance à l'éthanol (4.5%), comparée à celle de la plupart des levures qui se situe entre 8-18% (Stewart et al., 1984; Hahn-Hägerdal et al., 1991). Les inhibiteurs, produits pendant l'hydrolyse acide du matériel lignocellulosique, causent un problème pour une fermentation efficace (Hahn-Hägerdal et al., 1991).

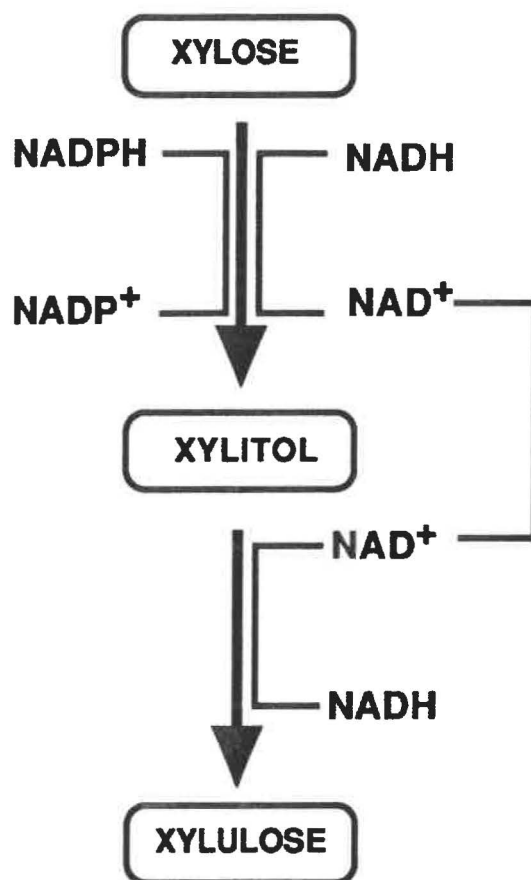


Fig. 2. Utilisation des cofacteurs pour la fermentation de xylose par des levures.

Dans le cas de l'éthanol, ce n'est pas un grand problème puisqu'il peut être contrôlé en l'éliminant graduellement du milieu de culture avant qu'il ne devienne toxique pour la cellule (Chung et Lee, 1986).

La dégradation chimique du xylane en xylose produit des inhibiteurs comme le furfural et l'hydroxyfurfural, qui inhibent la fermentation chez *P. stipitis*. Ainsi, le traitement chimique pourrait être remplacé par une hydrolyse enzymatique du xylane par des xylanases.

4.3 Mutants, plasmides et transformation chez *Pichia stipitis*.

Les développements de la biologie moléculaire permettront d'intervenir au niveau génétique pour améliorer des souches impliquées dans la production d'éthanol en augmentant, par exemple, les possibilités d'utilisation d'un substrat et la capacité de bioconversion du substrat en question (Tubb, 1984).

Pour ces raisons, il est important de connaître la génétique de l'organisme, et de posséder un système efficace de clonage, avec des vecteurs appropriés et des techniques de transformation (Esser et Hirichs, 1983).

Les connaissances génétiques de *P. stipitis* sont très récentes, mais elles ont déjà fourni un certain nombre d'informations importantes quant à l'utilisation du xylose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1991).

Présentement, des mutants du genre *Pichia*, auxotrophes des acides aminés tryptophane et histidine, ont été isolés. Il s'avère utile de pouvoir obtenir ce type de mutants

lorsqu'on établit la stratégie de clonage en utilisant des vecteurs qui portent l'information nécessaire pour compléter l'auxotrophie (Stearns et al., 1990).

Par ailleurs, l'isolement et la caractérisation de mutants des enzymes xylose réductase et xylitol déshydrogénase, ont été réalisés par Hagerdon et Ciriacy, 1989. Ces mutants ont permis de connaître la fonction de ces enzymes impliquées dans la fermentation du xylose.

La présence naturelle de plasmides chez les levures peut fournir des éléments de base pour la construction de vecteurs, comme ce fut le cas pour le plasmide 2 μ m chez *Saccharomyces cerevisiae* (Broach, 1982; Falco et al., 1982). Récemment, on a décrit la présence d'un plasmide linéaire chez *Pichia inositovora*, mais son mécanisme de réplication et sa fonction ne sont pas encore connus (Ligon et al., 1989). L'isolement d'un plasmide comportant l'activité "killer" a été rapporté par Worshan et Bolen, 1990.

Pour le clonage chez les levures, les plasmides sont des "vecteurs navettes", c'est-à-dire qu'ils peuvent être conservés et manipulés chez *E. coli* (Stearns et al., 1990). Un exemple de ce type de plasmide est le vecteur pUCK construit et utilisé par Ho et al., 1991. Ce vecteur navette multicopie a été employé pour la transformation de *P. stipitis*. Il a été construit en insérant un fragment 4.6 Kb Eco RI qui contenait le replicon 2 μ m et le gène de résistance à la kanamycine isolé du plasmide pKan5.

Un autre exemple est le plasmide multicopie pJH-S qui a été utilisé comme vecteur navette dans ce présent travail. Il contient une séquence de réplication autonome, un gène de

résistance à l'ampicilline et le gène HIS 3 (qui code pour l'imidazole glycérol phosphate déshydrogénase) pour compléter l'auxotrophie de la souche de *P. stipitis*.

Actuellement, la manipulation génétique chez *P. stipitis* est possible car les techniques de transformation appropriées ont été établies. Ho et al., 1991, ont développé une technique de transformation à partir de protoplastes et de la technique de transformation chez *S. cerevisiae* (Hinnen et al., 1978) et *P. pastoris* (Cregg et al., 1985). Une autre technique de transformation est basée sur l'utilisation des cellules entières traitées au diméthyle sulfoxyde et au polyéthylène glycol (Klebe et al., 1983; Hill et al., 1991). Donc, les techniques de clonage et de transformation sont maintenant disponibles et elles permettent la manipulation génétique de *Pichia*.

5. L'ETHANOL.

5.1 L'importance industrielle.

L'énergie est un facteur essentiel et fondamental pour l'activité humaine. A partir de la révolution industrielle, une grande variété de sources d'énergie ont été utilisées, dont le charbon, l'électricité, le pétrole, et le gaz naturel. Depuis les années 60, le pétrole a été le principal hydrocarbure et a servi comme ressource énergétique industrielle primaire (Kosaric et al., 1981).

En 1973, la crise de l'énergie et la croissance des besoins énergétiques ont stimulé la recherche d'autres sources d'énergie, en particulier celle stockée dans la biomasse. Issue des déchets agricoles et forestiers, et de l'industrie de transformation du bois, cette ressource a pris

beaucoup d'importance (Kosaric *et al.*, 1980; Kosaric *et al.*, 1981; de van Brook *et al.*, 1984). Par exemple, la bioconversion de la biomasse en éthanol est devenue une option intéressante. Elle peut être substituée au combustible, à l'essence et au diesel (Chartier et Mériaux, 1980; Parisi, 1983). Maiorrella *et al.*, 1981, ont estimé la production mondiale d'éthanol à environ 3.2 billions de litres (800 millions de gallons) par année. Actuellement, l'éthanol pour les vins et breuvages est produit par fermentation, il est récupéré grâce à plusieurs distillations.

5.2 Production chimique.

L'éthanol industriel est obtenu à partir du pétrole, du gaz naturel, ou à partir de l'éthylène provenant du pétrole. Avant la deuxième guerre mondiale, l'éthanol servait à la production de l'éthylène; aujourd'hui, c'est l'éthylène qui sert à la production de l'éthanol. Les procédés de production à partir de l'éthylène sont l'estérification, suivie d'une hydrolyse ou d'une hydratation (Kosaric *et al.*, 1980).

Une méthode commerciale est la transformation de l'éthylène en acide éthyle sulfurique. Ce dernier est hydrolysé en éthanol et en acide sulfurique de la façon suivante:



L'autre réaction pour l'obtention de l'éthanol est l'hydratation directe de l'éthylène en utilisant l'acide phosphorique à une pression de 1000 psi (68 atmosphères) et à 400°C.



5.3 Production microbiologique.

Le bio-procédé le plus ancien et le mieux connu est la fermentation alcoolique. Elle consiste à convertir des sucres en éthanol au moyen de plusieurs microorganismes. La plus courante est la levure *S. cerevisiae* (Wills et al., 1990).

Chez les levures, le métabolisme anaérobique produit 2 moles d'éthanol et 2 moles de dioxyde de carbone par mole de glucose consommée. Autrement dit, chaque gramme de glucose conduit à la production théorique de 0.51 gramme d'éthanol:



Le procédé le plus fréquent pour la production d'éthanol a été la fermentation en cuinée par des levures, avec un temps de rétention de 50 h à 20 °C ou à 30 °C, et un pH initial de 4.5. Le rendement obtenu est de 90% par rapport à la production théorique (0.51 g/l d'éthanol). Une partie des sucres utilisés est consacrée à la croissance cellulaire. A l'étape finale, la récupération d'éthanol est faite par distillation (Kosaric et al., 1981).

5.4 Les processus alternatifs.

D'autres processus ont été développés pour améliorer la production d'éthanol, notamment en variant le type de fermentation : en continu sous vide, en série, en continu avec recyclage cellulaire, en tour et dialyse, etc. (Maiorella et al., 1981; Margaritis et Marchant, 1984). La méthode de fermentation en continu avec recyclage cellulaire est l'une des plus performantes car elle donne une production de 30-40 g/l/h. Elle a toutefois le désavantage de consommer beaucoup d'énergie. Quant à la fermentation sous vide, elle donne aussi une bonne

production, 80 g/l/h, mais requiert un équipement spécialisé. En outre, les problèmes de contamination sont fréquents (Maiorella et al., 1981).

En parallèle à ces divers types de fermentation, on a beaucoup étudié ces dernières années le système de cellules immobilisées. Ce système est simple à utiliser car il n'a pas besoin d'agitation et ne nécessite pas d'équipement de récupération cellulaire. De plus, les rendements de production d'éthanol sont apparemment meilleurs quand on les compare à ceux des méthodes traditionnelles de fermentation de cellules en suspension qui donnent une production de 1.8-2.5 g/l/h (Margaritis et Marchant, 1984; Grotjen et al., 1990). Par exemple, en utilisant comme support une résine échangeuse d'ions et une souche de *S. cerevisiae*, l'éthanol produit à partir de glucose atteint 62 g/l/h (Daugulis et al., 1981).

Un essai de cofermentation du xylose et du glucose en utilisant deux levures, dont *P. stipitis* et *S. cerevisiae*, a été tenté par Gootjen et al., 1990. Ils ont obtenu une production d'éthanol de 2 g/l/h. Pendant la fermentation, du xylitol a été produit, ce qui a inhibé la fermentation du xylose (Grootjen et al., 1990).

6. OBJECTIF DE LA RECHERCHE.

Comme précédemment démontré, il existe quelques organismes capables de produire de la xylanase pour dégrader le xylane et d'autres organismes qui sont capables d'utiliser ces produits de dégradation. Nous ne connaissons pas encore un organisme capable de fermenter directement le xylane en éthanol. C'est pour cette raison, que l'objectif est de construire par génie génétique une souche de *P. stipitis* capable de fermenter le xylane en éthanol.

MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE.

1.1 *Escherichia coli*.

Les manipulations génétiques ont été faites en utilisant les souches MC 1061 (ara D139, Δ ara, leu 7557 Δ lac X74, gal U⁻, gal K⁻, hsr⁺, Str A) et CJ 236 (dut 1, ung 1, thi 1, rel a-1) (Casadaban et Cohen, 1980).

1.2 *Pichia stipitis*.

La levure *P. stipitis* PJH53 est une gracieuseté du Dr. M. Ciriacy. Cette souche est un mutant auxotrophe aux acides aminés histidine et tryptophane.

1.3 Milieux de culture.

Le milieu complet 2xTY (bactotryptone 16 g/l, extrait de levure 10 g/l, NaCl 5 g/l) a servi pour la croissance des bactéries. Au besoin, nous avons ajouté des antibiotiques aux concentrations finales de : ampicilline 100 μ g/ml, kanamycine 70 μ g/ml et chloramphenicol 30 μ g/ml. La croissance se fait à 37°C, avec une agitation à 250 rpm.

Les levures ont été cultivées dans un milieu complet YEPD (extrait de levure 10 g/l, peptone 20 g/l, dextrose 20 g/l). Pour la sélection des transformants de levure, nous avons utilisé un milieu minimal SD (yeast nitrogen base w/o amino acids 6.7 g/l dextrose 20 g/l) contenant certains acides aminés aux concentrations finales recommandées par Sherman *et al.*, 1974.

La croissance de la souche hôte a été effectuée à 30°C avec agitation à 250 rpm. Les transformants ont été cultivés dans des "erlenmeyer" de 500 ml, contenant 100 ml de milieu minimal à 26°C avec agitation à 250 rpm.

Pour la sélection des transformants producteurs de xylanase, nous avons eu recours à un milieu minimal solide contenant 1 g/l de RBB-xylan (remazol bleu brillant).

La fermentation a été réalisée dans un milieu anaérobie préparé comme ci-haut, dans lequel nous avons fait circuler pendant 5 minutes un mélange de gaz N₂, H₂, CO₂.

2. VECTEURS.

Les plasmides pIAF 124SH et pIAF 131 contiennent respectivement le gène chromosomique et de l'ADN complémentaire (ADNc) de la xylanase de *Cryptococcus albidus*, cloné dans le vecteur d'expression pVT 100U de *Saccharomyces cerevisiae* qui a un origine de replication du plasmide 2 μ m, une cassette de clonage avec sept sites de restriction uniques, le promoteur et la séquence de terminaison du gène de l'ADHI de levure (alcool déshydrogénase I) et le gène qui code pour une enzyme servant à la synthèse d'uracile (Vernet et al., 1987). Ces plasmides ont été utilisés pour la transformation de *Saccharomyces cerevisiae* (Moreau et al., 1992). Le phagemide pTZ 19 U (Mead et al., 1986) a été utilisé lors des expériences de mutagenèse dirigée et de séquençage.

Le vecteur navette pJH-S a été fourni par le Dr. Ciriacy. Ce plasmide contient une origine de réplication autonome SwARS 1, une séquence de résistance à l'ampicilline et le

gène pour compléter la synthèse d'histidine (his 3) dans le mutant de *Pichia* (Fig. 3). Nous avons utilisé également le plasmide p5'XYL 32 pour purifier le promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis* (Fig. 4).

3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

3.1 Isolement d'ADN plasmidique de bactérie.

3.1.1 Mini-préparation.

La purification des plasmides à petite échelle a été obtenue par la méthode d'ébullition (Holmes et Quigley, 1981). Les étapes principales sont: le traitement au lysozyme et le traitement à la chaleur, une extraction au phénol qui permet d'éliminer les protéines, suivie d'une précipitation de l'ADN par 2 volumes d'éthanol et 0.3 M d'acétate de sodium.

3.1.2 Maxi-préparation.

L'isolement à grande échelle est pratiqué à partir d'une culture bactérienne d'un litre. La technique suit les mêmes étapes que la méthode d'ébullition, et l'ADN extrait est purifié sur gradient de CsCl (Maniatis et al., 1982) dans une centrifugeuse Beckman TL 100 avec un rotor TLA-100.2 à 100 000 rpm pendant 3 h à 20°C.

3.2 Isolement d'ADN chromosomique de levure.

L'ADN chromosomique de la levure *P. stipitis* est obtenu en modifiant la technique de Polaina et Adam, 1991, dans laquelle une culture de 5×10^8 cellules/ml ont été

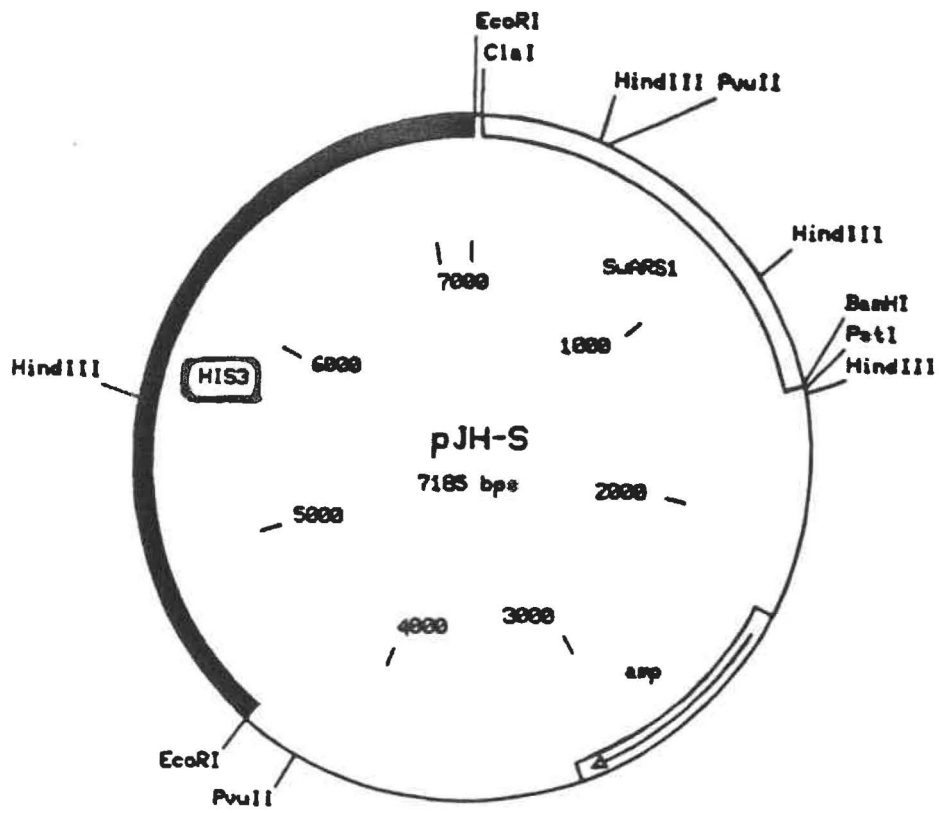


Fig. 3. Carte de restriction du plasmide PJH-S

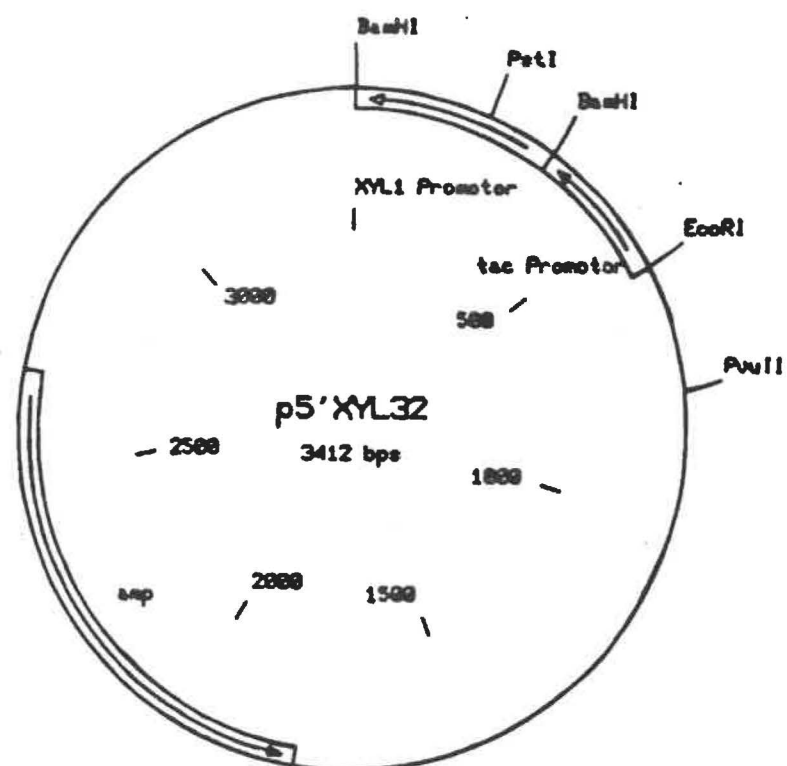


Fig. 4. Carte de restriction du plasmide p5'XYL 32.

cassées avec des billes de verre dans un tampon Tris 50 mM, EDTA 50 mM pH 8.0 (Dowhanick et al., 1990).

Une fois les cellules cassées, on ajoute du sarkosyl à une concentration finale de 2%. La suspension est centrifugée et le surnageant est extrait au phénol/chloroforme, puis l'ADN est purifié sur gradient de CsCl.

3.3 Détermination de la concentration d'ADN.

La concentration d'ADN a été déterminée par l'absorbance à 260 nm dans un spectrophotomètre (Pharmacia LKB-ultraspec III). La concentration d'ADN est calculée en tenant compte qu'une densité optique D.O. = 1 équivaut à 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN. La pureté de l'ADN est évaluée selon le rapport de D.O. 260 nm et à 280 nm. L'ADN pur donne un rapport de 2.

3.4 Analyse de l'ADN avec des enzymes de restriction et électrophorèse sur gel d'agarose.

En général, on utilise une unité d'enzyme par μg d'ADN dans un volume de 20 μl , dans les conditions de tampon et de température indiquées pour chaque enzyme.

Les fragments d'ADN digérés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.7%, tel qu'indiqué dans Maniatis et al., 1982 .

4. CLONAGE.

4.1 Préparation des vecteurs.

Les vecteurs digérés ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) avec l'enzyme de restriction choisi sont traités avec 0.8 U de phosphatase alcaline d'*E. coli* (BAP) dans un volume total de $50\mu\text{l}$. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 1 h. Ensuite, une extraction au phénol/chloroforme est nécessaire pour éliminer l'enzyme, puis les vecteurs sont récupérés par précipitation à l'éthanol.

4.2 Electroélution des fragments d'ADN.

Les fragments obtenus, au moyen des enzymes de restriction portant les gènes d'intérêt, sont isolés du plasmide correspondant (pIAF 124SH et pIAF 131B) par électrophorèse sur gel d'agarose ne contenant pas de bromure d'éthidium. Pour repérer la position des fragments d'ADN on colore une partie du gel au bromure d'éthidium. Le fragment d'intérêt est coupé et séparé du restant du gel d'agarose. L'élution est faite dans une chambre à élution LKB (Pharmacia) pendant 30 minutes à 100 volts. Les fragments sont récupérés par précipitation à l'éthanol.

4.3 Ligation.

Les inserts (40 ng) sont liés aux vecteurs (20 ng) en utilisant une unité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 dans un volume final de $10\mu\text{l}$ à 13°C durant 16 h.

4.4 Transformation chez *E. coli*.

La transformation se fait selon la technique de Mandel et Higa, 1970, qui comporte un traitement au CaCl_2 et un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes. La sélection des clones est réalisée sur milieu solide contenant de l'ampicilline ($100\mu\text{g/ml}$).

4.5 Transformation chez *Pichia stipitis*.

La transformation de la levure *P. stipitis* se fait en modifiant la technique de Klebe *et al.*, 1983. Cette technique est basée sur la transformation de cellules entières sans formation de protoplastes. Un traitement au diméthylsulfoxyde (DMSO) et une congélation à -70°C , suivie d'un traitement au polyéthylèneglycol (PEG 1000) à 37°C pendant 5 minutes, permettent d'incorporer les plasmides. La sélection des transformants se fait sur milieu SD contenant du tryptophane (30 mg/l).

5. HYBRIDATION MOLECULAIRE.

5.1 Marquage de l'ADN.

5.1.1 Marquage des oligonucléotides.

Les oligonucléotides, à une concentration de 10 pmol , sont marqués avec 20 nmol de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ $50\ \mu\text{Ci}$ et 10 unités de polynucléotide kinase dans un volume total de $50\ \mu\text{l}$. L'ATP non incorporé est éliminé par chromatographie et centrifugation sur une résine Sephadex G25 pendant 4 minutes à 3000 rpm (technique "spun column", Maniatis *et al.*, 1982).

5.1.2 Marquage de l'ADN.

Le marquage du fragment d'ADN utilisé comme sonde est réalisé par la méthode de "nick translation" (Maniatis *et al.*, 1982). Un μg d'ADN est marqué avec 100 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP à l'aide de la ADN polymérase (5 unités) et la ADNase (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans un volume de réaction de 50 μl . Le matériel non incorporé est éliminé, tel que décrit ci-haut.

5.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose.

5.2.1 Transfert d'ADN plasmidique sur membrane de nitrocellulose (dot-blot).

Le plasmide (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) est dénaturé par ébullition dans un bain-marie pendant 10 minutes. 90% du liquide s'évapore et on ajoute 1 μl de SSC 10x (3M NaCl, 0.3 M citrate de sodium). Le mélange est déposé sur une membrane de nitrocellulose. L'ADN est fixé en chauffant à 80°C sous vide pendant deux heures. Le criblage des plasmides portant la construction désirée a été effectué en utilisant comme sondes radioactives les oligonucléotides marqués au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

5.2.2 Transfert d'ADN à partir de colonies bactériennes.

La libération d'ADN et le transfert sur membrane de nitrocellulose sont faits selon la méthode décrite par Maniatis *et al.*, 1982. Les colonies qui ont poussé sur un milieu solide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée pendant 3 heures à 37 °C sur un milieu solide. La membrane est déposée durant 3 minutes sur un filtre Whatman 3MM imbibé d'une solution de SDS 10% (sodium dodecyle sulfate) pour permettre la lyse cellulaire.

L'ADN libéré est ensuite dénaturé sur un filtre Whatman 3MM imbibé d'une solution de NaOH 0.5M et NaCl 1.5M. Après 5 minutes, la membrane de nitrocellulose est transférée dans une solution neutralisante contenant NaCl 1.5 M et Tris-HCl 0.5 M pH 8, et ce, pendant 5 minutes. Finalement, la membrane de nitrocellulose est séchée à la température de la pièce au moins 1 h, puis l'ADN est fixé à 80°C sous vide pendant 2 heures.

5.3 Hybridation.

5.3.1 Avec des oligonucléotides.

Une préhybridation est réalisée pendant 1 h à 42°C dans une solution contenant du tampon phosphate 50 mM pH 7, SDS 0.1%, Denhardt 5x (50 x: Ficoll 5 g, polyvinylpyrrolidone 5 g, bovine sérum albumine BSA 5 g par 500 ml), 0.1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon et SSC 6x (dilution d'une solution SSC 20x: NaCl 175.3 g, acétate de sodium 88.2 g par litre, pH 7). Pour l'hybridation, on a ajouté à la solution de préhybridation, la sonde radioactive, puis on a incubé durant 16 heures à 42°C. Ensuite, la membrane de nitrocellulose est lavée trois fois à la température de la pièce dans une solution de SSC 6x, SDS 0.1% pendant 20 minutes. Deux lavages sont faits pendant 20 minutes dans une solution contenant du nitrochlorure de tétraméthyle (Me₄NCl) 3M, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM, SDS 0.1% à la température indiquée par Wood *et al.*, 1985, selon la longueur de l'oligonucléotide. La membrane de nitrocellulose est séchée à la température de la pièce. La membrane est autoradiographiée avec un film Kodak X-OMAT AR avec des écrans intensifiants pendant une période de 3 à 16 heures à -70°C.

5.3.2 Avec de l'ADN radioactif.

L'hybridation est réalisée dans le même tampon que précédemment mais à 68°C. La membrane de nitrocellulose est lavée trois fois dans un tampon SSC 0.1%, SDS 0.1% à la température de la pièce pendant 10 minutes, et 2 heures dans le même tampon à 68°C. La membrane est exposée et soumise à l'autoradiographie, tel que décrit ci-haut.

6. MUTAGENESE DIRIGEE.

6.1 Production des phagemides contenant des uraciles.

Le principe de la méthode développée par Hutchinson et al., 1978, et modifiée par Kunkel et al., 1987, permet de produire et de sélectionner des mutations spécifiques. Pour cela, le fragment d'ADN que l'on souhaite muter est cloné dans un phagemide qui sert à la transformation de la souche CJ 236 (dut-ung-) tel que décrit plus avant au chapitre 4.4 de matériel et méthodes. Cette souche porte la mutation (dut-) qui altère l'enzyme dUTPase, celle-ci devient inactive et l'hydrolyse de UTP à UMP n'a pas lieu. Ceci cause une accumulation d'UTP dans la cellule. La mutation ung- inactive l'uracile N-glycosylase ce qui la rend incapable de retirer les uraciles qui peuvent entrer anormalement dans la molécule d'ADN à la place de thymines. L'accumulation de l'UTP et l'impossibilité d'enlever les uraciles de l'ADN, permettent d'avoir un phagemide contenant des uraciles à la place de thymines.

6.2 Production d'ADN simple brin.

Les transformants contenant les phagemides ayant intégré des uraciles sont infectés

avec le phage M13 K07 qui permet la production d'ADN simple brin et son emballage. L'infection est faite dans un milieu 2xYT additionné de glucose 0.5%, d'ampicilline 100 μ g/ml, de chloramphenicol 30 μ g/ml, de kanamycine 70 μ g/ml et d'uridine 0.25 μ g/ml, à 37°C, toute la nuit, et avec une agitation à 250 rpm. Ainsi, les phages contenant le phagemide simple brin d'intérêt sont récupérés du surnageant (20 ml) par précipitation avec 5 ml d'une solution PEG 6000 20%, NaCl 2.5 M, pendant 30 minutes, à la température de la pièce. Ensuite, une digestion à la ADNase 50 μ g/ μ l et à la ARNase 10 μ g/ μ l élimine la plupart des acides nucléiques contaminants. Les protéines sont éliminées par extraction au phénol, et l'ADN simple brin est récupéré par précipitation à l'éthanol.

6.3 Mutagenèse.

6.3.1 Phosphorylation des oligonucléotides.

L'oligonucléotide (10 pmol) synthétisé *in vitro* contenant la mutation désirée est phosphorylé au moyen de 4.5 unités de T4 polynucléotide kinase et de 1mM d'ATP, dans un volume de 10 μ l. La réaction se fait à 37°C pendant 30 minutes, et elle est arrêtée en chauffant le mélange à 65°C.

6.3.2 Hybridation.

Une pmole de l'oligonucléotide, préalablement phosphorylé, est hybridé à 0.1 pmol d'ADN simple brin contenant des uraciles dans un volume de 10 μ l. La solution est chauffée à 80°C pendant 5 minutes, puis refroidie graduellement jusqu'à 30°C.

6.3.3 Synthèse du brin d'ADN complémentaire.

En utilisant le mélange d'hybridation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée à l'aide de 2.5 unités de T4 ADN ligase et de 1 unité de T4 ADN polymérase et de 1 μ l de solution contenant: dATP, dCTP, dGTP et dTTP à une concentration de 5 mM, ATP 10 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.4, MgCl₂ 50 mM et DTT 20 mM. Le mélange est incubé durant 5 minutes sur la glace, 5 minutes à la température de la pièce, puis une heure et demie à 37°C.

6.4 Transformation d'*E. coli* MC1061.

Le mélange final est utilisé pour la transformation d'*E. coli* MC1061 qui permettra lors de la réplication du phagemide, l'incorporation des thymines à la place des uraciles (voir 4.4).

7. SEQUENÇAGE.

Les mutations produites ont été vérifiées par séquençage au moyen de la technique développée par Sanger *et al.*, 1977.

8. REACTION DE LA POLYMERASE EN CHAÎNE (PCR).

Nous avons utilisé la technique de la polymérase en chaîne, afin d'incorporer le promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis*, au ATG de départ du gène de la xylanase de *C. albidus*. Les conditions de réaction ont été la dénaturation de l'ADN à 95°C durant 1 minute, l'étape de appariement de l'amorce d'ADN à 52°C pendant 1 minute et

l'élongation de l'amorce d'ADN à 72°C durant 3 minutes. Ces réactions sont répétées pendant 30 cycles dans un appareil à PCR (LKB Pharmacia). Un fragment Bam HI-KpnI de 620 pb produit de cet amplification, a été purifié par électroélution et cloné dans le plasmide pIAF 141 préalablement digéré avec Bam HI et Kpn I.

9. ANALYSE DES PROTEINES.

9.1 Préparation des échantillons.

9.1.1 Récupération du surnageant de culture.

A partir de cultures de glucose, de galactose et de xylose, on récupère les surnageants pour l'analyse des protéines. Les cellules en phase stationnaire ont été centrifugées à 5 000 rpm pendant 10 minutes, à 4°C, dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B et un rotor GSA.

9.1.1.1 Précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA).

Les protéines provenant des surnageants de culture sont récupérées par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA). Pour cela, on a ajouté au surnageant 1/4 de volume d'une solution de TCA 50%, contenant 2% de désoxycholate de sodium. Les protéines précipitent pendant 30 minutes à 0°C. Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes, le culot est lavé au TCA 10% et à l'acétone. Finalement, le précipité est séché sous vide toute la nuit et suspendu à nouveau dans un tampon à électrophorèse.

9.1.1.2 Lyophilisation.

Les surnageants sont placés dans une membrane de dialyse "spectrapor membrane tubing" qui retient des molécules supérieures à 14 000 Da. Les échantillons sont dialysés pendant 48 heures à 4°C, dans l'eau. Des changements d'eau sont effectués 4 à 5 fois par jour. Après la dialyse, le milieu est concentré par lyophilisation. La poudre obtenue est suspendue à nouveau dans 4 ml d'eau et la solution est à nouveau dialysée et lyophilisée. Le résidu est suspendu à nouveau dans 500 μ l d'eau.

9.1.2 Cassage cellulaire.

On détermine le poids des cellules provenant des cultures. Les cellules sont congelées dans un bain de méthanol et de glace sèche. Après décongélation, elles sont resuspendues dans 4 volumes d'eau selon le poids de cellules et cassées en utilisant 1 volume égal de billes de verre. Le cassage est produit en agitant vigoureusement au moins 3 fois, pendant 30 secondes sur un vortex.

9.2 Dosage de protéines.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.*, 1951.

9.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode décrite par Laemmli, 1970. On a utilisé un gel de séparation de 9% de polyacrylamide et un gel de concentration de 4%. A 100 μ g de protéines, on a ajouté le

tampon d'électrophorèse, et les protéines sont dénaturées par ébullition pendant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été chargés sur le gel et l'électrophorèse a été faite pendant 16 heures et 40 volts.

9.4 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

Le transfert des protéines du gel à la membrane de nitrocellulose a été effectué en utilisant une cellule de transfert (BIO-RAD, Trans-Blot Cell semi dry). Pour le transfert des protéines, on dépose entre les deux électrodes d'acier inoxydable en couches successives et dans l'ordre suivant: un papier filtre Whatman 3MM imbibé du tampon de transfert (Tris 48 mM pH 9.2, glycine 39 mM, méthanol 20%, SDS 1.3 mM), la membrane de nitrocellulose, le gel de polyacrylamide préalablement équilibré dans le tampon de transfert, et finalement un autre filtre Whatman 3MM, aussi imbibé du tampon de transfert. Un courant de 2.5 mA par cm² est appliqué pendant une heure. Après le transfert, la membrane est séchée à la température de la pièce pendant 3 heures.

9.5 Immuno-détection.

Pour la détection de la xylanase, on a d'abord saturé la membrane avec des protéines dans le tampon PBS (NaH₂PO₄-H₂O 0.45 g, Na₂HPO₄-7H₂O 1.8 g, NaCl 8.5 g; EDTA 0.05 g pH 7.2 le volume est ajusté à un litre) contenant 3% de lait écrémé. Après une heure, le tampon est remplacé par 10 ml du même tampon contenant 50 µl d'anticorps anti-xylanase (sérum total) de *C. albidus*. Puis on incube pendant 3 heures. La membrane est rincée et lavée trois fois pendant dix minutes avec du PBS contenant 0.5% de Triton X-100. Elle est lavée une

dernière fois avec du PBS, mais sans Triton X-100. La membrane de nitrocellulose est incubée dans le tampon PBS avec du lait écrémé 3% et 3 μ l de protéine A marquée à l'iode radioactif (125 I, Amersham Inc). Ensuite, la membrane est lavée trois fois durant dix minutes dans le tampon PBS et Triton X-100. La membrane est séchée puis autoradiographiée avec un film Kodak X-O-Mat AR avec des écrans intensifiants.

9.6 Test enzymatique.

L'activité enzymatique est mesurée en incubant pendant 20 minutes, à 30°C, 1 ml du mélange de la réaction contenant du xylane 1%, dans du tampon citrate phosphates pH 5.4 et 0.5 ml d'échantillon. La formation des sucres réducteurs est déterminée par la réaction à l'acide dinitrosalicylique, en utilisant le xylose comme standard (Miller, 1959). Une unité internationale (U.I.) de xylanase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère du xylane 1 μ mol équivalents de xylose par minute dans les conditions ainsi définies.

10. ANALYSE PAR HPLC ("High Performance Liquid Chromatography").

A partir des cultures anaérobiques, on a prélevé 1 ml d'échantillon centrifugé à 10,000 rpm pendant 5 minutes, puis filtré en utilisant un filtre Gelman 0.2 μ m. Les échantillons sont alors congelés à -70°C. Juste avant de les utiliser, ils sont décongelés et centrifugés à 10,000 rpm pendant 5 minutes. Ils sont ensuite acidifiés à pH 3 avec de l'acide sulfurique 1 N. Les échantillons sont analysés sur une colonne HPX-87H (BIO-RAD), qui est une résine échangeuse d'ions. Une solution de H₂SO₄ 0.02 N sert d'éluant avec un débit de 0.8 ml/min à 65°C.

RESULTATS

1. CONSTRUCTION DES PLASMIDES.

Le gène de la xylanase de *Cryptococcus albidus* a été exprimé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez *E. coli* (Moreau *et al.*, 1992; Morosoli *et al.*, 1992). Le plasmide pIAF 124 contient le gène chromosomique avec 7 introns (1.5 kb) et le plasmide pIAF 131 qui contient le cADN (1.1 kb). A partir de ces deux plasmides, et en utilisant le vecteur navette pJH-S pour la transformation de *Pichia stipitis*, nous avons construit les plasmides pIAF 141 (cADN sous le contrôle du promoteur du gène de la xylanase de *C. albidus*), pIAF 142 (cADN sous le contrôle du promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* situé 900 pb en amont de l'ATG de départ), pIAF 143 (contenant le gène chromosomique de la xylanase sous le contrôle de son propre promoteur) et pIAF 145 (contenant le cADN et le promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* situé juste en amont de l'ATG de départ du gène de la xylanase).

Le clonage a été fait dans les seules sites utilisables Bam HI et Pst I du vecteur navette pJH-S (Fig. 3). Pour permettre un clonage direct dans ces sites de restriction, dans une première étape nous avons modifié par mutagénèse dirigée le gène chromosomique de la xylanase qui contenait un site Bam HI et Pst I à l'intérieur du gène et le cADN qui contenait seulement le site Bam HI car le site Pst I se trouvait à l'intérieur d'un intron.

L'oligo R48 5'CTC CGG GAA TCC ATG3' a permis la délétion du site Bam HI (GGATCC) en changeant un C par un T en position 2027 dans la séquence. Cette modification n'a pas altéré le codon correspondant à l'isoleucine (ATC ou ATA); ce fait est important à surveiller car on se retrouve dans la séquence du gène de structure. Un changement dans le codon constitue une modification de l'acide aminé et par conséquent de la protéine.

Pour l'élimination du site Pst I (CTGCAG) du gène chromosomique nous avons utilisé l'oligo R51 5'GGC TTA CGG CAG TCT3' qui a servi pour changer un A par un C en position 1454 et, là encore, sans modifier l'acide aminé (ACT ou ACG, codant pour la thréonine).

Après mutagenèse, la sélection des transformants d'*E. coli* portant la mutation a été faite par hybridation directe sur les colonies en utilisant comme sondes les oligos R48 ou R51 marqués au ³²P selon le cas (Fig. 5A). Cette technique a été pratiquée à titre d'exercice, comme technique générale de détection des mutations. Parallèlement à l'hybridation, les plasmides ont été digérées par Bam HI et Pst I pour vérifier rapidement l'élimination des sites de restriction Bam HI et Pst I dans l'ADN chromosomique et celle du site Bam HI dans le cADN.

Nous avons purifié le plasmide des colonies bactériennes donnant des signaux positifs à l'hybridation. Ceux-ci ont été soumis à une deuxième hybridation par "dot-blot" afin de s'assurer que les clones choisis contenaient bien le plasmide avec la mutation recherchée (Fig. 5B). Le rendement obtenu est de 30 % de clones positifs par rapport au nombre de transformants.

Le gène chromosomique et le cADN, modifiés par mutagenèse dirigée, ont été purifiés par électroélution comme un fragment isolé Bam HI-Pst I d'environ 3.2 kb et 2.8 kb respectivement. Par la suite ils ont été clonés dans le vecteur navette pJH-S en utilisant les sites de restriction Bam HI et Pst I.

Le plasmide pIAF141 contenant le cADN donnera l'information sur l'expression du gène, à partir du promoteur de *C. albidus*. La construction du plasmide pIAF143 contenant le gène chromosomique permet de déterminer si *P. stipitis* est capable de réaliser l'épissage du gène.

La construction de pIAF 143 contenant le gène chromosomique et de pIAF 141 ayant le cADN a été vérifiée par digestion avec les enzymes de restriction Bam HI et Pst I. Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% (Fig. 6). Ils correspondent au plasmide pJH-S avec une taille de 7 kb et un fragment de 3.2 kb pour le gène chromosomique et de 2.8 kb pour le cADN (Fig. 6 C,D).

L'expression hétérologue d'un gène peut être facilitée si l'organisme hôte peut reconnaître un de ses propres promoteurs. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser le promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis* afin de faciliter l'expression du gène de la xylanase de *C. albidus*. La xylose réductase est utilisée pendant la fermentation du xylose par *P. stipitis*; cet enzyme fait la conversion du xylose en xylitol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1991). Le gène de la xylose réductase a été caractérisé et le promoteur a été cloné dans le plasmide p5'XYL32.

Donc, à partir du plasmide p5'XYL32, nous avons purifié par électroélution le promoteur de la xylose réductase XYL 1, un fragment Bam HI de 350 pb (Fig. 6B) et nous l'avons inséré dans le plasmide pIAF 141 contenant le cDNA de la xylanase au site de restriction Bam HI.

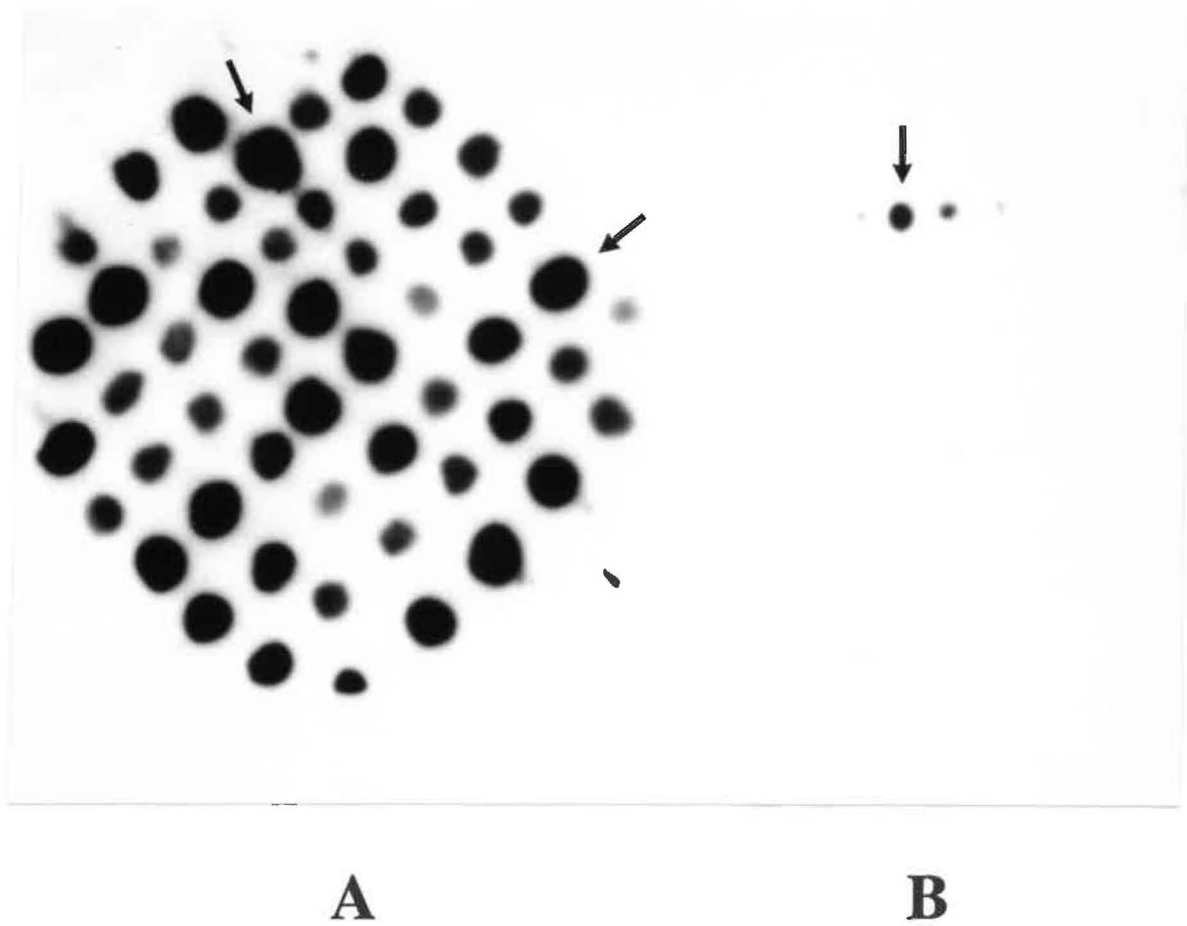


Fig. 5. Criblage des clones après mutagénèse.
(A:Hybridation par colonie; B:Hybridation par "dot-blot").

Ce plasmide pIAF 142 contient le promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* situé à 900 pb en amont de l'ATG de départ du gène de la xylanase. La digestion Bam HI-PstI permet de vérifier l'orientation du promoteur et montre que les fragments obtenus correspondent au plasmide PJH-S de 7 kb, au cADN de 2.8 kb et à deux fragments du promoteur de 200 pb et de 150 pb respectivement (Fig. 6E).

Pour rapprocher le promoteur et placer le gène de la xylanase uniquement sous contrôle du promoteur de la xylose réductase, nous avons réalisé la construction du plasmide pIAF145. Le promoteur a été placé en amont de l'ATG de départ du gène de la xylanase de *C. albidus* en utilisant la technique de PCR (polymerase chain reaction).

La stratégie comprend trois étapes principales: l'amplification de la séquence du promoteur, l'amplification du gène de la xylanase de *C. albidus* et la jonction de deux fragments par amplification (Fig. 7). La première étape a été réalisée en utilisant l'oligo R67 (5'CTA TAT GGA TCC ACA GAC ACT^{3'}) qui contient le début du promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis*, et l'oligo R68 (5'GGT TGA AGA GAG CAT TAG AAA AGA ATA CTG^{3'}) qui contient la fin de ce promoteur (souligné) et le début du gène de la xylanase de *C. albidus*.

Le gène de la xylanase de *C. albidus* a été amplifié en utilisant l'oligo R69 (5'CAG TAT TCT TTT CTA ATG CTC TCT TCA ACC^{3'}) qui contient la fin du promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* (souligné) et le début du gène de la xylanase, et l'oligo R14 (5'GTC TGA CTG CTT TGT CAC TTA TGA CTC CAG^{3'}) qui contient la séquence du site de restriction Kpn I pour faciliter le clonage. Finalement, la jonction des deux fragments par amplification a permis la construction du fragment Bam HI-Kpn I (620 pb) portant le cDNA du

gène de la xylanase de *C. albidus* sous le contrôle du promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* (Fig. 7). Ce fragment a été cloné dans le plasmide pIAF 141 délété du fragment BamHI / Kpn I (1.2 kb).

La construction a été vérifiée par digestion avec Bam HI et Pst I sur gel d'agarose. Les fragments obtenus correspondent au plasmide PJH-S de 7 kb à un fragment de 2.3 kb et à un petit fragment de 150 pb (Fig. 6F). La construction de ce dernier plasmide a été vérifiée aussi par séquençage. Une carte de restriction de chaque insert est illustrée à la Fig. 8.

2. TRANSFORMATION DE *Pichia stipitis*.

Avant de transformer *P. stipitis*, nous nous sommes assurés que cette souche hôte PJH53 ne contenait pas un gène semblable au gène de la xylanase de *C. albidus*. A cet effet, nous avons réalisé une hybridation par "dot-blot" avec l'ADN chromosomique de *P. stipitis* et l'ADN chromosomique de la xylanase de *C. albidus*, en utilisant comme sonde un fragment de restriction Kpn I-Hind III (1.2 kb) situé à l'intérieur du gène de la xylanase de *C. albidus*, qui a été préalablement amplifié par PCR.

Les résultats montrent que la sonde a hybridé avec l'ADN de *C. albidus* mais n'a pas hybridé avec l'ADN de *P. stipitis*. Non seulement *P. stipitis* ne contient pas de séquences apparentées au gène de la xylanase de *C. albidus*, mais elle ne produit pas de zone d'éclaircissement sur des plaques contenant du RBB-xylane (Fig. 9). Ce test est très sensible et permet de détecter moins de 1 milli unité d'activité enzymatique Biely *et al.*, 1985). On peut donc affirmer que *P. stipitis* n'est pas productrice de xylanase.

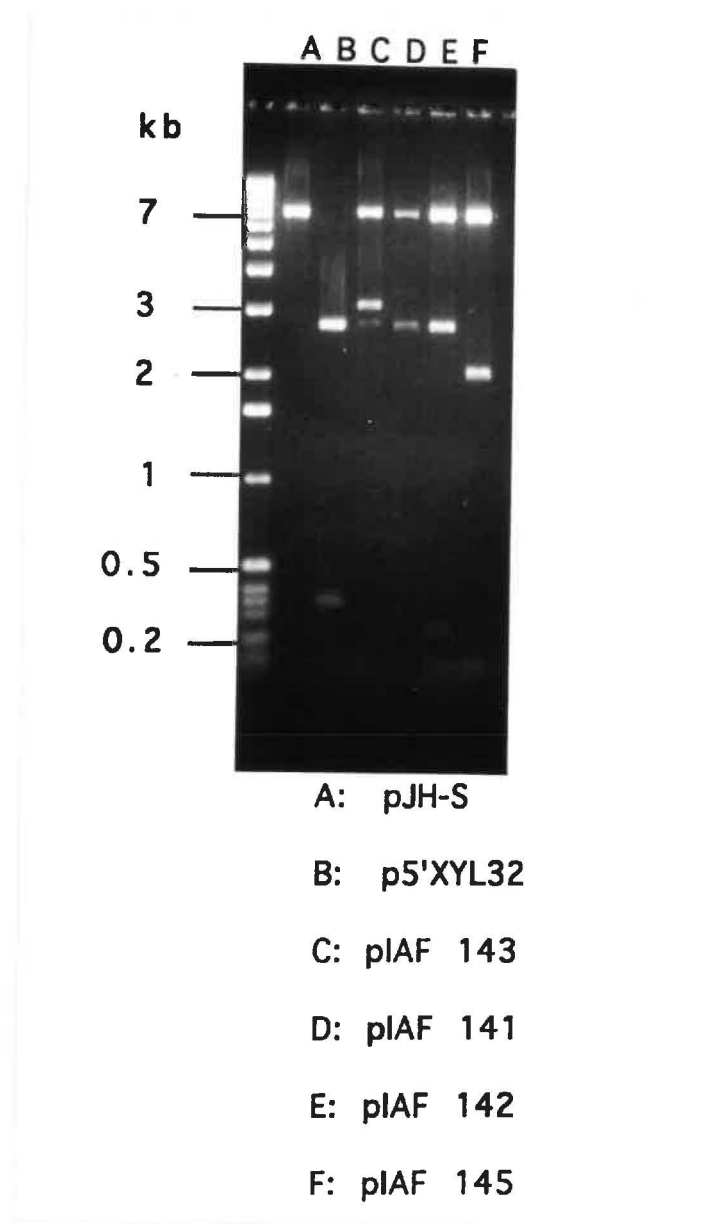


Fig. 6. Vérification de la construction des plasmides sur gel d'agarose.

PCR

ETAPE 1: AMPLIFICATION DU PROMOTEUR XYL 1



ETAPE 2: AMPLIFICATION DU GÈNE DE LA XYLANASE ENTRE L'ATG ET LE SITE Kpn I



ETAPE 3: JONCTION DES DEUX FRAGMENTS PAR AMPLIFICATION

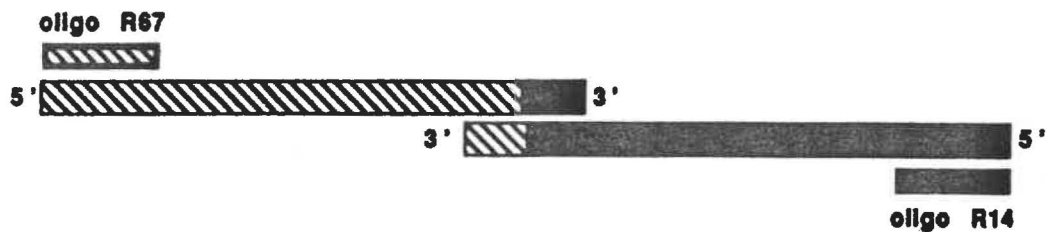


Fig. 7. Stratégie utilisée pour rapprocher le promoteur de la xylose réductase de *Pichia stipitis* au ATG de départ du gène de la xylanase.

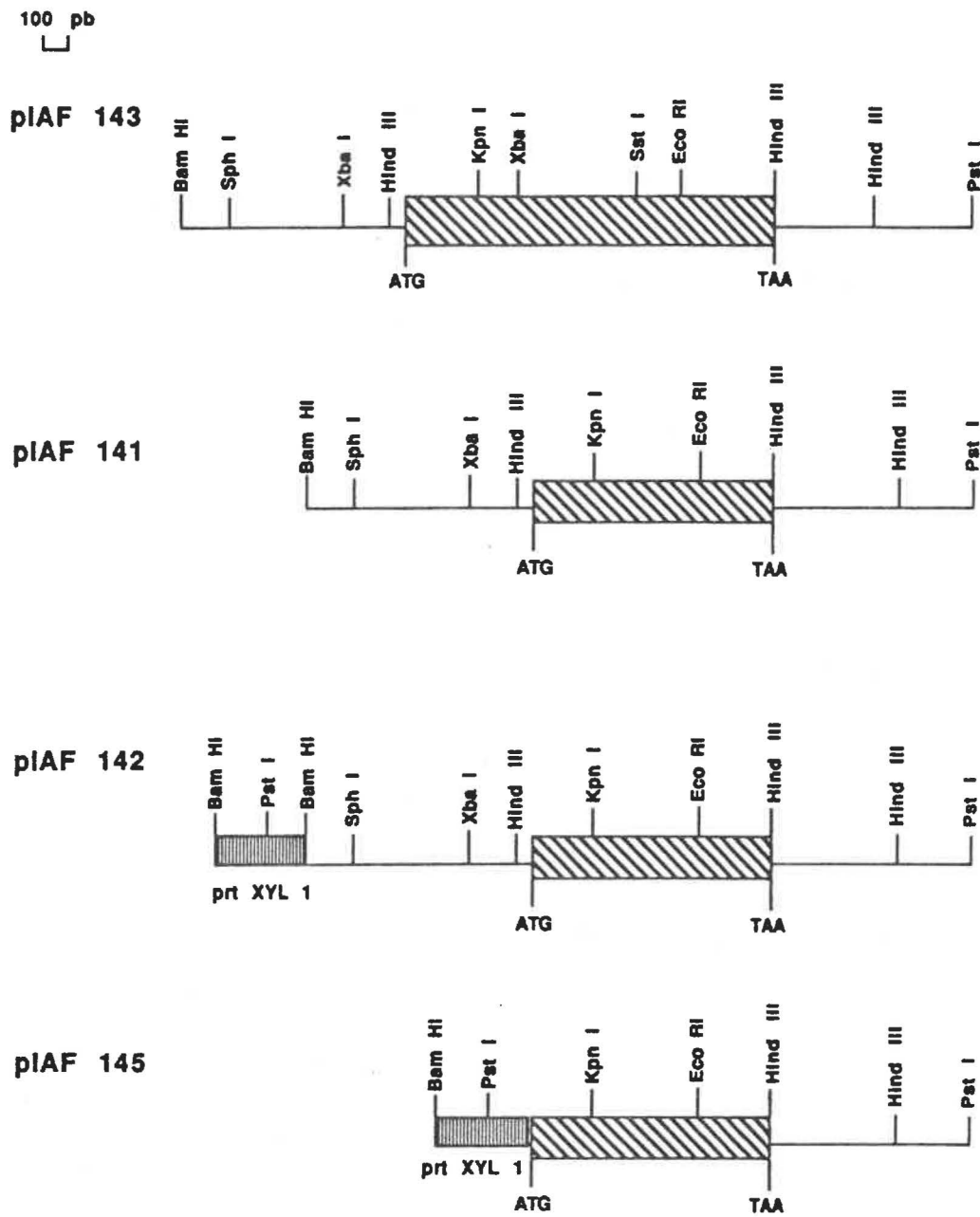


Fig. 8. Cartes de restriction des inserts construits.

La transformation de *P. stipitis* a été réalisée en utilisant la technique de Klebe et al., 1983. Les plasmides employés pour la transformation sont pJH-S (vecteur navette), pIAF 141 (cADN sous le contrôle du promoteur du gène de la xylanase de *C. albidus*), pIAF 142 (avec le promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis*, situé à 900 pb en amont du cADN du gène de la xylanase de *C. albidus*), pIAF 143 (gène chromosomique de la xylanase de *C. albidus* sous contrôle de son propre promoteur), et pIAF 145 (cADN du gène de la xylanase de *C. albidus* sous le contrôle du promoteur de la xylose réductase de *P. stipitis* situé juste en amont de l'ATG de départ du gène de la xylanase).

La sélection des transformants a été faite sur milieu minimal SD additionné de tryptophane. Les transformants capables de pousser sur milieu minimal portent le plasmide qui complémente l'auxotrophie à l'histidine. Avec cette technique de transformation, nous avons obtenu un rendement de 1×10^2 à 5×10^2 transformants par μg d'ADN.

Le criblage de transformants producteurs de xylanase a été réalisé sur plaques de milieu minimal SD contenant du RBB-xylane et différentes sources de carbone (galactose, glucose, xylose). Lorsqu'il y a production de xylanase, il y a apparition d'une zone d'éclaircissement autour de la colonie comme résultat de l'activité xylanasique. L'enzyme hydrolyse le RBB-xylane en petits fragments qui diffusent rapidement dans le milieu, créant ainsi un affaiblissement de la coloration bleue. Dans la figure 10, on peut apprécier les résultats de cette sélection. Tel que nous l'avons montré, la souche hôte est incapable de croître sur un milieu minimal puisqu'elle est un mutant auxotrophe aux acides aminés histidine et tryptophane. Le transformant contenant uniquement le vecteur navette, a servi comme contrôle pour

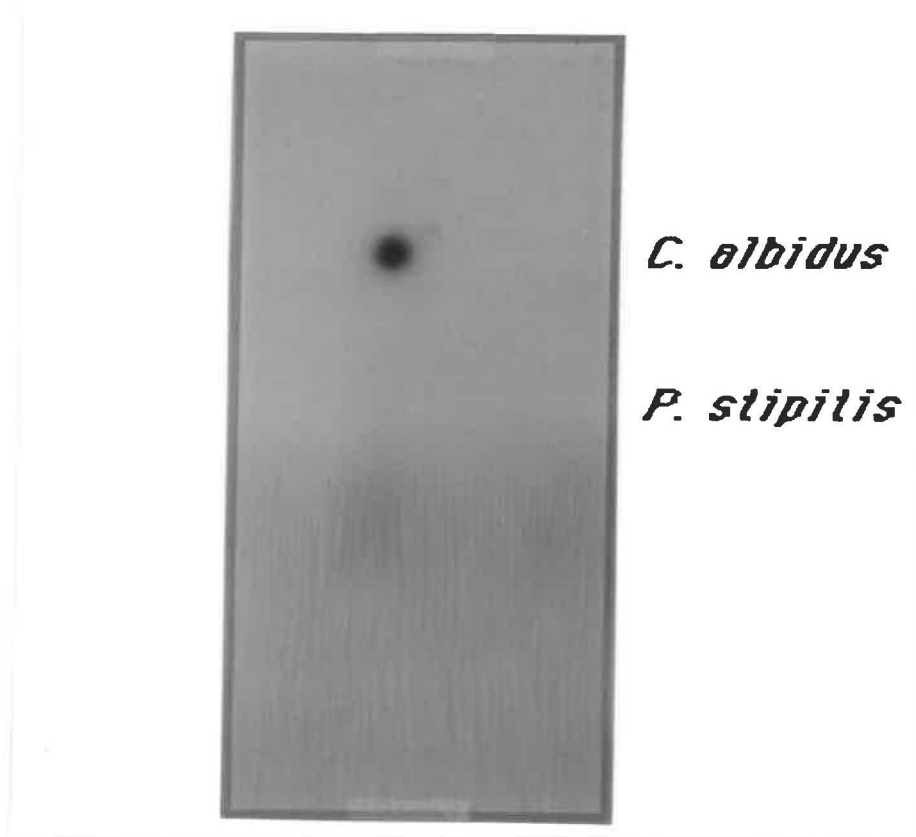


Fig. 9. Hybridation de l'ADN chromosomique de *C. albidus*
et *Pichia stipitis* avec le gène de la xylanase.

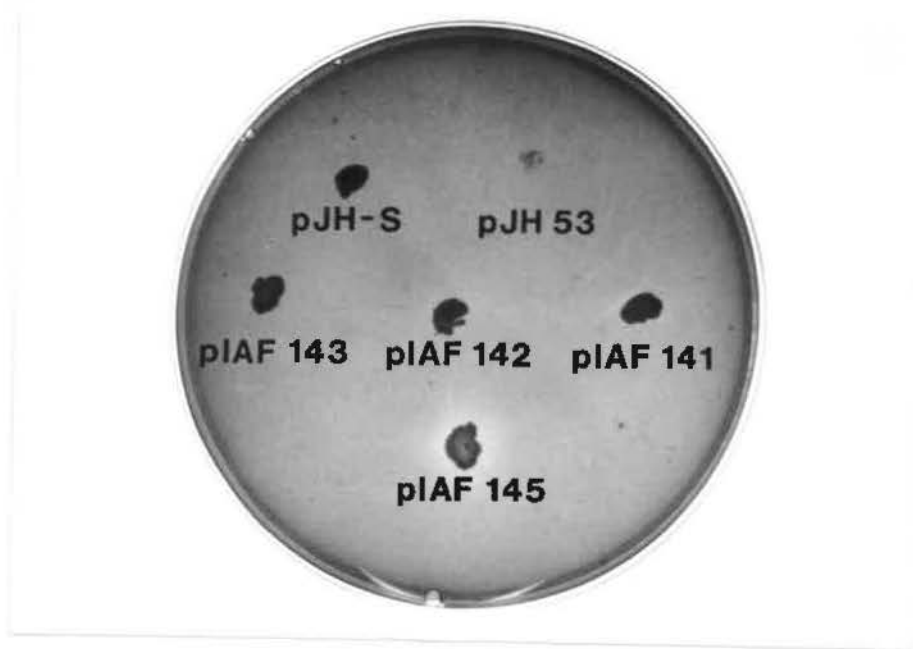


Fig. 10. Criblage des transformants producteurs de xylanase.

démontrer que la transformation a eu lieu; mais la souche n'est pas capable de produire une xylanase donc, on n'observe pas de zone d'éclaircissement autour de la colonie. Les transformants contenant le gène chromosomique, le cADN sous contrôle du promoteur de la xylanase, le cADN sous contrôle du promoteur de la xylanase avec le promoteur éloigné de la xylose réductase n'ont pas montré d'activité xylanasiq. Parmi les différentes constructions, seule le transformant IAF 145 a montré une activité xylanasiq clairement détectable (Fig. 10).

Puisqu'aucune activité xylanasiq n'a été observée chez les autres transformants, nous avons utilisé le transformant IAF 145 dans la suite du travail.

3. CROISSANCE SUR XYLANE.

Comme le clone IAF 145 produisait de la xylanase, nous avons voulu savoir si la quantité de xylanase sécrétée était suffisante pour permettre une croissance sur milieu minimal contenant du xylane comme seule source de carbone. La figure 11 montre la courbe de croissance sur xylane du transformant IAF 145. Cette souche a un temps de génération de 6 heures et elle est parfaitement capable de croître sur le xylane, tandis que la souche hôte PJH53 employée comme contrôle n'est pas capable d'utiliser ce substrat.

D'autre part, nous avons suivi la production de xylanase au cours de la croissance sur xylane. Les résultats montrent qu'il y a une production pendant la phase logarithmique de croissance et l'on obtient jusqu'à 0.36 U.I. (unité internationale /mg de protéine) d'activité. Et celle-ci diminue considérablement au début de la phase stationnaire (Fig. 11).

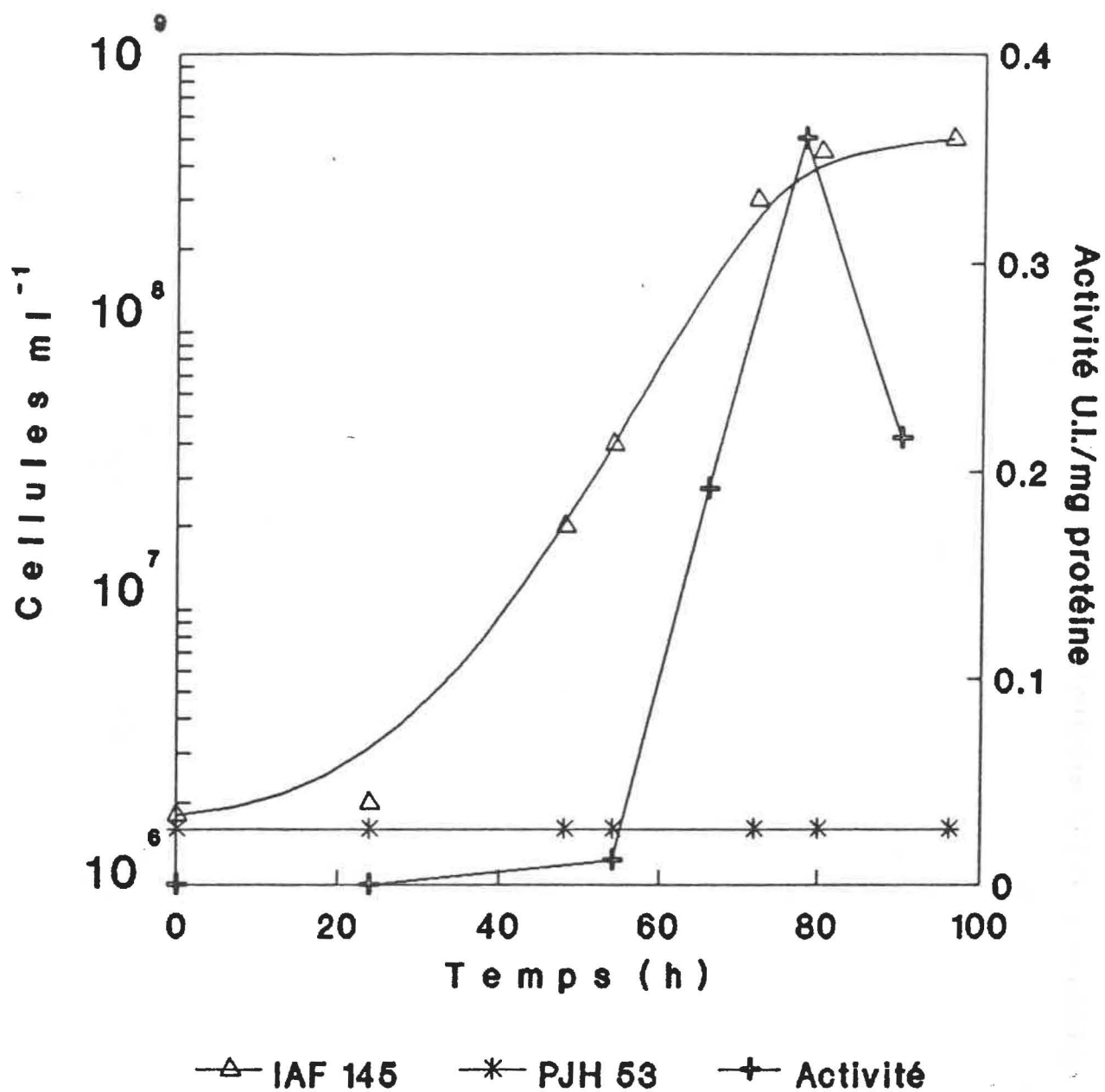


Fig. 11. Courbe de croissance du transformant IAF 145 sur xylane et activité de la xylanase.

4. IDENTIFICATION DE LA XYLANASE PAR IMMUNO-DETECTION.

Pour déterminer si la xylanase produite par *P. stipitis* était semblable à celle sécrétée par *C. albidus*, nous avons utilisé des anticorps spécifiques contre la xylanase de *C. albidus*. Pour cette expérience, nous avons employé les surnageants de culture en xylose des transformants, IAF 141, IAF 145 et de la souche PJH-53 qui ont été dialysés et concentrés par lyophilisation. Nous avons utilisé 100 μg de protéines pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et 1 μg de xylanase native de *C. albidus* comme contrôle.

Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Le standard de poids moléculaire a été coloré au bleu de Coomassie, donc n'apparaît pas sur l'autoradiogramme. Pour l'immunodétection nous avons utilisé des anticorps de lapin anti-xylanase de *C. albidus*, et la détection a été faite avec de la protéine A marquée à l'iode 125.

La figure 12 montre les résultats. Les signaux obtenus dans la colonne "c" correspondent à une xylanase produite par le transformant IAF 145, qui a une masse moléculaire de 50 kDa, 2 kDa plus élevée que celle de la xylanase de *C. albidus* de 48 kDa sous forme glycosylée (colonne "a"). Les protéines du surnageant de la souche PJH53 utilisées comme contrôle n'ont pas été reconnues par les anticorps anti-xylanase, preuve que cette souche ne produit pas de polypeptides ayant des épitopes communs à la xylanase (colonne "b"). Le transformant IAF 141 contenant le cDNA sous contrôle du promoteur du gène de la xylanase n'a pas produit la xylanase (colonne "d").

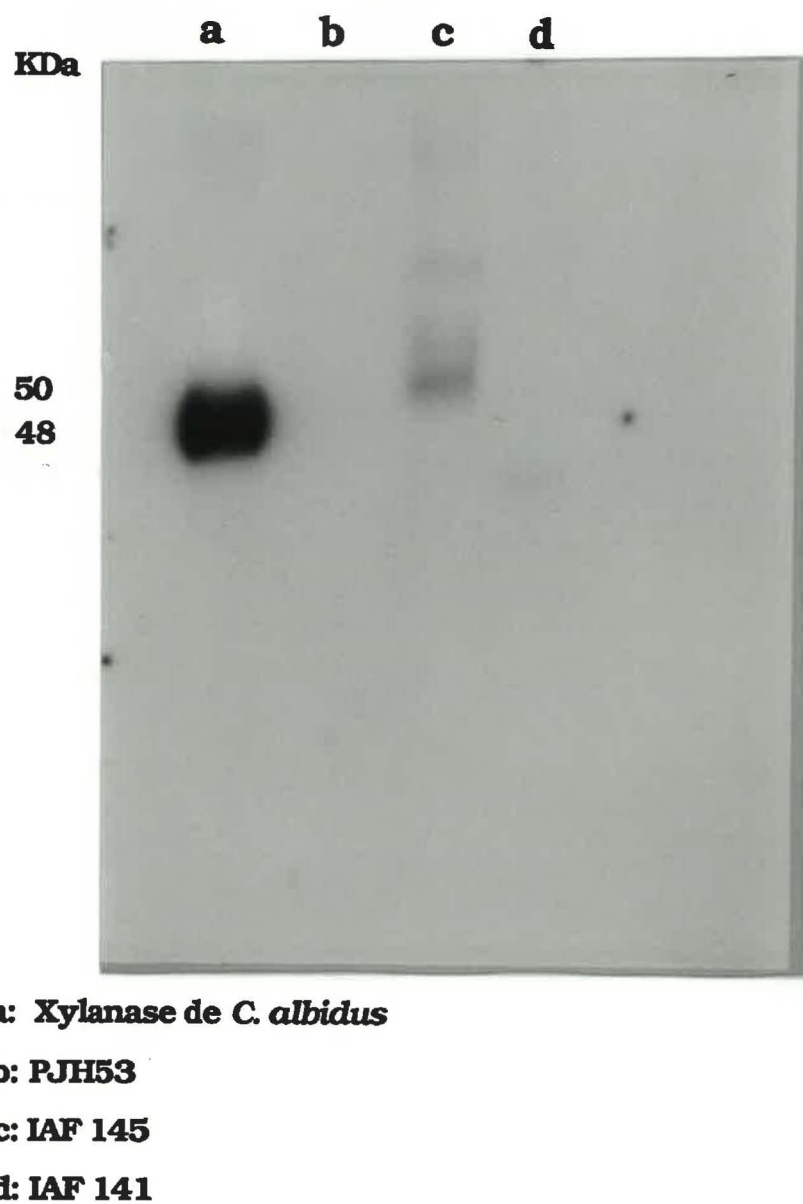


Fig. 12. Analyse des protéines du surnageant de culture des transformants de *Pichia stipitis*.

D'autres expériences ont démontré que cette xylanase est plutôt sécrétée dans le milieu de culture, puisque nous n'avons pas trouvé, par immunodétection, de xylanase dans les fractions membranaires et cytoplasmiques (résultats non reportés).

5. FERMENTATION.

Jusqu'à maintenant, nous avons montré que la levure contenant pIAF 145 produit une xylanase sécrétée dans le milieu de culture et qu'elle est capable d'utiliser le xylane comme seule source de carbone. Pour parvenir à l'objectif proposé dans ce travail, nous avons utilisé ce transformant afin de déterminer sa capacité de fermenter le xylane en éthanol.

Pour les essais de fermentation, nous avons effectué des pré-cultures en xylose 2% en conditions aérobiques, puisque *P. stipitis* ne pousse pas en conditions anaérobiques sur milieu xylose. Cette pré-culture a servi aux études en conditions anaérobiques. Les cellules 2×10^9 ont été lavées plusieurs fois avec de l'eau stérile et elles ont été transférées dans un milieu anaérobique contenant différents substrats comme du xylose, du xylobiose, du cellobiose et du xylane. Le milieu de culture a été préalablement désoxygéné par un mélange de gaz $N_2-H_2-CO_2$. Un prélèvement des échantillons a été fait tout au long de l'expérience et ceux-ci ont été conservés à $-70^\circ C$ jusqu'à l'analyse par HPLC.

Dans une première expérience, nous avons comparé la capacité de fermentation du xylose par la souche hôte PJH53 et par le transformant IAF 145. La graphique de la figure 13 montre que la souche PJH53 est capable d'utiliser le xylose dans les premières 48 heures et de le fermenter en éthanol (200 mM). Par contre, le transformant IAF 145 utilise graduellement

le xylose et produit jusqu'à 190 mM d'éthanol seulement après 168 heures de fermentation.

La capacité d'utilisation et de fermentation du cellobiose et du xylobiose par la souche hôte PJH53 a aussi été testée. Le graphique de la figure 14 présente les résultats de cette expérience. Cette souche a été capable d'utiliser le cellobiose faiblement et l'hydrolyse n'est pas complète au cours du temps d'expérimentation. D'autre part, l'utilisation du xylobiose a été réalisée dans les premières 24 heures et la fermentation a été complétée après 48 heures. Dans ce cas-ci, nous avons utilisé que 5 mM de xylobiose pour nos expériences car c'est un composé très coûteux. Il est cependant probable que ces deux disaccharides sont fermentés à peu près de la même façon et que la souche n'est pas capable de les utiliser complètement dans ces conditions. Etant donné le coût du xylobiose on n'a pas pu reproduire cette expérience avec le transformant IAF 145, en s'appuyant sur les résultats obtenus avec la souche réceptrice on pense que le transformant utilise de la même façon ces disaccharides.

Finalement, nous avons testé la capacité de fermentation du xylane par le transformant IAF 145, et ceci est montré à la figure 15. La fermentation à partir de 0.1% de xylane procède lentement au cours du temps et la souche produit environ 10 mM d'éthanol. La fermentation du xylane 1% s'opère rapidement pendant les premières 24 heures (30 mM d'éthanol), après quoi on observe une augmentation très faible.

6. STABILITE DU PLASMIDE pIAF 145.

Pour vérifier la stabilité du plasmide, nous avons regardé d'abord si le transformant était capable de croître en conditions anaérobiques. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de

croissance dans ces conditions, tel que rapporté par Hahn-Hägerdal *et al.*, 1991.

A partir de cultures en xylane 1% en phase stationnaire (96 h), nous avons vérifié la stabilité du plasmide du transformant IAF 145. Cette stabilité a été déterminée par le pourcentage de cellules qui ont conservé leur plasmide lors d'une sélection sur milieu sélectif, par rapport aux cellules qui ont poussé sur un milieu riche.

Les résultats ont montré que 50% des cellules qui avaient perdu leur plasmide après 16 générations. Cette proportion ne change pas en conditions anaérobiques, puisque dans ces conditions il n'y a pas de division cellulaire.

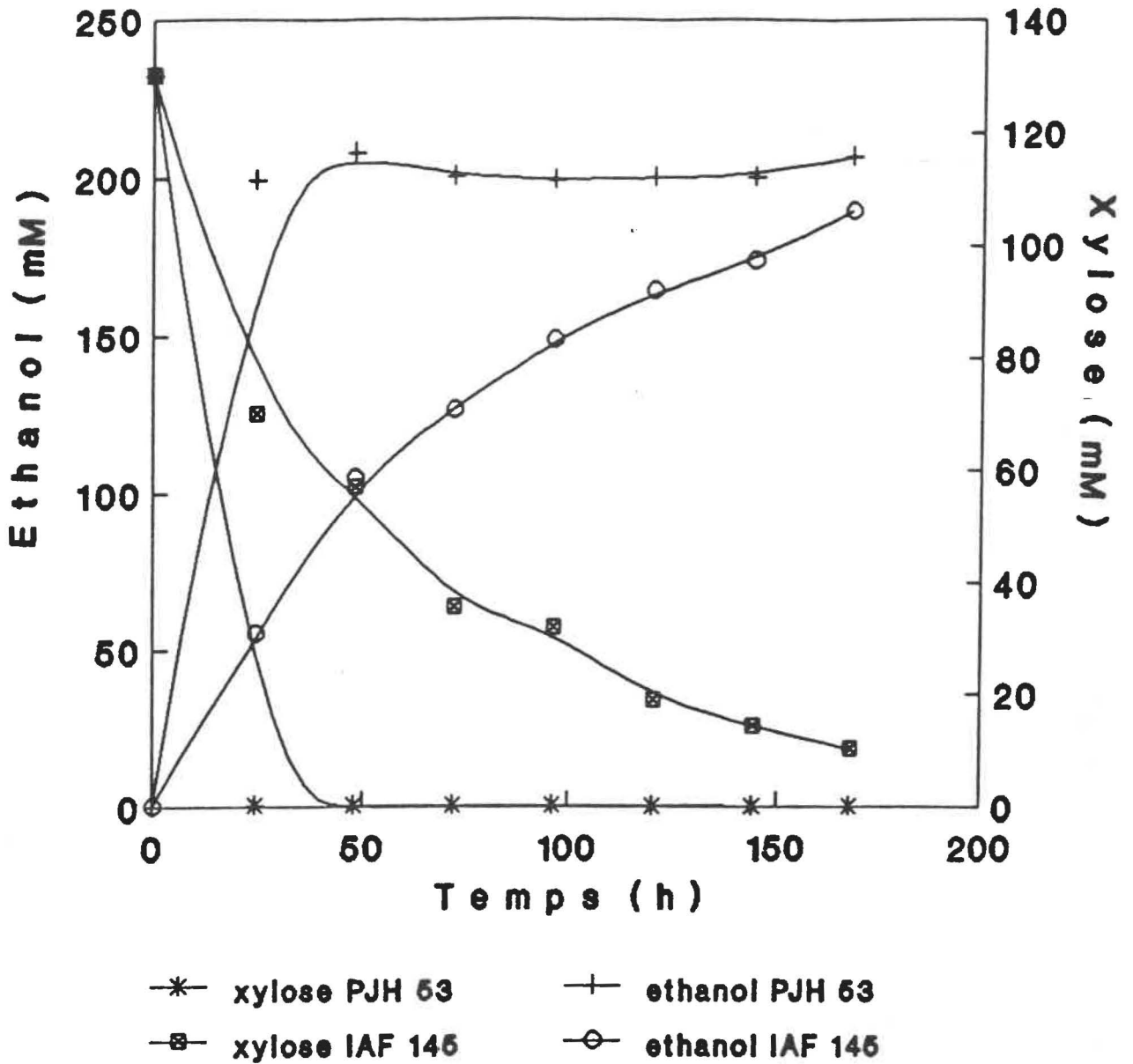


Fig. 13. Fermentation du xylose par *Pichia stipitis*

PJH53 et le transformant IAF 145.

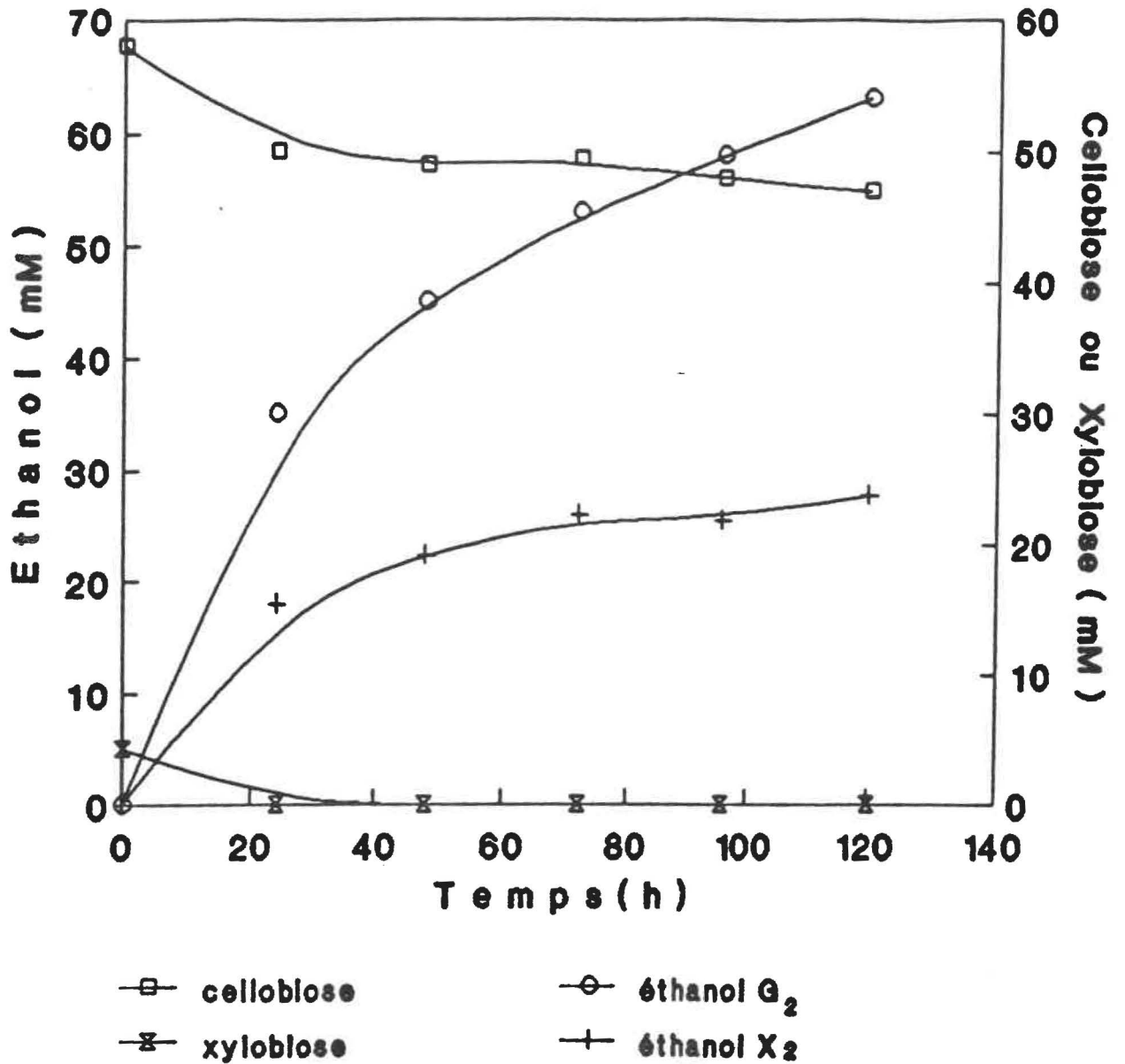


Fig. 14. Fermentation du cellobiose et du xylobiose par la souche PJH53 de *Pichia stipitis*.

(G₂: cellobiose; X₂: xylobiose)

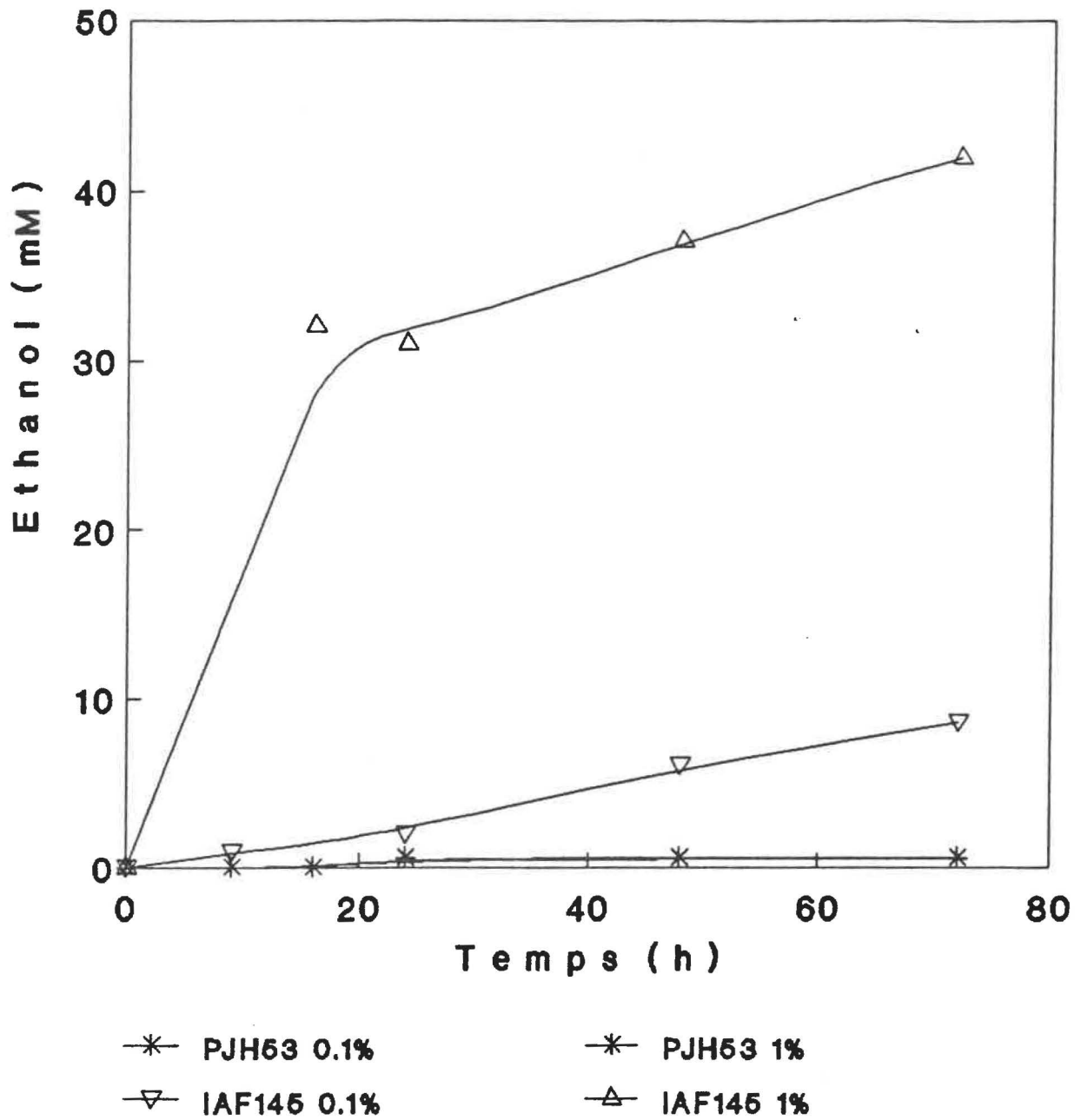


Fig. 15. Fermentation du xylane 0.1% et 1%
par le transformant IAF 145.

DISCUSSION

L'intérêt de ce travail était de modifier génétiquement une souche de levure *Pichia stipitis* afin de la rendre capable d'hydrolyser et de fermenter directement le xylane en éthanol. A cet effet, nous avons construit différents plasmides contenant le gène de la xylanase de *Cryptococcus albidus*, sous forme chromosomique (pIAF 143) et de cADN (pIAF 141) sous contrôle du gène de la xylanase de *C. albidus*. Dans la souche IAF 141 contenant le cADN, nous avons observé une très faible activité xylanasiqne difficile à observer sur plaques contenant du RBB-xylane mais nous n'avons pas observé la production de la xylanase par la souche contenant le plasmide pIAF 143. Nous avons montré que *P. stipitis*, comme *S. cerevisiae* (Moreau et al., 1992), fait difficilement ou ne fait pas du tout l'épissage du gène chromosomique. On pense que la transcription est effectuée car les deux transformants sont sous le contrôle du même promoteur et la souche IAF 141 est capable de produire une faible quantité de xylanase. Le promoteur du gène de la xylanase de *C. albidus* n'est pas très efficace chez *P. stipitis* et de plus, il est réprimé par le xylose (Morosoli et Durand, 1988b).

Pour cette raison, nous avons décidé d'insérer le gène de la xylanase sous le contrôle du promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis* (XYL 1). Le clone portant le plasmide pIAF 142 contenant le cADN sous le contrôle du promoteur XYL 1 placé 900 pb en amont du gène, n'exerçait pas d'effet bénéfique sur la production de xylanase et ce, probablement à cause de la distance entre ce promoteur et le gène de structure.

Lorsque nous avons approché le promoteur XYL 1 en amont du ATG de départ du gène de la xylanase, nous avons obtenu un transformant (IAF 145) capable de produire et de sécréter la xylanase. L'expression hétérologue du gène de la xylanase de *C. albidus* chez *P.*

stipitis a été réalisée seulement lorsque nous avons utilisé le gène sous forme de cADN, ce qui a éliminé l'épissage de l'ARNm nucléaire.

La même construction avec le gène de structure chromosomique n'a pas produit d'enzyme probablement à cause du manque ou de l'épissage incomplet de l'ARN messager. Nous ignorons pour l'instant les caractéristiques nécessaires à l'épissage chez *P. stipitis*, mais nous savons déjà que l'absence de la boîte TACTAAC est l'obstacle majeur trouvé lors de l'expression du gène chez *S. cerevisiae* (Moreau et al., 1992).

La xylanase produite par le clone IAF 145 a une masse moléculaire de 50 kDa, c'est-à-dire 2 kDa plus élevé que celle produite par *C. albidus*. Morosoli et al., 1988, ont démontré que la xylanase de *C. albidus* est hautement glycosylée. Ainsi la différence de masse moléculaire de la xylanase sécrétée par le clone IAF 145 peut être attribuée à une différence du degré de glycosylation entre *C. albidus* et *P. stipitis*. Il est peu probable, cependant, que cette glycosylation différente ait un impact sur l'activité xylanasique de l'enzyme, mais cela ne peut pas être exclu. L'enzyme n'a pas été purifiée, donc il est difficile de répondre à cette question. Toutefois, l'activité enzymatique par rapport à la quantité de xylanase détectée par les anticorps sur "Western-Blot", malgré toute son imprécision, ne semble pas différer de façon significative de l'activité spécifique de l'enzyme produite chez *C. albidus* et *P. stipitis*.

Le clone IAF 145 de *P. stipitis* produit une faible activité xylanasique de 0.36 U.I./mg de protéine, ce qui est 10 fois moins que *C. albidus*. Néanmoins la quantité d'enzyme produite est suffisante pour permettre au clone de croître en milieu xylane comme seule source de carbone; mais le temps de génération est de 6 heures. Le clone contenant uniquement le

plasmide pJH-S a un temps de génération de 3 heures sur xylose. Nous pouvons donc, affirmer que la quantité de sucres assimilables produite par la xylanase, suite à la dégradation du xylane, n'est pas suffisante pour amener la croissance rapide du clone en milieu xylane.

Cinq facteurs peuvent être considérer pour améliorer la production enzymatique de *P. stipitis*. Ce sont: le choix du promoteur, la stabilité du plasmide, l'utilisation d'un meilleur peptide signal, le clonage d'une xylanase plus performante et le contrôle de l'oxygène lors de la fermentation.

L'utilisation d'un promoteur propre à *P. stipitis* a permis l'expression du gène de structure de la xylanase. L'avancement des connaissances sur la génétique de *P. stipitis* permettra d'isoler et d'utiliser d'autres promoteurs forts pour l'expression des gènes chez *P. stipitis* en conditions anaérobiques. Il faudrait utiliser un autre promoteur que XYL1, car ce promoteur sur le plasmide pIAF 145 pourrait titrer certains éléments régulateurs du gène de la xylose réductase et ainsi affecter l'utilisation du xylose.

Clare et al., 1991, ont utilisé le pre-pro alpha facteur de *Saccharomyces cerevisiae* pour la sécrétion d'un facteur de croissance épidermique de souris chez *Pichia pastoris*. Nous avons montré que la xylanase produite par le clone IAF 145 sécrète la xylanase, mais on pourrait utiliser le peptide signal de *S. cerevisiae* pour assurer peut-être de façon plus efficace la sécrétion de la xylanase.

D'autre part, le clonage d'une xylanase plus performante, ayant une activité plus forte sur le xylane et une stabilité plus grande que celle de *C. albidus*, pourrait être effectué

afin d'augmenter la dégradation du xylane par cette souche. Par exemple, la xylanase de *Streptomyces lividans* atteint une activité spécifique de 380 U.I./mg de protéine (Mondou et al., 1986) au lieu de 131 U.I./ mg de protéine (Morosoli et al., 1986b), et elle est stable à 60°C tandis que *C. albidus* perd 50% de son activité après 5 minutes à cette température. La stabilité de l'enzyme est peut-être secondaire car les cultures de *Pichia* se font à 25°C.

La fermentation du xylane 1% en éthanol a donné une concentration de 30 mM après 24 h d'incubation, et une très faible augmentation est observée dans les heures suivantes. Une explication plausible serait que la xylanase sécrétée est dégradée dans le milieu de culture et alors réutilisée par les cellules. De plus, nous avons déterminé que 50% des cellules contiennent encore le plasmide après 16 générations. Une possible solution à ce problème de stabilité serait d'intégrer le gène de la xylanase sous forme répétée en tandem au génome de la levure (Clare et al., 1991).

La quantité de xylanase sécrétée par le transformant IAF 145 a hydrolysé une partie du xylane et l'a fermentée en éthanol. Mais la réaction n'est pas complète et il reste encore une grande quantité de xylane non dégradé dans le milieu de culture. Le dosage de l'enzyme en condition anaérobique s'est avéré difficile: nous n'avons mesuré que des traces d'enzyme. Il est probable qu'il y a une incorporation de l'enzyme par la cellule, tel que démontré par Morosoli et al., 1991.

Dans un premier temps, nous avons comparé la capacité de fermentation du xylose de la souche PJH 53 avec celle du transformant IAF 145. Nous avons observé un ralentissement de 7 jours dans la fermentation chez le transformant. Cette différence pourrait s'expliquer si l'on

considère que le transformant a besoin du plasmide pour compléter son activité métabolique concernant le gène *HIS3* qui est déficient dans la souche hôte PJH 53. Non seulement 50% des levures ont-elles perdu le plasmide, mais il y a peut-être aussi une diminution de l'activité transcriptionnelle. En milieu xylose, en conditions anaérobiques, il y a 2 fois moins de transcription du gène *HIS3* qu'en milieu aérobie, ce qui limite probablement l'activité métabolique de la souche PJH53 (Morosoli, communication personnelle). Le contrôle de la quantité d'oxygène au cours de la fermentation est un facteur important. La meilleure fermentation du xylose a été obtenue avec une quantité d'oxygène 1 mmole/l per heure (Skoog et Hahn-Hägerdal, 1990). Nous n'avons malheureusement pas réalisé une fermentation anaérobie avec un contrôle d'oxygène. Il aurait fallu mettre au point ces conditions, ce qui n'était pas évident avec l'équipement dont nous disposions pour réaliser cette expérience. L'oxygène peut jouer un rôle important pendant la fermentation du xylose au niveau des cofacteurs NAD et NADH. Ceux-ci sont très importants pour diriger les réactions d'oxydo-réduction dans la conversion du xylose en éthanol par la xylose réductase et xylulose déshydrogénase qui fonctionnent en équilibre.

La souche hôte PJH 53 est capable de fermenter de petites quantités de cellobiose. Nous avons donc testé sa capacité de fermenter un autre disaccharide, qui est un intermédiaire principal lors de la dégradation du xylane. La souche a été capable de fermenter le xylobiose mais le mécanisme d'utilisation n'est pas encore connu. Il est probable qu'avec les mêmes concentrations de cellobiose, le xylobiose sera utilisé également en petites quantités. Il est possible que le transport du xylobiose et du cellobiose requiert de l'énergie et qu'il soit soumis aussi, dans une certaine mesure, à la présence d'oxygène. Cet aspect devra être évalué car le

xylobiose est le produit majeur issu de la dégradation du xylane par la xylanase. Ce phénomène observé chez *P. stipitis* pourrait être comparé à l'utilisation du cellobiose par *Candida wickerhamii* qui n'est pas capable de transporter le cellobiose. Une β -glucosidase est nécessaire pour hydrolyser le cellobiose en molécules de glucose qui sont ensuite transportées à l'intérieur de la cellule. En conditions aérobiques, le glucose accumulé en grandes quantités réprime l'expression de la β -glucosidase ce qui diminue l'utilisation du cellobiose (Freer et Greene, 1990). Donc, il est probable que *P. stipitis* se comporte comme la souche *Candida wickerhamii* qui sécrète une β -xylosidase et une β -glucosidase dans le milieu de culture qui hydrolysent les disaccharides. Quoiqu'il en soit, il faudra explorer plus avant l'utilisation des disaccharides en conditions anaérobiques pour améliorer la souche *P. stipitis* contenant le gène de la xylanase.

CONCLUSION

L'intérêt de ce travail était de construire par génie génétique une souche de levure capable d'utiliser et de fermenter le xylane en éthanol. La xylanase *Cryptococcus albidus* a été employée comme modèle pour le clonage chez *P. stipitis*.

Parmi les constructions de plasmides réalisées, seule la construction d'un plasmide, portant le gène de structure de la xylanase de *C. albidus* sous le contrôle direct du promoteur du gène de la xylose réductase de *P. stipitis* (pIAF 145), a permis l'expression du gène chez *P. stipitis*. Cette levure recombinante a synthétisé une xylanase qui est sécrétée dans le milieu de culture. De plus, la xylanase produite par cette levure a une masse moléculaire de 50 kDa, 2 kDa plus élevé que la xylanase produite par *C. albidus*.

La xylanase produite par *P. stipitis* a une activité de 0.36 U.I./mg de protéine, ce qui est suffisant pour permettre la croissance normale des cellules. Mais la production d'éthanol à partir du xylane 1% donne une valeur maximale de 30 mM qui augmente faiblement après 24 heures de fermentation et qui est une valeur très faible.

Des améliorations pourront être apportées à différents niveaux: l'utilisation d'un promoteur constitutif insensible aux conditions anaérobiques, le clonage d'une xylanase plus active et plus performante dans la dégradation du xylane, le clonage du gène de la xylanase par insertion chromosomique pour stabiliser le gène, l'amélioration de la sécrétion en ajoutant un peptide signal plus approprié que celui de la xylanase.

Récemment, on a décrit la production de xylanase par quelques souches de *Pichia stipitis* (Ozcan et al., 1991), mais leur activité est faible et leur capacité de fermentation à partir du xylane n'est pas encore connue. On pourrait utiliser ces souches et, par clonage homologue, espérer augmenter la quantité de xylanase produite dans le milieu.

Ces résultats préliminaires, ajoutés aux connaissances sur le métabolisme et la génétique de *P. stipitis*, seront les outils qui permettront d'obtenir une souche capable de réaliser de façon efficace la fermentation du xylane en éthanol.

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche, le docteur Rolf Morosoli, non seulement pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire mais également pour les conseils de valeur inestimable.

Je veux remercier aussi, monsieur Serge Durand pour le support technique et l'encouragement pendant le développement de ce projet de recherche.

Je remercie le docteur Michael Ciriacy qui nous a fourni gracieusement le vecteur pJH-S et la souche de *P. stipitis* PJH-53.

Finalement, je remercie l'Université Nationale Autonome du Mexique pour le support financier pour la première année de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- BIELY, P., M. VRSANSKA et Z. KRATKY. 1980. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus* (Identification and cellular localization). *Eur. J. Biochem.* 108:313-321.
- BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotech.* 3:286-290.
- BERENGER, J.F., C. FRIXON, J. BIGHIARDI et N. CREUZET. 1985. Production, purification of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. *Can. J. Microb.* 31:635-643.
- BERNIER, R. Jr., M. DESROCHERS, L. JURASEK et M.G. PAICE. 1983. Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:511-514.
- BOUCHER, F., R. MOROSOLI et S. DURAND. 1988. Complete nucleotide sequence of the xylanase gene from yeast *Cryptococcus albidus*. *Nucleic Acids Research.* 16:9874.
- BROACH, J.R. 1982. The yeast plasmid 2μ circle. *Cell.* 28:203-204.
- de van BROOCK, M.R.G. 1984. Industrial fermentation of ethanol production in South America. *CRC Critical Rev. Biotech.* 1:209-228.
- BRUINEBERG, P.M., P.H.M. de BOT, J.P. van DIJKEN et W.A. SCHEFFERS. 1984. NADH-linked aldose reductase: the key to anerobic alcoholic fermentation of xylose by yeast. *Appl. Microbiol. Biotech.* 19: 256-260.
- CASADABAN, M.J. et S.N. COHEN. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 138:179-207.
- CHAN, E.C., P.P. UENG et L.F. CHEN. 1989. Metabolism of D-xylose in *Schiziasaccharomyces pombe* cloned with a xylose isomerase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:524-528.
- CHARTIER, P. et S. MERIAUX. 1980. L'énergie de la biomasse. *La recherche.* 11:766-776.
- CHUNG, I.S. et Y.Y. LEE. 1986. Effet of oxygen and redox potential on D-xylose fermentation by non-growing cells of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* 8:503-507.
- CLARE, J.J., M.A. ROMANOS, F.B. RAYMENT, J.E. ROWEDO, M.A. SMITH M.M. PAYNE, K. SCREEKRISHNA et C.A. HENWOOD. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene.* 105:205-212.
- CREGG, J.M., K.J. BARRINGER, A.Y. HESSLER et K. R. MADDEN. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molec. Cell. Biol.* 5:3376-3385.

- DAUGLIS, A.J., M.N. BROWN, W.R. CLUETT et D.B. DUNLOP. 1981. Production of ethanol by absorbed yeast cells. *Biotechnol. Lett.* 3:651.
- DAVID, J. et H. WEISMEYER. 1970. Regulation of ribose metabolism in *Escherichia coli*. 3. Regulation of ribose utilization *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.* 208:68-76.
- DEKKER, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 30:1127-1146.
- DELLWEG, H., M. RIZZI, H. METHER et D. DEBUS. 1984. Xylose fermentation by yeasts. *Biotech. Lett.* 6:395-400.
- DOWHANICK, T.M., I. RUSSELL, S.W. SCHERER, G.G. STEWART et V.L. SELIGY. 1990. Expression and regulation of glucoamilase from the yeast *Schwannomyces castellii*. *J.Bact.* 172:2360-2366.
- ENARI, T.M. 1984. Production by fermentation of pentoses and hexoses from cellulosic materials. *Critical. Rev. Biotech.* 1:229-240.
- ESSER, K. et C.L. HINRICHS. 1983. Molecular cloning in heterologous systems. *Adv. Biochem. Engineer.* 26:144-167.
- ESTEBAN, R., J.R. VILLANUEVA et T.G. VILLA. 1982. β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Can. J. Microbiol.* 28:733-739.
- ESTEBAN, R., A. CHORDI et G. VILLA. 1983. Some aspects of a 1,4- β -D xylanase and a β -D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26. *FEMS Microbiol. Lett.* 17:163-166.
- FALCO, S.C., Y. LI, J.R. BROACH et D. BOTSTEIN. 1982. Genetic properties of chromosomally integrated 2μ plasmid DNA in yeast. *Cell.* 29:573-584.
- FAN, L.T., Y.H. LEE et M.M. GHARPURAY. 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Engineer.* 23:157-187.
- FREER, S.N. et R. V. GREENE. 1990. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. *J. Biol. Chem.* 265: 12864-12868.
- GONG, CH. S., L.F. CHEN, G.T. TSAO et M.C. FLICKINGER. 1981. Conversions of hemicellulose carbohydrates. *Adv. Biochem. Engineer.* 20:93-108.
- GROOTJEN, D.R.J., L.H.H.M. MEIJLINK, R.G.J.M. van der LANS et K.CH.A.M. LUYBEN. 1990. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 12:860-864.

- GUEBEL, D.V., A. CORDENONS, B.C. NUDEL et A.M. GIULIETTI. 1991. Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *J. Ind. Microb.* 7:287-292.
- HAGERDON, J. et M. CIRIACY. 1989. Isolation and characterization of *xyl* mutants in a xylose-utilizing yeast, *Pichia stipitis*. *Curr. Genet.* 16:27-33.
- HAHN-HAGERDAL, B., T. LINDEN, T. SENAC et K. SKOOG. 1991. Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotech.* 28:131-144. *Curr. Genet.* 16: 27-33.
- HILL, J., K.A. IAN, G. DONALD et D.E. GRIFFITHS. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research.* 19:5791.
- HINNEN, A., J.B. HICKS et G.R. FINK. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1929-1933.
- HO, N.W.Y. et S.F. CHANG. 1989. Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of *Escherichia coli* and yeast mutations. *Enzyme Microb. Technol.* 11:417-421.
- HO, N.W.Y., D. PETROS et X.X. DENG. 1991. Genetic transformation of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotech.* 28:369-375.
- HOLMES, D.S. et N. QUIGLEY. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193.
- HUTCHINSON, C., A.S. PHILLIPS, M.H. EDGELL, S. GILLAM, P. JAHNKE et M. SMITH. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* 253:6551-6560.
- JANSHEKAR, H. et A. FIECHTER. 1983. Lignin: Biosynthesis, Application and Biodegradation. *Adv. Biochem. Engineer.* 27:120-178.
- JEFFRIES, Th.W. 1983. Utilisation of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv. Biochem. Engineer.* 27:2-32.
- KILIAN, S.G. et N. van UDEN. 1988. Transport of xylose and glucose in xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 545-548.
- KLEBE, R., J.V. HARRIS, D. SHRP et M.G. DOUGLAS. 1983. A general method for polyethylene-glycol-induced transformation of bacteria and yeast. *Gene.* 25:333-341.

KOTTER, P., R. AMORE, C.P. HOLLENBERG et M. CIRIACY. 1990. Isolation and characterisation of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL 2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr. Genet.* 18: 493-500.

KOSARIC, N., D.C.M. NG, I. RUSSELL et G.S. STEWART. 1980. Ethanol production by fermentation: an alternative liquid fuel. *Adv. Microbiol.* 26:148-227.

KOSARIC, N. Z. DUVNJAK, G.G. STEWART. 1981. Fuel ethanol from biomass: production, economics, and energy. *Adv. Biochem. Engineer.* 20:119-151.

KUNKEL, T.A., J.D. ROBERTS et R.A. ZAKOUR. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzym.* 154:367-382.

KURTZMAN, C.P. 1983. Biology and physiology of the D-xylose fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Adv. Biochem. Engineer.* 27:73-83.

LAEMMLI, U.K. 1970. Clonage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

LEATHERS, T.D., C.P. KURTZMAN et R.W. DETROY. 1984. Overproduction and regulation of xylanase in *Aerobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotechnology and Bioengineering Symp.* No. 14. John Wiley and Sons, Inc., Editors.

LEE, H., P. BIELY, R.K. LATTA, M.F.S. BARBOSA et H. SCHNEIDER. 1986. Utilisation of xylan by yeast and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:320-324.

LEMMEL, S.A., R. DATTA et J.R. FRANKIEWICZ. 1985. Fermentation of xylan by *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 217-221.

LIGON, J.M., P.L. BOLEN, D.S. HILL, R.J. BOTHAST et C.P. KURTZMAN. 1989. Physical and biological characterization of linear DNA plasmids of yeast *Pichia inositovora*. *Plasmid*: 21:185-194.

LOWRY, O.H., N.H. ROSEBROUGH, A.L. FAN et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

MAIORELLA, B., CH.R. WILKE et H.W. BLANCH. 1981. Alcohol production and recovery. *Adv. Biochem. Engineer.* 20:43-92.

MANDEL, M. et A. HIGA. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol. Biol.* 53:159-162.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular Cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York.

MARGARITIS, A. et P. BAJPAI. 1982. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. Appl. Environ. Microb. 44:1039-1041.

MARGARITIS, A. et F.J.A. MERCHANT. 1984. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. CRC Rev. Biotech. 1:339-393.

MARUI, M., K. NAKANISHI et T. YASUI. 1985. Purification and properties of three types of xylanases induced by methyl β -xyloside from *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem. 49:3399-3407.

MEAD, D.A., E.S. SKORUPA et B. KEMPER. 1986. Single-stranded DNA blue T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Protein Engineering. 1:67-74.

MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 31:426-428.

MONDOU, F., F. SHARECK, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene. 49: 323-329.

MOREAU, A., S. DURAND et R. MOROSOLI. 1992. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 116:109-113.

MOROSOLI, R., J.L. BERTRAND, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1986a. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 239:587-592.

MOROSOLI, R., R. CAMILLE et M. YAGUCHI. 1986b. Isolation and partial primary sequence of xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. Biochimica et Biophysica Acta. 870:473-478.

MOROSOLI, R., P. LECHER et S. DURAND. 1988a. Effect of tunicamycin on xylanase secretion in the yeast *Cryptococcus albidus*. Arch. Biochem. Biophys. 265:183-189.

MOROSOLI, R. et S. DURAND. 1988b. Molecular cloning of mRNA sequences encoding xylanase from *Cryptococcus albidus*. FEMS Microb. Lett. 51:217-224.

MOROSOLI, R., P. LECHER et S. DURAND. 1991. A newly described role protein glycosylation: starved yeast cells absorb their under-glycosylated secreted xylanase faster than the glycosylated enzyme. FEMS Microb Lett. 82: 153-156.

- MOROSOLI, R., S. DURAND et A. MOREAU. 1992. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a xylanase-encoding gene from the yeast *Cryptococcus albidus*. *Gene*. 117:145-150.
- MORIYAMA, H., E. FUKASAKI, J. CRESPO, A. SHISMYO et H. OKADA. 1987. Structure and expression of genes coding for xylan-degradating enzymes of *Bacillus pumilus*. *Eur. J. Biochem.* 166:539-545.
- NAKAJIMA, T., K. TSUKAMOTO, T. WATANABE, K. KAINUMA et K. MATSUDA. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- β -D-xylanase of *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Technol.* 62: 361-369.
- OZCAN, S., P. KOTTER et M. CIRIACY. 1991. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:190-195.
- PARISI, F. 1983. Energy balances for ethanol as a fuel. *Adv. Biochem. Engineer.* 28:42-68.
- POLAINA, J. et A.C. ADAM. 1991. A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic Acids Research.* 19: 5443.
- POUTANEN, K. , M. RATTO, J. PULS et L. VIKARI. 1987. Evaluations of different microbial xylanolytic systems. *J. Biotechnol.* 6:49-60.
- van RIJ, K. 1984. *The yeast (a taxonomic study)*. Elsevier, Netherlands.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
- SARTHY, A.V., B.L.Mc CONAUGHY, Z. LOBO, J.A. SUNDSTROM, C.E. FURLONG et B.D. HALL. 1987. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1996-2000.
- SCHNEIDER, H.,R. MALESZKA, L. NEIRINCK, I.A. VELIKY, P.Y. WONG et Y.K. CHAN. 1983. Ethanol production from D-xylose and several other carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and other yeasts. *Adv. Biochem. Engineer.* 27:57-72.
- SHAMANNA, D.K. et K.E. SANDERSON. 1979. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 139:64-70.
- SHERMAN, F., G. FINK et M. FUKU. 1984. *Methods in yeast genetics (laboratory manual)*. C.H.S. New York: 89p.
- SIPAT, A., K.A. TAYLOR, R.Y. LO, C.W. FORSBERG et P.J. KRELL. 1987. Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:447-481.

- SKOOG, K. et B. HAHN-HAGERDAL. 1988. Xylose fermentation. *Enzym Microb. Technol.* 10:66-80.
- SKOOG, K. et B. HAHN-HAGERDAL. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Microb. Biotech.* 56:3389-3394.
- SREENATH, H.K. et r. JOSEPH. 1982. Purification and properties of extracellular xylan hydrolases of *Streptomyces exfoliatus*. *Folia Microbiol.* 27:107-115.
- STEARNS, T., H. MA et D. BOTSTEIN. 1990. Manipulating yeast genome using plasmid vectors. *Methodes Enzymol.* 185:280-297.
- STEWART, J.C., A. LESTER, B. MILBURN et J.B. PARRY. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus fresenius*. *Biotechnol. Lett.* 5:543-548.
- STEWART, G.G., Ch. J. PANCHAL, I. RUSSELL et A.M. SILLS. 1984. Biology of ethanol-producing microorganismes. *CRC Crit. Rev. Biotech.* 1:161-188.
- STUTTGEN, E. et H. SAHM. 1982. Purification and properties of endo-1,4- β xylanase from *Trichoderma cutaneum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15:93-99.
- TAKUMA, S., N. NAKASHIMA, M. TANTIRUNGKIJ, S. KINOSHITA, H. OKADA, T. SEKI et T. YOSHIDA. 1991. Isolation of xylose reductase gene of *Pichia stipitis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotech.* 28:327-340.
- TOVOILA, A., D. YARROW, E. van den BOSCH, J.P. van DIJKEN et W.A. SCHEFFERS. 1984. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microb.* 47:1221-1223.
- TUBB, R.S. 1984. Genetics of ethanol-producing microorganismes. *CRC Critical Rev. Biotech.* 1:241-262.
- VERDUYN, C., R. van KLEEF, J. FRANK, J.H. SHEREUDER, J.P. van DIJKEN et W.A. SCHEFFERS. 1985. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.* 226:669-677.
- VERNET, T., D. DIGNARD et D.Y. THOMAS. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene.* 52:225-233.
- WILLS, C. 1990. Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 25:245-280.
- WILSON, B.L. et R.P. MORTLOCK. 1973. Regulation of D-xylose and D-arabitol catabolism by *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 113:1404-1411.

WONG, K.K.Y., L.U.L. TAN et J.N. SADDLER. 1988. Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganismes: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52:305-317.

WOOD, W.I., J. GITSCHIER, L.A. LASKY et R.M. LAWN. 1985. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a methode for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1585-1588.

WOODWARD, J. 1984. Xylanases: Functions, properties and applications. *Top. Enzyme Ferm. Biotech.* 8:9-30.

WORSHAM, P.L. et P.L. BOLEN. 1990. Killer toxin in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Current Genetics.* 18:77-80.